

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED 414)

Unité de recherche : CNRS UPR 3572

THÈSE présentée par :

Mickaël MARTIN

soutenue le : **22 juin 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : **Immunologie**

<p>Expression de ZAP-70 dans les lymphocytes B non tumoraux</p> <p>Implications dans la rupture de tolérance et la transformation néoplasique</p>

THÈSE dirigée par :

M. MARTIN Thierry

PU-PH

CNRS UPR 3572, IBMC, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. MOUTHON Luc

PU-PH

*INSERM U1016, Institut Cochin, Faculté de Médecine
Université Paris-Descartes*

M. BONNOTTE Bernard

PU-PH

*INSERM UMR 1098, Faculté de Médecine
Université de Bourgogne-Franche Comté*

EXAMINATEUR INTERNE :

Mme CHAN Susan

Directeur de Recherche INSERM

*Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Université de Strasbourg*

A mon père...

Remerciements

A Monsieur le Professeur **Thierry MARTIN**. Je vous remercie de m'avoir proposé ce travail et d'avoir cru en moi pour le mener à bien. Je vous suis très reconnaissant de votre patience et de votre optimisme indéfectible face aux nombreuses difficultés rencontrées tout au long de cette thèse.

Aux Messieurs les Professeurs **Luc MOUTHON** et **Bernard BONNOTTE** ainsi qu'à Madame le Docteur **Susan CHAN** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Merci à Monsieur le Docteur **Laurent VALLAT**, pour ses précieux conseils et son aide scientifique tout au long de cette thèse.

Merci aussi à Monsieur le Professeur **Raoul HERBRECHT**, pour sa précieuse collaboration et son implication dans le recrutement des patients et les recueils des échantillons.

Merci à Madame le Docteur **Hélène DUMORTIER** et à Madame le Professeur **Sylviane MULLER** pour m'avoir accueilli dans le laboratoire.

Merci aux Professeurs **Pauline SOULAS-SPRAUEL** et **Anne-Sophie KORGANOW**, ainsi qu'aux Docteurs **Frédéric GROS** et **Sophie JUNG** pour leur encadrement scientifique et leurs bons conseils.

Merci à la petite équipe de l'UPR 3572 pour l'ambiance de travail et pour m'avoir supporté durant tout ce temps !

Merci particulièrement à **Anne-Marie**, pour ton enseignement, ta précieuse expertise technique et tes petits conseils. Je souligne ta persévérance inébranlable pour les innombrables PCR cellule unique et les clonages !

Merci à **Vincent**, pour tes blagues, ton humour noir et surtout de ton amitié et ton précieux soutien durant les phases de creux...Merci aussi pour ta rigueur et tes précieux conseils d'analyse !

Merci à **Aurélien**, compagnon de galère, pour ta bonne humeur et tes chansons old school...mais surtout de ton soutien mutuel pour faire face à la dichotomie et la charge de travail clinicat/labo qui a bien failli avoir raison de notre santé mentale...Tu tiens le bon bout, courage mon Ami !

Merci à **Delphine** pour ta bonne humeur (quasi)permanente, ton aide précieuse, ton efficacité et ta rigueur.

Merci à **Anne**, partie rejoindre des contrées lointaines, nos prises de bec et ton franc parler me manqueront...

Merci à **Delphine et Monique**, pour toute votre aide sur les manip souris, votre disponibilité et votre bonne humeur. Ce fût vraiment un plaisir de travailler avec vous !

Merci aussi à **Claudine** de l'IGBMC pour ta disponibilité concernant les tris en cellule unique

Merci à **Éric Meffre** et à son équipe de l'université de Yale pour leur précieuse collaboration dans la production et les tests des Ac monoclonaux.

Je remercie aussi les équipes **services d'Hématologie et d'Immunologie Clinique du CHU de Strasbourg, et d'Hématologie Clinique du GHR de Mulhouse**, pour leur collaboration dans le recrutement et le recueil des échantillons.

Merci à tous les **patients** qui ont accepté de participer à ce travail.

Merci aux nombreuses **souris** qui ont donné leur corps à la Science pour ce travail !

Merci à la **Ligue contre le cancer, Alsace contre le cancer, Groupe Pasteur Mutualité et CSL Behring**, qui ont financé une grande partie de ce travail et m'ont permis d'être à temps plein au laboratoire quelques mois en fin de thèse.

Merci à mes **chefs et collègues du service d'Immunologie Clinique du CHU de Strasbourg** pour m'avoir accordé du temps pour avancer dans ce travail de thèse.

A tous **mes amis** qui m'ont supporté durant toute la durée de cette thèse, en particulier **Frank et Delphine** pour leur soutien et encouragements, et le modèle que vous êtes pour moi...

A toute **ma famille**, pour qui mon métier d'interniste et ma thèse d'immunologie restent des termes abstraits...En particulier à ma mère Bernadette et mon beau père Michel pour leur soutien constant depuis toutes ces années ; à Anne-Marie, Minus, Dona et Patrick pour leur bonne humeur et le réconfort qu'ils m'apportent ; enfin à mes grand-mères Eleonora et Simone à qui je dois tant...

Enfin, rien de tout cela n'aurait été possible sans ma femme, **Leïla**. Merci d'avoir réussi à me supporter, merci de ta patience, de ta compréhension, et de ton soutien indéfectible depuis déjà 15 ans...Merci simplement d'exister, d'être toi...

Résumé

L'expression de ZAP-70 dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est associée à une hypersignalisation du BCR et à la survenue de cytopénies auto-immunes (CAI).

Les LB non tumoraux expriment aussi ZAP-70, expression corrélée à celle dans les LB tumoraux et aux CAI.

Nous avons montré que ces LB non tumoraux ZAP-70⁺ sont polyclonaux, sans lien moléculaire entre eux ni avec le clone tumoral et qu'il n'existe pas de stéréotypie de leur BCR. Ces LB présentent par contre un enrichissement en BCR autoréactifs.

Notre modèle murin knock in *Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{+/-}* a montré qu'une forte expression précoce de ZAP-70 dans les LB est associée à un avantage sélectif médullaire, un enrichissement en cellules potentiellement autoréactives de type zone marginale, à un blocage partiel de la maturation et de la différenciation périphérique, ainsi qu'au développement de caractéristiques de la LLC : déficit en IgG et IgM totales sériques, enrichissement en auto-anticorps circulants, hyperactivation et prolifération cellulaires augmentées.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives impliquant ZAP-70 dans la compréhension du développement B et de la physiopathologie de la rupture de tolérance et de la transformation néoplasique.

Mots clés : leucémie lymphoïde chronique, ZAP-70, auto-immunité, lymphocyte B

Abstract

ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) is associated with BCR hypersignalling and autoimmune cytopenia (AIC) occurrence.

Non tumoral B cells also express ZAP-70, which is correlated with those in tumoral B cells and AIC. We have shown that these non tumoral B cells ZAP-70⁺ are polyclonal, without molecular link between each other and tumoral B cells, and without BCR stereotypy. These cells are however enriched in autoreactive BCR.

Our mouse model knock in *Zap-70*^{+/-} / *Mb1-Cre*^{+/-} revealed that a high and early ZAP-70 expression is associated with medullar selective advantage, enrichment in potential autoreactive B cells of marginal zone subtype, partial block for peripheral maturation and differentiation, along with some LLC characteristics: reduction in total IgG and IgM, enrichment in circulating auto-antibodies, increase in cellular activation and proliferation.

These results open new opportunities involving ZAP-70 in the understanding of B cell development and physiopathology of tolerance breakdown and neoplastic transformation.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, ZAP-70, autoimmunity, B lymphocyte

Table des matières

Liste des tableaux.....	1
Liste des illustrations.....	2
Liste des abbréviations.....	5
I. INTRODUCTION	15
A. ZAP-70 : STRUCTURE ET ROLE FONCTIONNEL	17
1. Structure	17
2. Rôles fonctionnels.....	20
a) Activation, différenciation et prolifération cellulaire T	20
b) Focus sur le rôle dans l'ontogénie T	23
c) Rôles non canoniques	26
3. Expression dans les lymphocytes Natural Killer	28
4. Régulation.....	28
a) Régulation positive	28
b) Régulation négative	30
5. Synthèse	31
B. ZAP-70 ET CARCINOGENESE : LA LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE.....	32
1. Définition et diagnostics différentiels.....	32
2. Epidémiologie et facteurs de risque.....	33
3. Diagnostic.....	35
a) Manifestations cliniques	35
b) Données biologiques	36
4. Pathogénie.....	39
a) Origine cellulaire des LB tumoraux.....	39
(1) Les LB « mémoires »	40
(2) Les LB de la zone marginale.....	40
(3) Les LB CD5 ⁺ ou LB1a Humains	41
(4) Les cellules souches hématopoïétiques	42
b) La MBL précurseur de la LLC ?.....	43
c) Stéréotypie du BCR et sélection(s) antigénique(s).....	44
d) Signalisation médiée par le BCR.....	45
e) Microenvironnement	51
f) Anomalies génétiques.....	54
(1) Aberrations chromosomiques.....	54
(2) Mutations géniques.....	55
(3) Epigénétique.....	56
(4) Evolution clonale.....	58
5. Classification et facteurs pronostiques.....	61
a) Marqueurs traditionnels.....	62
b) Nouveau marqueurs pronostiques	64
(1) Statut mutationnel de l'IgHV.....	64
(2) Expression de ZAP-70	66
(3) Expression de CD38	70
(4) Expression de CD49d	71
(5) Anomalies génétiques.....	72
(6) Quantification de la maladie résiduelle	73
6. Traitement.....	76
7. Complications.....	80
8. Synthèse : rôle de ZAP-70 dans la LLC	84

C.	ZAP-70 ET AUTO-IMMUNITE	86
1.	Altérations de l'ontogénie T et échappement de LT autoréactifs	86
2.	Rôle dans les LB : les cytopénies auto-immunes de la LLC	90
a)	Epidémiologie.....	91
b)	Diagnostic.....	91
(1)	Anémie hémolytique auto-immune secondaire.....	92
(2)	Purpura thrombopénique immunologique (PTI).....	93
(3)	Aplasie érythrocytaire pure (PRCA).....	94
(4)	Granulocytopenie auto-immune (AIG).....	95
c)	Physiopathologie.....	96
(1)	IgG polyclonales autoréactives issues des LB non tumoraux.....	97
(2)	Les LB LLC comme cellules présentatrices d'antigène.....	97
(3)	IgM monoclonales issues des LB LLC.....	99
(4)	Polyréactivité du BCR et sélection Ag.....	99
(5)	Altération de la balance LTreg/LTh17.....	100
(6)	Rôle des TLRs.....	101
(7)	Répression médullaire par les grands lymphocytes granuleux.....	102
d)	Impact pronostique et facteurs de risque.....	103
e)	Traitement.....	108
(1)	AHAI et PTI.....	108
(2)	PRCA et AIG.....	110
(3)	Autres manifestations auto-immunes dans la LLC.....	111
3.	Synthèse : rôle de ZAP-70 dans l'auto-immunité	111
D.	ROLE DE ZAP-70 DANS LES LB NON TUMORAUX	113
1.	Ontogénie B : les modèles murins	113
a)	Rappels sur l'ontogénie B.....	113
b)	Redondance fonctionnelle partielle entre ZAP-70 et SYK.....	116
2.	Rôle dans les LB non tumoraux humains (hors LLC) ?	121
3.	Expression dans les LB CD5- dans la LLC	127
II.	PROJET DE THESE	133
III.	PATIENTS, MATERIEL ET METHODES	141
A.	PARTIE HUMAINE DU PROJET	143
1.	Patients	143
2.	Recueil et congélation des PBMC	143
3.	Détermination du statut ZAP-70 des LLC	144
4.	Etude du répertoire du BCR	145
a)	A partir de pools cellulaires lymphocytaires B.....	145
(1)	Tri des LB en tubes par cytométrie en flux.....	145
(2)	Extraction d'ARN total.....	146
(3)	Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc).....	146
(4)	Amplification des chaînes lourdes et légères des Ig par PCR nichées.....	147
(a)	PCR 1.....	147
(b)	PCR 2.....	147
(5)	Clonage et séquençage des amplicons obtenus.....	148
b)	A partir de cellules uniques lymphocytaires B.....	150
(1)	Tri des LB en plaque de 96 puits par cytométrie en flux.....	150
(2)	Synthèse d'ADNc.....	150
(3)	Amplification des chaînes lourdes et légères des Ig par PCR nichées.....	151
(4)	Séquençage des amplicons.....	154
5.	Génération d'Ac monoclonaux recombinants à partir de LB non tumoraux ZAP-70+ triés en cellule unique	155
a)	Clonage des produits de PCR2 dans des vecteurs d'expression.....	155
b)	Transfections cellulaires.....	156
c)	Quantification des Ac monoclonaux et tests de leurs autoréactivités.....	157

(1)	Purification des Ac monoclonaux	157
(2)	Quantification des Ac monoclonaux	158
(3)	Autoréactivités anti-ADNdb, -thyroglobuline et -actine par ELISA	159
(4)	TCD et MAIPA	160
(5)	Réactivité anti-nucléaire et polyréactivité	160
(a)	Réactivité anti-nucléaire	160
(b)	Polyréactivité	160
B.	PARTIE MURINE DU PROJET	165
1.	Génération du modèle murin KI Zap-70	165
a)	Clonage de Zap-70 dans le vecteur plasmidique	165
(1)	Amplification et clonage de Zap-70	165
(2)	Ajout des sites de restriction Ascl encadrant la sequence codante de Zap-70	166
(3)	Vecteur de surexpression CTV-Zap-70+	167
b)	Infection cellulaire et production du modèle KI Zap-70	168
c)	Production du modèle conditionnel	169
2.	Génotypage des souris transgéniques	171
a)	Extraction de l'ADN génomique de queue de souris	171
b)	PCR de génotypage	171
(1)	Zap-70	172
(2)	Mb1-Cre	173
3.	Validation du modèle conditionnel KI ZAP et analyse des cellules lymphoïdes B à l'état basal 174	
a)	Recueil des cellules lymphoïdes	174
b)	Immunophénotypage B à l'état basal et visualisation de l'expression de la GFP par cytométrie en flux	175
(1)	Evaluation de l'apoptose médullaire	176
(2)	Visualisation de l'expression de ZAP-70 par cytométrie en flux	176
(3)	Quantification de l'expression de ZAP-70 par RT-qPCR	177
(a)	Tri des LB GFP ⁺ par FACS	177
(b)	Extraction d'ARN	178
(c)	Amplification par PCR quantitative en temps réel	178
4.	Stimulations in vitro	179
a)	Tri des LB CD43- spléniques	179
b)	Milieux de stimulation	180
c)	Analyses par cytométrie en flux	180
(1)	Analyse des marqueurs d'activation cellulaire à 48h	181
(2)	Analyse de la différenciation plasmocytaire à 72h	181
(3)	Analyse des marqueurs de prolifération cellulaire à 90h	182
5.	Etude de la signalisation du BCR	182
a)	Analyse du flux calcique	182
b)	Etude de la phosphorylation des principales protéines impliquées dans la signalisation du BCR par western blot	183
c)	Etude de la phosphorylation de ZAP-70 par immunoprécipitation	185
6.	Etude de la production d'Ac in vivo et in vitro	187
a)	Récupération du sérum et des surnageant de culture	187
b)	Immunisations par Ovalbumine ou NP-LPS	187
c)	Dosage des Ig par ELISA	189
(1)	IgG et IgM totales	189
(2)	IgG et IgM spécifiques anti-OVA ou anti-NP	190
(3)	Auto-réactivités IgG et IgM	190
(a)	Anti-ADN	190
(b)	Facteur rhumatoïde	191
d)	Recherche d'autoréactivité(s) sur panel antigénique	191
e)	ELISPOTs Ovalbumine et NP	192
7.	Recherche de lymphoprolifération, de cytopénies et de néphropathie	193
a)	Numérations formules sanguines (NFS)	193
b)	Protéinurie	194
c)	Anatomopathologies rénales et ganglionnaires	194
C.	ANALYSES STATISTIQUES	196

IV. RESULTATS199

A.	PARTIE HUMAINE DU PROJET	201
1.	Etude du répertoire du BCR des LB non tumoraux ZAP-70⁺	201
a)	A partir de pools lymphocytaires B	202
(1)	Tests initiaux.....	202
(2)	Modifications de l'extraction d'ARN et des conditions de PCR.....	204
(3)	Diminution de la quantité de formaldéhyde.....	205
(4)	Fixation/perméabilisation modifiée et amorces sur cellule unique	207
b)	Analyses sur LB triés en cellule unique	208
2.	Autoréactivités des LB non tumoraux ZAP-70⁺	213
a)	Production d'Ac monoclonaux à partir des LB CD5-ZAP-70 ⁺	213
b)	Tests des autoréactivités à partir des surnageants.....	214
(1)	Quantification des Ac obtenus.....	214
(2)	Autoréactivités anti-érythrocytes et anti-plaquettes.....	215
(3)	Réactivités anti-ADN, anti-thyroglobuline et anti-actine.....	215
c)	Essai de purification des Ac à partir des surnageants.....	217
d)	Tests des autoréactivités à partir des Ac monoclonaux purifiés et concentrés	219
3.	Conclusions de la partie humaine	221
B.	PARTIE MURINE DU PROJET.....	223
1.	Génération du modèle KI ZAP-70.....	223
2.	Validation du modèle KI ZAP-Mb1	225
a)	Visualisation de l'expression globale de la GFP par cytométrie en flux	225
b)	Analyse des différents profils d'expression de la GFP	227
c)	Visualisation de l'expression de ZAP-70.....	229
3.	Immunophénotypage des organes lymphoïdes à l'état basal	232
a)	Splénocytes et LB spléniques totaux.....	233
b)	Organes lymphoïdes primaires : moelle osseuse.....	234
(1)	Immunophénotypage	234
(2)	Apoptose spontanée précoce.....	235
c)	Organes lymphoïdes secondaires : rate et ganglions.....	237
(1)	Rate	238
(2)	Ganglions	240
d)	Lavages péritonéaux.....	241
e)	Analyse selon l'intensité d'expression globale de la GFP.....	242
4.	Production d'Ac, auto-immunité et lymphoprolifération à l'état basal.....	245
a)	Taux des immunoglobulines sériques	245
(1)	IgG totales.....	245
(2)	IgM totales.....	246
b)	Auto-immunité spontanée	246
(1)	Activité facteur rhumatoïde et anti-ADN.....	247
(2)	Evaluation des auto-réactivités sur panel antigénique	248
c)	Lymphoprolifération, cytopénie(s) et néphropathie	251
d)	Analyses anatomopathologiques spléniques et ganglionnaires.....	253
5.	Stimulations in vitro et immunisations	254
a)	Stimulations <i>in vitro</i>	254
(1)	Augmentation de l'autofluorescence de la GFP et de ZAP-70.....	255
(2)	Marqueurs d'activation précoce.....	257
(3)	Prolifération cellulaire.....	258
(4)	Productions d'Ig et différentiation plasmocytaire.....	260
(a)	Ig dans les surnageants.....	260
(b)	Différentiation plasmocytaire.....	261
b)	Immunisations	263
(1)	Réponse Ac totale et spécifique de l'Ag	264
(a)	Ovalbumine + adjuvant de Freund	264
(b)	NP(0,3)-LPS.....	266
(2)	Prolifération cellulaire.....	268
(a)	ovalbumine + adjuvant de Freund.....	268
(b)	NP(0,3)-LPS.....	268

6. Signalisation du BCR	270
a) Flux calcique intracellulaire	270
b) Etude par Western blot de la phosphorylation des voies de la signalisation du BCR	272
c) Etude de la phosphorylation de ZAP-70 par immunoprécipitation	275
7. Conclusions de la partie murine	276

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	281
--	------------

BIBLIOGRAPHIE	321
----------------------------	------------

Liste des tableaux

Tableau 1. Immunophénotypes de la LLC et d'autres lymphoproliférations B malignes	36
Tableau 2. Score phénotypique de Matutes (optimisé avec l'utilisation du CD22 en lieu et place du CD79b).	37
Tableau 3. Signalisation du BCR dans les LB LLC comparativement aux LB normaux	47
Tableau 4. Système de classification pronostique de Rai	62
Tableau 5. Système de classification pronostique de Binet	63
Tableau 6. Score pronostique CLL-IPI	74
Tableau 7. Résumé des facteurs pronostiques au diagnostic de la LLC.....	75
Tableau 8. Algorithmes de traitements de la LLC en 1ère et 2e lignes	79
Tableau 9. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des Ig sur pools lymphocytaires B fixés et perméabilisés, à partir du ADNc en PCR nichée	148
Tableau 10. Séquences des amorces spécifiques de ZAP-70 utilisées pour son amplification par RT-PCR et PCR nichées	151
Tableau 11. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des Ig à partir du ADNc en PCR nichée	153
Tableau 12. Résumé des caractéristiques des PCR et amorces utilisées pour les génotypages murins	174
Tableau 13. Ac primaires utilisés et dilutions respectives	185
Tableau 14. Concentrations mesurées par ELISA des Ac monoclonaux (IgG) non purifiés dans les surnageants de transfection.	214
Tableau 15. Exemples représentatifs des différents tests concernant les taux en Ac monoclonaux dans les surnageants de transfection avant et après purification et concentration sur colonnes.....	217
Tableau 16. Comparaison des pourcentages de cellules exprimant la GFP dans les différents organes lymphoïdes des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 par cytométrie en flux.....	227
Tableau 17. Synthèse de l'analyse par cytométrie en flux des différentes populations lymphocytaires B selon les organes dans les différents groupes de souris : KI ZAP, KI ZAP-Mb1 et au sein de ces dernières les sous-groupes SoZAPLow et SoZAPHigh.....	244
Tableau 18. Principales altérations phénotypiques et fonctionnelles du modèle murin KI ZAP-Mb1	278

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de ZAP-70 à l'état inactivé	17
Figure 2. Déterminants structuraux de l'activation de ZAP-70.....	19
Figure 3. Recrutement et activation de ZAP-70 dans les LT	21
Figure 4. Expression et fonction de ZAP-70 et de SYK dans l'ontogénie T.....	23
Figure 5. Modèle de l'activation de ZAP-70 après sa liaison aux ITAMs.....	29
Figure 6. Caractéristiques microscopiques de la LLC.	38
Figure 7. Représentation schématique de la signalisation dans la LLC.	50
Figure 8. Modalités d'interaction entre les LB LLC et le microenvironnement.....	53
Figure 9. Cibles moléculaires et conséquences des principaux miARNs dans la LLC	58
Figure 10. Évolution clonale dans la LLC.	59
Figure 11. Modèle pour le développement de la LLC.....	60
Figure 12. Courbes de survie (Kaplan-Meier) comparant 84 cas de LLC avec IGHV mutée ou IGHV non mutée.....	65
Figure 13. Méthode de cytométrie en flux utilisée pour la quantification de l'expression de ZAP-70 dans les LB LLC.....	67
Figure 14. Probabilité de progression de la LLC et de survie des patients en stade Binet A selon la positivité ou non pour l'expression de ZAP-70 dans les LB LLC	68
Figure 15. Résumé des principaux sous-groupes de LLC selon leurs profils clinico- biologiques et pronostiques.....	72
Figure 16. Interactions thymiques durant l'ontogénie T et anomalies observées dans les thymus des patients ZAP-70-/-	89
Figure 17. Principaux mécanismes pathogéniques impliqués dans la survenue de CAI dans la LLC	103
Figure 18. Relations entre l'expression de ZAP-70 et la survenue de cytopénies auto- immunes dans la LLC.....	107
Figure 19. Ontogénie B et rôle du pré-BCR	115
Figure 20. Différences d'expression de ZAP-70 dans les LB périphériques.....	123
Figure 21. Expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux et caractère polyclonal.	128
Figure 22. Corrélations du niveau d'expression de ZAP-70 entre les LB LLC et les LB non tumoraux chez les patients atteints de LLC.....	129
Figure 23. Les LB ZAP-70+ non tumoraux de la LLC n'appartiennent pas à une sous population B particulière.....	130
Figure 24. Expression de ZAP-70 par les LB non tumoraux et survenue de CAI dans la LLC.....	131
Figure 25. Stratégie de sélection, clonage et expression des Ac monoclonaux recombinants humains issus des LB ZAP-70+ triés en cellule unique	162
Figure 26. Représentation simplifiée du construit génique et des croisements murins	170
Figure 27. Amorces disponibles et utilisées pour le génotypage de Zap-70	173

Figure 28. Résumé des schémas d'immunisations expérimentales à l'ovalbumine ou au NP-LPS	188
Figure 29. Stratégie initiale de tri par cytométrie en flux des LB ZAP-70+ pour l'étude du répertoire du BCR à partir de PBMC congelés de patients atteints de LLC	202
Figure 30. Exemple d'amplification par RT-PCR des IGHV et IGLV κ et de la β -actine sur différentes quantités de PBMC fixées/perméabilisées ou non.....	203
Figure 31. Exemple d'amplification par RT-PCR des IGHV et de la β -actine sur différentes quantités de PBMC fixées/perméabilisées ou non suite à l'extraction d'ARN par le kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation	204
Figure 32. Tests visant à diminuer la quantité de formaldéhyde pour le marquage de ZAP-70 sur 106 PBMC avec le kit PerFix-nc	206
Figure 33. Résultats des PCR2 et du séquençage des IGHV sur pool lymphocytaires B, en utilisant le kit de fixation/perméabilisation PerFix-nc modifié et les amorces de Tiller et al.....	208
Figure 34. Stratégie finale de tri en cellule unique par cytométrie en flux des LB ZAP-70+ pour l'étude du répertoire du BCR.....	209
Figure 35. Répertoire des LB CD5-ZAP-70+ et du clone malin correspondant à partir de tri en cellule unique de 7 LB de patients atteints de LLC avec CAI.	212
Figure 36. Réactivités anti-ADNdb, anti-thyroglobuline et anti-actine en ELISA des surnageants contenant les Ac monoclonaux issus des LB CD5-ZAP-70+ de patients atteints de LLC avec CAI.	216
Figure 37. Autoréactivités des Ac monoclonaux purifiés et concentrés issus des LB CD5-ZAP-70+ provenant de patients avec LLC avec CAI.....	220
Figure 38. Exemples de géotypages Zap-70 et Mb1 sur différentes souris.....	224
Figure 39. Identification des progéniteurs médullaires et visualisation de l'expression de la GFP dans les différents organes lymphoïdes par cytométrie en flux.....	226
Figure 40. Exemples des différents profils d'expression de la GFP par les LB selon les souris dans le modèle murin KI ZAP-Mb1 et KI Trib1-Mb1 utilisant la même construction génique.	228
Figure 41. Proportion de LyGFP ^{High} selon le sexe et proportion de LyGFP ^{Low} et de LyGFP ^{High} médullaires et spléniques pour chaque souris.	229
Figure 42. Profils d'expression de ZAP-70 par cytométrie en flux.....	230
Figure 43. Comparaisons des expressions de GFP et de ZAP-70 selon différentes techniques.	231
Figure 44. Nombre de splénocytes totaux et de B220+ spléniques et corrélation avec la proportion de LyGFP ^{High}	233
Figure 45. Immunophénotypage médullaire par cytométrie en flux.....	234
Figure 46. Évaluation de l'apoptose précoce spontanée médullaire par cytométrie en flux.....	236
Figure 47. Stratégie de fenêtrage par cytométrie en flux des différentes sous-populations B spléniques et ganglionnaires	237
Figure 48. Immunophénotypage B splénique par cytométrie en flux des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1.....	239

Figure 49. Immunophénotypage B ganglionnaire par cytométrie en flux des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1	240
Figure 50. Immunophénotypage péritonéal par cytométrie en flux.....	241
Figure 51. Taux d'IgG et d'IgM totales sériques par ELISA des souris KI ZAP, de l'ensemble des souris KI ZAP-Mb1 et des sous-groupes SoZAPLow et SoZAPHigh selon l'âge.	246
Figure 52. Taux d'IgG anti-ADNdb, d'IgM anti-ADNdb et de facteur rhumatoïde par ELISA à l'état basal dans le sérum des souris KI ZAP, de l'ensemble des souris KI ZAP-Mb1 et des sous-groupes ZAPLow et ZAPHigh âgées de 6 mois.....	247
Figure 53. Autoréactivités IgG et IgM sériques envers un panel de 93 antigènes...	250
Figure 54. Évolution des taux sanguins périphériques, selon l'âge, des lymphocytes totaux, des polynucléaires neutrophiles, de l'hémoglobine, des plaquettes et de la protéinurie, des souris KI ZAP, KI ZAP-Mb1 et des sous-groupes SoZAPLow et SoZAPHigh.....	252
Figure 55. Modifications de l'autofluorescence de la GFP et de ZAP-70 sous différentes stimulations des LB spléniques triés dans les modèles KI ZAP-Mb1 et KI Trib1-Mb1.....	256
Figure 56. Étude par cytométrie en flux de l'activation des LB spléniques triés stimulés 48h in vitro.....	258
Figure 57. Étude par cytométrie en flux de la prolifération des LB spléniques triés stimulés 90h in vitro.....	259
Figure 58. Dosages sériques par ELISA des IgG et IgM totales dans les surnageants de cultures à 72h de LB spléniques triés.....	261
Figure 59. Différentiation plasmablastique et plasmocytaire après 72h de stimulation de LB spléniques triés	262
Figure 60. Dosages sériques par ELISA des IgG et IgM totales ainsi que des Ig spécifiques anti-OVA après immunisations des souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP par de l'ovalbumine et de l'adjuvant de Freund.	265
Figure 61. ELISPOTs IgG et IgM totales et IgG et IgM anti-ovalbumine à J30 après immunisations des souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP par de l'ovalbumine et de l'adjuvant de Freund.....	265
Figure 62. Dosages sériques par ELISA des IgG et IgM totales ainsi que des Ig spécifiques anti-NP après immunisations des souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP par du NP(0,3)-LPS.	267
Figure 63. ELISPOTs IgG et IgM totales et IgG et IgM anti-NP à J30 après immunisations des souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP par du NP(0,3)-LPS.	267
Figure 64. Étude par cytométrie en flux de la prolifération des LB spléniques in vivo à J30 après immunisations par de l'ovalbumine + adjuvant de Freund ou du NP(0,3)-LPS.....	269
Figure 65. Signalisation calcique BCR-dépendante et sa régulation.....	271
Figure 66. Flux calcique intracellulaire des LB spléniques triés (CD43-) par cytométrie en flux après stimulation du BCR	272
Figure 67. Schéma récapitulatif simplifié des voies de signalisation du BCR étudiées par Western blot dans notre modèle.	273

Figure 68. Statut de phosphorylation des principales protéines impliquées dans la signalisation du BCR à l'état basal et après stimulation du BCR.....	274
Figure 69. Phosphorylation de ZAP-70 après stimulation du BCR.....	275

Liste des abréviations

Ac	anticorps
ACSH	allogreffe de cellules souches hématopoïétiques
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNdb	ADN double brin
AICD	activation-induced cell death
Ag	antigène
AHAI	anémie hémolytique auto-immune
AIG	autoimmune granulocytopenia
AP-1	activator protein 1
APRIL	A proliferation-inducing factor
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messagers
ATM	ataxie telangiectasia-mutated
BAFF	B-cell activating factor
BCR	B cell receptor
BLNK	B-cell linker protein
BSA	bovine serum albumin
BTK	Bruton tyrosine kinase
CAI	cytopénies auto-immunes
c-CBL	casitas B-lineage lymphoma
CCL-IPI Index	Chronic Lymphocytic Leukemia-International Prognostic Index
CDR	complementary-determining region
CENP-A	centromere-associated protein-A

CENP-B	centromere-associated protein-B
CG	centres germinatifs
CIRS	cumulative illness rating scale
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CRKII	CT10 regulator of kinase II
CSH	cellules souches hématopoïétiques
DAG	diacylglycerol
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DGPS	differentially N- glycosylated proteins
DN	double négatifs
DO	densités optiques
DP	double positifs
dsDNA	double strand desoxyribonucleic acid
EDTA	éthylènediaminetétraacétique
FACS	fluorescence activated cell sorting
FISH	fluorescence in situ hybridization
FR	framework region
FS	forward scattering
FVD	fixable viability dye
GEFs	guanine-nucleotide exchange factors
GBM	glomerular basement membrane
GP2	pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein

HRP	horseradish peroxidase
I-A	inter domaine A
I-B	inter domaine B
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule1
IFN- γ	interféron- γ
Ig	immunoglobuline
IGHV	immunoglobulin heavy chain variable region genes
IGLV	immunoglobulin light chain variable region genes
IHC	immunohistochimie
IL	interleukine
IP3	inositol triphosphate
ITAMs	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
KI	knock-in
KIR	killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
KO	knock-out
LAT	linker of Activated T cells
LB	lymphocytes B
LBm	lymphocytes B mémoires
LC1	liver cytosolic proteine 1
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LCM	lymphôme à cellules du manteau
LDH	lactate déshydrogénase
LES	lupus érythémateux systémique
LFA-1	β -2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1
LKM1	liver kidney microsomal type 1
LLC	leucémie lymphoïde chronique

LLC-C	LLC-mutée
LLC-NM	LLC-non mutée
LMNH	lymphome malin non Hodgkinien
LPL-B	leucémie polylmphocytaire à cellules B
LPS	lipopolysaccharide
LT	lymphocytes T
LTh	lymphocyte T helper
LTreg	lymphocyte T régulateur
LZMS	lymphôme de la zone marginale splénique
MAG	myelin-associated glycoprotein
MAIPA	monoclonal antibody immobilization of platelet antigens
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBL	Monoclonal B Lymphocytosis
miARN	microARN
MIF	médianes d'intensité de fluorescence
MMP-9	métalloprotéinase matricielle 9
MO	moelle osseuse
MPO	myéloperoxydase
NCBI	national Center for Biotechnology Information
NCK	non catalytic region of tyrosine kinase
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NF-kB	nuclear factor-kappa B
NFS	numération formule sanguine
NGS	next generation sequencing
NK	Natural Killers
NLC	nurse-like cells
OLS	organes lymphoïdes secondaires

PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed cell death-1
PI3K	phosphoinositide 3-Kinase
PIP2	phospholipides inositols membranaires de type 2
PKC	protéine kinase C
PLC- γ	phospholipase C- γ
PNN	polynucléaires neutrophiles
PR3	protéinase 3
PRCA	pure red cell aplasia
PTI	purpura thrombopénique immunologique
RB	rituximab-bendamustine
RF	reading frame
RFC	rituximab-fludarabine-cyclophosphamide
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
RT-qPCR	reverse transcriptase-quantitative PCR
SCID	severe combined immunodeficiency
SH2	Src Homology 2
slg	surface immunoglobulin
SLL	small lymphocytic lymphoma
SLP-76	SH2 domain containing Leucocyte Protein of 76 kDa
ssDNA	single strand desoxyribonucleic acid
ssRNA	single strand ribonucleic acid
STS	suppressor of T-cell Signalling

SYK	spleen tyrosine kinase
TAC1	transmembrane activator and CAML interactor
TCD	test de Coombs direct
TCR	T cell receptor
TK	tyrosine kinase
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TPO	thyroperoxydase
TTG	tissue tranlutaminase
TZK	troncated KI ZAPnase
WASPp	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
ZAP-70	zeta-associated protein of 70 kDa
ZM	zone marginale

I. INTRODUCTION

A. ZAP-70 : STRUCTURE ET ROLE FONCTIONNEL

1. STRUCTURE

ZAP-70 (ζ chain-associated protein) est une tyrosine kinase cytoplasmique de 70 kDa, décrite pour la première fois en 1991 dans les lymphocytes T (LT) (Chan et al., 1991). Elle appartient à la famille de SYK (spleen tyrosine kinase) avec laquelle elle partage 73 % d'homologie de séquence. A la différence de SYK qui est exprimée par plusieurs types cellulaires hématopoïétiques et impliquée dans différents signal de transduction, notamment du BCR (B cell receptor) (Deng et al., 2016), ZAP-70 est principalement exprimée dans les LT et joue un rôle majeur dans la signalisation du TCR (T cell receptor) (Chan et al., 1991).

ZAP-70 comporte 619 acides aminés encodés par un gène, localisé chez l'Homme sur le chromosome 2 au locus 2q12 (chromosome 1 chez la souris) (Chan et al., 1992). Sa structure est composée de deux domaines SH2 (Src Homology 2) en tandem, séparés par un région nommée inter domaine A (I-A), et d'un domaine kinase en partie C-terminale, séparé des domaines SH2 par une autre région dénommée inter domaine B (I-B). Ces domaines SH2 permettent à ZAP-70 de reconnaître et de lier des ITAMs phosphorylés (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). ZAP-70 possède différents sites de phosphorylation sur des résidus tyrosines : 3 sites en I-B (Y2292, Y315 et Y319) et 2 sites en domaine kinase (Y492 et Y493), ces derniers formant la boucle d'activation (Wang et al., 2010) (Figure 1). Ces sites servent à la régulation de la protéine kinase et à l'interaction avec diverses protéines. Leurs rôles seront détaillés dans les parties suivantes.

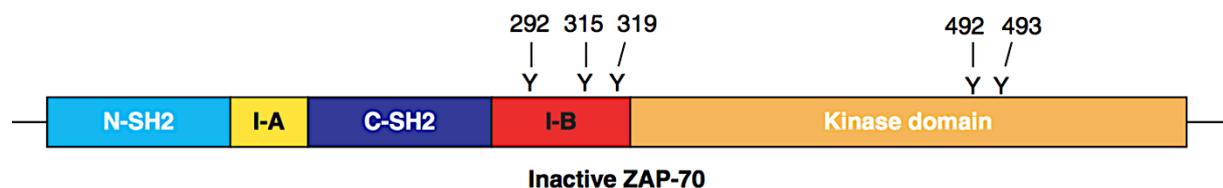


Figure 1. Représentation schématique de ZAP-70 à l'état inactivé (Wang et al., 2010)

Une seule isoforme de ZAP-70 a été décrite, nommée TZK (Truncated KI ZAPnase), dans laquelle les domaines SH2, l'I-A et la partie de l'I-B comportant Y292 sont manquants. Contrairement à ZAP-70, son expression est plus précoce, dès le stade double négatif 1 CD44⁺CD25⁻. Son rôle précis est inconnu mais agirait comme une kinase indépendante du TCR (Kuroyama et al., 2004).

La forte spécificité de liaison de ZAP-70 aux ITAMs doublement phosphorylés est dictée par deux caractéristiques essentielles des domaines SH2. Premièrement, l'I-A adopte une conformation en super-hélice qui rigidifie la mobilité de la molécule et renforce les espaces préférentiels de reconnaissance entre les phosphotyrosines (Ottinger et al., 1998). Deuxièmement, la poche de liaison aux phosphotyrosines est constituée par des résidus provenant à la fois de la partie amino-terminale et carboxy-terminale des domaines SH2, qui sera alors formée nécessairement par la juxtaposition des deux domaines lors de leur liaison aux ITAMs phosphorylés, conférant ainsi une interdépendance entre ces deux domaines et une grande spécificité de liaison (Hatada et al., 1995) (Figure 2. A). La liaison des domaines SH2 de ZAP-70 aux ITAMs entraîne une réduction de la flexibilité de l'I-A et une réorientation majeure des domaines SH2 l'un par rapport à l'autre, modifiant ainsi de façon allostérique l'activité du domaine kinase de ZAP-70 (Deindl et al., 2007, 2007). Ceci est différent de SYK où la poche de liaison aux phosphotyrosines est entièrement comprise dans la portion amino-terminale du domaine SH2, avec une plus grande flexibilité dans l'orientation des deux domaines SH2, suggérant que ses deux domaines peuvent fonctionner indépendamment (Kumaran et al., 2003). Ainsi, ZAP-70 se lie de manière plus spécifique et forte avec ses partenaires comparativement à SYK, mais cette dernière peut interagir avec une plus grande variété d'ITAMs et de partenaires possédant des espaces variables entre les phosphotyrosines (Marczynke et al., 2017).

A l'état basal, ZAP-70 est sous forme auto-inhibée, l'hélice C du domaine kinase étant pivotée vers l'extérieure, ceci permet à la boucle d'activation de bloquer le site actif (Figure 2. B). Cette conformation auto-inhibée est renforcée par des interactions hydrophobiques entre l'I-A et les tyrosines régulatrices Y315 et Y319 de l'I-B, l'ensemble venant se fixer sur la partie arrière du domaine kinase empêchant son activation (Figure 2. C et D) (Yan et al., 2013).

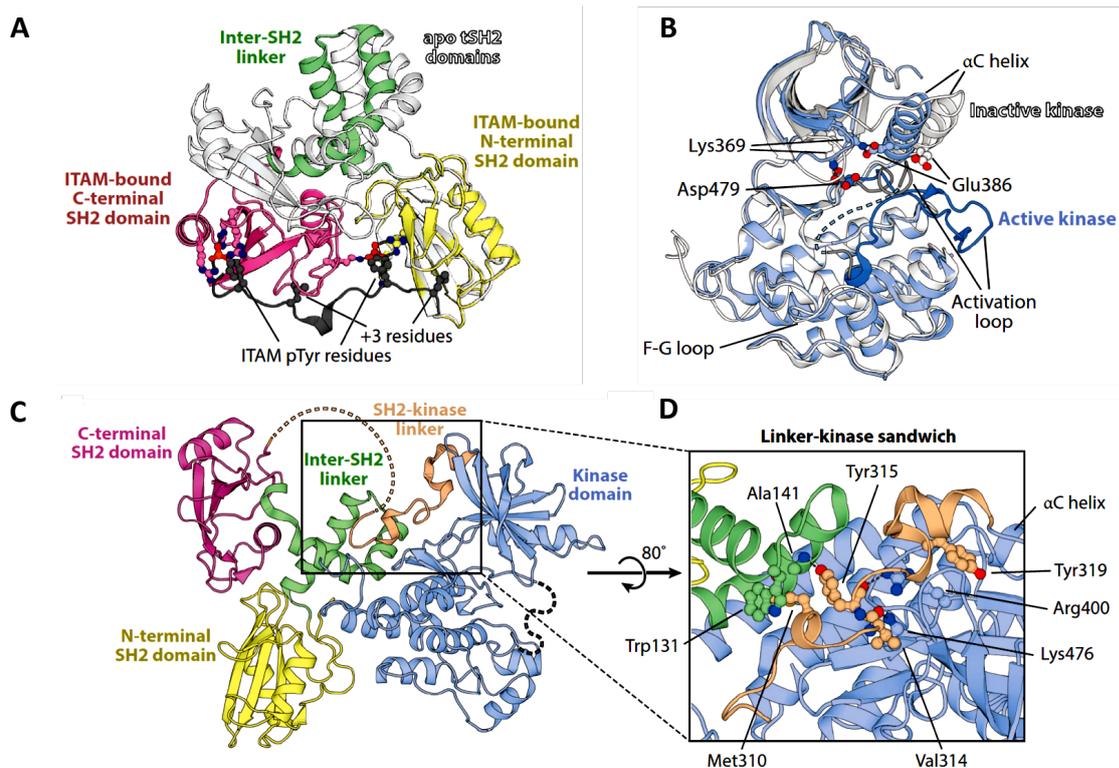


Figure 2. Déterminants structurels de l'activation de ZAP-70 (adapté de Au-Yeung et al., 2017)

- A) Représentation des structures des domaines SH2 de ZAP-70 (blanc) et des sites de liaisons aux ITAMs (rose, vert et jaune)
- B) Représentations des conformations inactive (blanc) et active (bleu) du domaine kinase de ZAP-70
- C) Structure de la forme complète auto-inhibée de ZAP-70
- D) Grossissement des interactions auto-inhibitrices entre les tyrosines régulatrices Y315 et Y319 de l'interdomaine B et le domaine kinase
- ITAM, immunoreceptor-tyrosine-based activation motif

2. ROLES FONCTIONNELS

De par sa place prépondérante dans la signalisation du TCR, ZAP-70 a ainsi un rôle pleïotropique dans les fonctions des LT.

A) ACTIVATION, DIFFERENTIATION ET PROLIFERATION CELLULAIRE T

Lors de l'engagement du TCR, ZAP-70 est recrutée et activée au complexe de signalisation TCR-CD3- ζ , constitué des chaînes ζ , sous forme homodimérique, associées aux hétérodimères CD3 (chaînes $\delta\epsilon$ and $\gamma\epsilon$), dans leur partie transmembranaire, et aux chaînes α et β du TCR (Figure 3. A).

Premièrement, la liaison d'un complexe antigénique/complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) au TCR et au corécepteur CD4 ou C8 selon le type de LT, va entraîner le recrutement de la tyrosine kinase LCK (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) à proximité du complexe de signalisation TCR-CD3- ζ . Cette kinase va ensuite phosphoryler des régions cytoplasmiques spécifiques des chaînes CD3 ϵ , δ , γ et ζ , appelées ITAMs, contenant chacun deux résidus tyrosine (deux motif YXXL/I séparés par six à neuf acides aminés). Ceci va ainsi permettre à ZAP-70 d'être recrutée via ses domaines SH2 qui vont se lier aux ITAMs doublement phosphorylés des chaînes ζ , et ainsi déstabiliser les interactions inhibitrices hydrophobiques entre Y315 et W131, permettant l'accessibilité de Y315 et de Y319 à la phosphorylation par LCK. Par la suite, ZAP-70 phosphoryle différents résidus tyrosines sur deux protéines d'échafaudage clés de l'activation cellulaire T : LAT (Linker of Activated T cells) et SLP-76 (SH2 domain containing Leucocyte Protein of 76kDa) (Figure 3. A). Ces deux protéines n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque mais une fois phosphorylées, vont permettre le recrutement et l'activation de nombreuses autres protéines, dirigeant ainsi l'organisation spatiale de multiples voies de signalisation activatrices médiées par l'interaction du complexe TCR-CD3- ζ -ZAP-70.

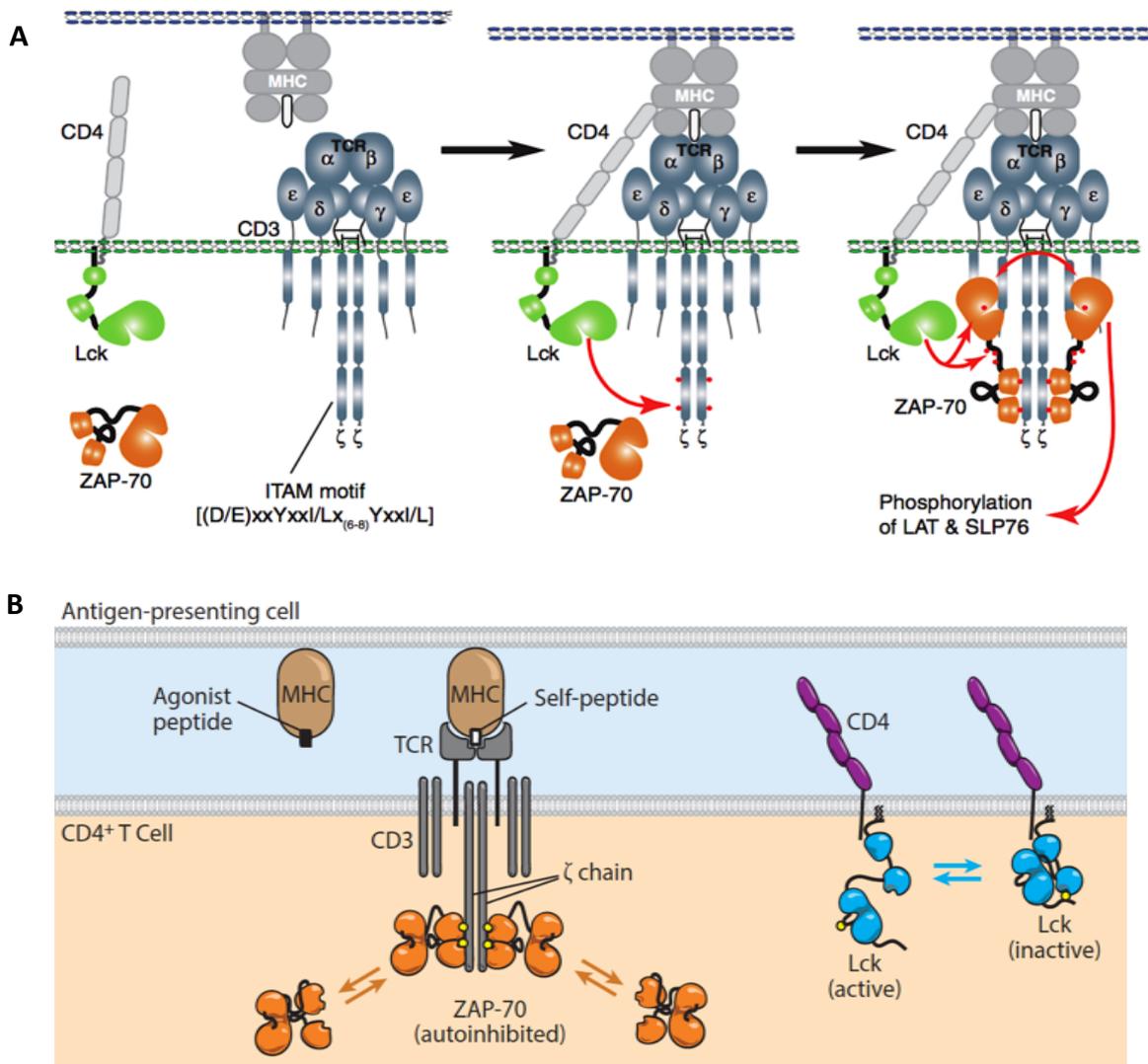


Figure 3. Recrutement et activation de ZAP-70 dans les LT (Wang et al., 2010, 2017)

A) En cas de reconnaissance par le TCR d'Ag exogènes présentés par le CMH II. Le recrutement au complexe du TCR-CD3-ζ du corécepteur CD4 associé à LCK va entrainer phosphorylation des ITAMs de la chaine ζ et ainsi permettre le recrutement de ZAP-70 via ses domaines SH2, et son activation par LCK. Par la suite, ZAP-70 phosphoryle LAT et SLP-76 permettant à leur tour la cascade de signalisation intracellulaire de l'activation des LT médiée par le TCR.

B) En cas de reconnaissance par le TCR d'Ag endogènes présentés par le CMH II, ZAP-70 est recrutée sur les ITAMs de de la chaine ζ mais n'est pas phosphorylé par LCK et reste en conformation d'auto-inhibition partielle.

LCK, Linker of Activated T cells ; SLP-76 (SH2 domain containing Leucocyte Protein of 76kDa ; TCR, T cell receptor, MHC, major histocompatibility complex

Une des principales conséquences de cette signalisation est l'augmentation de la concentration du calcium libre intracellulaire et l'activation des MAPK (Mitogen-activated Protein Kinases) ERK1 et ERK 2 (Meinl et al., 2000), notamment par l'activation de la PLC γ 1.

En addition de LAT et SLP-76, ZAP-70 est aussi capable de phosphoryler directement la protéine MAPK p38 α sur un site régulateur non canonique (Y323) permettant une voie d'activation alternative des MAPK (mitogen-activated protein kinase) dans les LT, indépendante de LAT ou des MAPK kinases (Salvador et al., 2005). De plus, ZAP-70 peut phosphoryler un résidu unique (Y662) de la protéine de surface CD6, permettant un recrutement de SLP-76 indépendamment de LAT (Roncagalli et al., 2014).

Ainsi, ZAP-70 est essentiel à la signalisation précoce du TCR menant à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B), NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) et AP-1 (Activator Protein 1), induisant la transcription de gènes menant au final à l'activation, la prolifération et la différenciation cellulaire T (Au-Yeung et al., 2017). Les données récentes à partir de modèles inhibant l'activité catalytique de ZAP-70 (système ZAP-70 (AS)) suggèrent qu'un seuil intégratif minimal de signalisation médiée par le TCR, ainsi que l'activité kinase de ZAP-70, soit nécessaires pour induire la prolifération des LT (Au-Yeung et al., 2014)

La situation est par contre différente dans le cas de la reconnaissance par le TCR de peptides endogènes. Dans ce cas, il a été montré *in vivo* que la phosphorylation des chaînes ζ n'est que partielle, permettant le recrutement de ZAP-70 mais qui ne sera ni phosphorylée ni activée. L'hypothèse est que le signal médié par la reconnaissance de ces Ag endogène soit trop faible ou trop court pour entraîner une activation de ZAP-70 via sa phosphorylation par LCK (Figure 3. B) (van Oers et al., 1994). Toutefois, ce recrutement semble permettre une pré-sensibilisation du TCR à une activation ultérieure par des Ag exogènes (Stefanová et al., 2002).

B) FOCUS SUR LE ROLE DANS L'ONTOGENIE T

Ainsi, outre son importance dans les fonctions des LT périphériques, ZAP-70 joue aussi un rôle crucial dans l'ontogénie T, intervenant à la fois dans la sélection négative et positive thymique des LT.

Alors que SYK est fortement exprimée durant le l'ontogénie précoce des stades double négatifs (DN) 1-3, l'expression de ZAP-70 est progressive et intervient durant le développement tardif après le stade DN4, avec un chevauchement d'expression durant les stades intermédiaires (DN3-4, et stade immature simple positif (ISP) (Palacios and Weiss, 2007) (Figure 4).

Cette expression progressive est en lien avec une boucle d'amplification dans laquelle le signal du TCR entraîne l'augmentation de l'expression de ZAP-70 qui elle-même favorise la sensibilité du TCR à la stimulation par le CMH (Saini et al., 2010).

Dans des modèles de souris ZAP-70 knock-out (KO), la maturation est bloquée au stade de sélection positive/négative double positif $CD4^+CD8^+$, alors que cela n'est pas observé pour les souris SYK KO (Negishi et al., 1995). D'autre part, aucun blocage de signalisation du pré-TCR n'était observé dans les souris SYK KO ou ZAP-70 KO alors que les souris double KO présentaient un blocage total au stade DN3 suggérant que l'expression simultanée de ZAP-70 et de SYK soit nécessaire pour la signalisation du pré-TCR (Cheng et al., 1997).

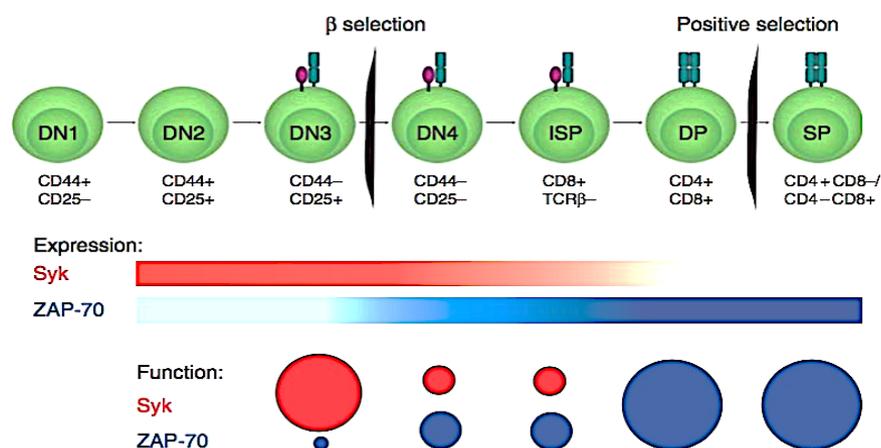


Figure 4. Expression et fonction de ZAP-70 et de SYK dans l'ontogénie T (Wang et al., 2010)

Des données plus récentes ont précisé les rôles respectifs de ces deux kinases en montrant que SYK interviendrait plus précocement en permettant le signal initial du pré-TCR et l'entrée au stade DN3, puis que ce signal serait ensuite progressivement relayé et médié par ZAP-70 pour la progression dans les stades DN4, ISP, DP et SP (Palacios and Weiss, 2007).

La sélection négative et positive thymique des thymocytes est basée sur la signalisation du TCR via l'activité catalytique de ZAP. Toutefois la force du signal seule est insuffisante et nécessite une durée d'action et un effet cumulatif différent selon le type de sélection. Ainsi, dans un modèle inhibant sélectivement et de manière réversible l'activité catalytique de ZAP-70, il a été montré que les thymocytes DP intégraient de multiples et transitoires signaux du TCR médiés par ZAP-70 durant plus de 36h jusqu'à atteindre un seuil critique pour franchir la barrière de la sélection positive, alors que la sélection négative nécessitait seulement 1h de signalisation mais de manière plus intense, reflétée par l'importance des concentrations respectives en calcium libre intracellulaire (Au-Yeung et al., 2014; Melichar et al., 2013).

Une hypothèse avancée pour expliquer le relais de SYK par ZAP dans l'ontogénie T serait que, contrairement à ZAP-70, SYK est capable de phosphoryler des ITAMs même en l'absence d'activité kinase SRC (Rolli et al., 2002). De plus, la phosphorylation des ITAMs de la chaîne ζ par la kinase LCK, elle-même liée aux corécepteur CD4 ou CD8, est un prérequis à l'activation de ZAP-70 (Wang et al., 2010). Or, le recrutement de LCK au complexe du TCR intervient dans la sélection thymique en renforçant la spécificité de reconnaissance du CMH par le TCR (Van Laethem et al., 2013). Ainsi, l'expression de SYK pourrait faciliter la transduction initiale du signal via le pré-TCR en l'absence des corécepteurs CD4/CD8, puis l'expression progressive de ZAP-70 et des corécepteurs CD4 et CD8 liés à LCK favoriserait la signalisation médiée par l'interaction CMH-corécepteur-TCR et le recrutement de LCK pour la phosphorylation des ITAMs de la chaîne ζ et donc la propagation du signal médiée par ZAP-70 (Au-Yeung et al., 2014).

Les mécanismes précis par lesquels ZAP-70 intervient dans la sélection SP CD4⁺ ou SP CD8⁺ sont encore peu clairs à ce jour, mais il semblerait qu'au stade DP, une signalisation à la fois plus forte et continue du TCR via l'activité kinase de ZAP-70 au promoteur favorise une lignée CD4⁺ alors qu'un signal faible ou discontinu, mais plus prolongé, favoriserait la spécification en SP CD8⁺ (Sinclair et al., 2015).

Chez l'Homme, un défaut de fonction de ZAP-70 affecte la maturation T de manière différente de chez la souris. En effet, ce déficit entraîne un phénotype particulier d'immunodéficiência combinée sévère (SCID) dans lequel seuls les LT CD8⁺ sont absents de la médulla thymique et en périphérie, suggérant un blocage spécifique de la sélection des SP CD8⁺ (Arpaia et al., 1994). Toutefois, les CD4⁺ présents en périphérie sont incapables de transduire un signal via leur TCR alors que les CD4⁺ thymiques le peuvent (Gelfand et al., 1995).

Ces différences inter-espèces dans le phénotype associé à un défaut de fonction de ZAP-70 peuvent s'expliquer, du moins en partie, par une expression persistante plus importante de SYK dans les thymocytes tardifs chez l'Homme comparativement à la souris (Chu et al., 1999). Cette expression est par contre très faible en périphérie (Chu et al., 1998). Ainsi, l'expression de SYK pourrait en partie compenser le défaut de ZAP-70 dans les thymocytes SP CD4⁺ des patients SCID mais serait ensuite insuffisante en périphérie (Chu et al., 1999; Gelfand et al., 1995).

C) ROLES NON CANONIQUES

Outre son rôle dans la transmission du signal média par le TCR et l'ontogénie T, ZAP-70 est impliquée dans de nombreuses autres fonctions propres à chaque sous populations matures de LT, dont certaines sont indépendantes de son activité catalytique.

Ainsi, dans les CD8⁺ effecteurs, l'activité kinase de ZAP-70 est essentielle à la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ via l'activation de la voie des calcineurines, mais aussi à l'activité cytolytique (Au-Yeung et al., 2010; Jenkins et al., 2014).

En effet, dans le modèle ZAP-70 (AS), il existait à la fois une altération de la synapse immunologique, un défaut de polymérisation du réseau d'actine et du centrosome entraînant une absence de polarisation des granzymes (Jenkins et al., 2014).

De manière plus large, ZAP-70 est impliquée dans le remodelage du cytosquelette au niveau de la synapse immunologique entre le LT et la cellule présentatrice d'antigène (CPA). En effet, de par l'activation de LAT et SLP-76, ZAP-70 permet ainsi indirectement le recrutement local d'autres protéines adaptatrices NCK (non catalytic region of tyrosine kinase) et WASp (Wiskott-Aldrich Syndrome protein) qui vont alors s'organiser en microtubules riches en actine et permettre de stabiliser l'interaction entre le TCR et la CPA (Wang et al., 2010). De plus, CRKII (CT10 regulator of kinase II), en se liant au résidu Y315 de ZAP-70 phosphorylé par LCK, participe au remodelage du réseau d'actine ainsi aussi à la production d'interleukine-2 (Braiman and Isakov, 2015).

Dans les CD4⁺, la phosphorylation de Y323 de la protéine MAPK p38 α par ZAP-70 est essentielle à la prolifération de ces cellules et à leur différenciation en LT Helper (LTh) 1 ou LTh17. Ceci n'est par contre pas observé pour la lignée LTh2 suggérant une signalisation différente dans la polarisation des différentes sous populations lymphocytaires helper (Jirmanova et al., 2011).

Il a aussi été observé un défaut de production de TNF- α et d'IFN- γ par les LT CD8+ mémoires suite à la stimulation de leur TCR dans les modèle ZAP-70 (AS), indiquant que l'activité catalytique de ZAP-70 est nécessaire à la fonction de ces cellules (Au-Yeung et al., 2010).

ZAP-70 intervient dans l'adhésion cellulaire T, notamment par sa régulation de LFA-1 (β -2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1) qui est la principale intégrine impliquée dans la diapédèse et le recrutement des LT aux sites inflammatoires et aux ganglions lymphatiques. Brièvement, après liaison de LFA-1 à son principal ligand ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule1) à la surface des cellules endothéliales, ZAP-70 et LCK sont recrutées à LFA-1, puis LCK phosphoryle ZAP-70. Ceci permettra, via l'activité catalytique de ZAP-70, d'augmenter l'affinité de LFA-1 pour ICAM-1 (Evans et al., 2011; Hogg et al., 2011). Il a été suggéré que cette adhésion cellulaire médiée par ZAP-70 pourrait être importante pour l'activité suppressive des LT régulateurs (LTreg)

D'autre part, la forte affinité de ses domaines SH2 aux ITAMs permet de stabiliser l'état phosphorylé des chaînes ζ et de les protéger des phosphatases, permettant une signalisation soutenue du signal médié par le TCR (Qian et al., 1996).

ZAP-70 peut aussi servir de protéine adaptatrice. Ainsi, en l'absence d'activité catalytique de ZAP-70, le résidu Y319 reste accessible, permettant sa phosphorylation par LCK ou le recrutement d'autres protéines de signalisation du TCR (Brdicka et al., 2005).

Enfin, ZAP-70, et particulièrement ses résidus Y315 et Y492, ont été impliqués dans les effets non génomiques des glucocorticoïdes dans les LT, incluant l'apoptose, via la phosphorylation de LAT, SLP-76 et l'ubiquitine ligase c-CBL (casitas B-lineage lymphoma) (Boldizsar et al., 2010, 2013).

3. EXPRESSION DANS LES LYMPHOCYTES NATURAL KILLER

Les lymphocytes Natural Killers (NK) expriment à la fois ZAP-70 et SYK. Ces protéines vont lier les ITAMs phosphorylés par des kinases de la famille SRC des portions intracellulaires de la chaîne ζ du CD3 ou de Fc ϵ R1 γ dans le cas d'une signalisation via le CD16 (Fc γ R11A) ou bien de DAP12 dans le cas d'une signalisation via les KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor), menant à l'activation de LAT et de SLP-76 (Lanier, 2008). Toutefois, le rôle de ZAP-70 et de SYK est probablement redondant et non essentiel dans les NK, car leur absence n'altère pas leur développement ni leur activité cytolytique (Colucci et al., 2002; Hesslein et al., 2011).

4. REGULATION

L'activité de ZAP-70 dans les LT et son action sur la signalisation du TCR sont finement régulés, à la fois par le recrutement de ZAP-70 au complexe TCR-CDE- ζ et par ses résidus tyrosines permettant l'interaction avec de nombreuses protéines adaptatrices.

A) REGULATION POSITIVE

A l'état basal, l'état d'auto-inhibition de ZAP-70 ne permet pas la liaison de ses domaines SH2 aux ITAMs phosphorylés. L'engagement de ces derniers résulte en une déstabilisation partielle des interactions auto-inhibitrices, et permet à LCK d'accéder et de phosphoryler les tyrosines régulatrices de l'inter domaine B Y315 et Y319 ainsi que Y493 de la boucle d'activation résultant ainsi en une déstabilisation complète de l'état d'auto-inhibition et à une activation complète de ZAP-70 (Chan et al., 1995; Watts et al., 1994) (Figure 5).

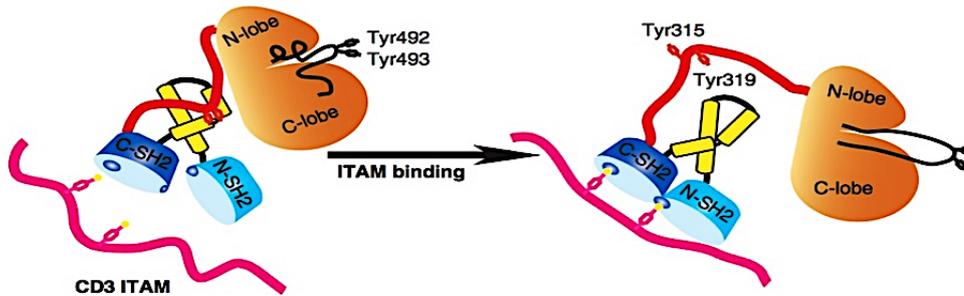


Figure 5. Modèle de l'activation de ZAP-70 après sa liaison aux ITAMs (Wang et al., 2010)

Y319 est un régulateur positif important de la signalisation de ZAP-70. De par sa liaison préférentielle au domaine SH2 de LCK (Pelosi et al., 1999), la phosphorylation de Y319 favorise d'une part la phosphorylation de Y493 par LCK, prévenant ainsi le retour à un état d'auto-inhibition du domaine kinase, et d'autre part facilite l'activation de diverses voies de signalisation d'aval, telles que LAT et SLP-76 (Di Bartolo et al., 1999). De plus, ce résidu intervient dans une boucle de rétrocontrôle positif de LCK en occupant le domaine SH2 de LCK ce qui empêche le site régulateur négatif de LCK pY505 d'interagir avec les domaines SH2 de ZAP-70 et ainsi prévient le retour de LCK au stade inactif (Thill et al., 2016). Ce résidu se lie aussi au domaine SH2 de de la phospholipase C- γ (PLC- γ) et participe ainsi, en complément de LAT et SLP-76, à l'activation du flux calcique intracellulaire mais aussi à la synthèse de l'interleukine (IL)-2 via RAS (Di Bartolo et al., 1999; Williams et al., 1999).

Récemment, il a aussi été montré que la PLC- γ 1 était capable d'activer ZAP-70, dans un boucle de rétrocontrôle positif suite à l'activation du TCR, via la phosphorylation de différents résidus du domaine kinase et de l'inter domaine B (Belmont et al., 2017).

De plus, le résidu Y126 de l'I-A de ZAP-70, une fois phosphorylé, favorise le détachement de ZAP-70 des ITAMs de la chaîne ζ , et ainsi sa mobilité en forme active pour sa recirculation intracytoplasmique et la phosphorylation de diverses molécules à distance, telles que LAT ou SLP-76 LAT plus à distance, constituant ainsi une sorte de boucle d'amplification et de dispersion du signal suite à l'activation du TCR (Katz et al., 2017).

B) REGULATION NEGATIVE

A l'inverse de Y493, la phosphorylation par LCK ou par autophosphorylation du résidu tyrosine Y492 suite à l'engagement du TCR n'est pas indispensable à l'activité kinase complète de ZAP-70, mais a par contre un rôle inhibiteur. En effet, sa mutation en phénylalanine entraîne une augmentation de l'activité kinase de ZAP-70 et est capable de restaurer *in vitro* une signalisation médiée par le récepteur à l'antigène (Chan et al., 1995; Watts et al., 1994).

Le résidu Y292 phosphorylé peut se lier à l'ubiquitine ligase c-CBL E3 (Magnan et al., 2001) et entraîner à la fois une ubiquitinylation de la chaîne ζ (Wang et al., 2001) et une désensibilisation du TCR (Davature et al., 2005). L'importance de cette interaction Y292/CBL a toutefois été remise en question dans un modèle murin transgénique, exprimant une c-CBL incapable de lier Y292, qui ne présentait pas d'altérations significatives de l'expression de ZAP-70 ni de sa fonction (Thien et al., 2003). Plus récemment, il a été montré que ZAP-70 était elle-même poly-ubiquitinylée suite à l'activation du TCR, par une ubiquitine ligase de la famille de CBL (Nrdp1) (Ivanova and Carpino, 2016; Yang et al., 2015).

Y493 peut être la cible d'inhibiteurs de la signalisation du TCR. Ainsi, les protéines de la famille STS (Supressor of T-cell Signalling) et principalement STS-1, entraînent une inhibition de la signalisation du TCR (Mikhailik et al., 2007; San Luis et al., 2011) notamment de par la déphosphorylation du résidu Y493 du domaine catalytique de ZAP-70, sans affecter la quantité totale de la protéine. Ceci était observé à la fois pour une origine Humaine ou murine de STS-1 (Zhou et al., 2017).

Outre la régulation positive du TCR par la liaison Y315/CRKII détaillée précédemment, cette association peut aussi avoir un effet inhibiteur, une possibilité étant via la formation de complexes entre CRK, la sous unité p85 de la PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) et l'ubiquitine ligase CBL E3 (Gelkop et al., 2001).

Enfin, une étude récente souligne le rôle important inhibiteur de l'auto-inhibition de ZAP-70 dans la prévention de l'hyper signalisation du TCR. En effet, un défaut d'auto-inhibition est associée spécifiquement et de manière indépendante du

microenvironnement, à une signalisation basale plus intense et prolongée du TCR et ce dès le stade thymique. Les LT en périphérie sont aussi plus sensibles à la stimulation par le TCR. Toutefois, ces LT développent spécifiquement différents mécanismes de rétrocontrôle négatifs, notamment par l'hyper expression de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 (programmed cell death-1) contribuant à l'anergie de ces cellules (Hsu et al., 2017).

5. SYNTHÈSE

ZAP-70 est une tyrosine kinase cytoplasmique de 70 kDa, principalement exprimée dans les LT, et nécessaire à la signalisation médiée par le TCR, à l'instar de SYK dans les LB. Suite à l'engagement du TCR, ZAP-70 est recrutée au complexe du TCR et phosphorylée, permettant à son tour le recrutement et l'activation de différentes molécules adaptatrices d'aval nécessaires à l'initiation de différentes voies de signalisation canoniques du TCR aboutissant à l'activation, la prolifération et la différenciation cellulaire T.

ZAP-70 joue aussi un rôle précoce important dans l'ontogénie T. En intégrant de manière différentielle les signaux du TCR et en les propageant en aval via activité catalytique, elle permet le franchissement des différents points de contrôle de la sélection négative et positive thymique des LT.

Cette protéine kinase participe aussi à diverses fonctions dans les LT, tels que la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, l'activité cytolytique, le remodelage du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, ou encore la différenciation en Th1 ou Th17.

C'est une protéine complexe dont l'activité est finement régulée, à la fois par son recrutement au complexe TCR-CD3- ζ et par ses résidus tyrosines, permettant l'interaction avec de nombreuses protéines adaptatrices.

B. ZAP-70 ET CARCINOGENESE : LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE

L'expression de ZAP-70 était initialement supposée restreinte aux LT et aux NK (Chan et al., 1992). Mais elle peut être aussi observée dans les lymphocytes B (LB) tumoraux de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) où elle va alors conférer un pronostic oncologique plus défavorable à cette hémopathie (Rassenti et al., 2004). A ce jour, la LLC représente le modèle le plus étudié d'expression anormale de ZAP-70 dans les LB.

1. DEFINITION ET DIAGNOSTICS DIFFERENTIELS

La LLC est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation progressive de LB monoclonaux d'apparence mature principalement dans le sang périphérique, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, et la rate. Son diagnostic nécessite la présence dans le sang périphérique de lymphocytes ≥ 5 G/L ($5000/\text{mm}^3$) avec un phénotype particulier associant notamment l'expression anormale du CD5, et de faibles intensités d'expression du CD20 et de l'immunoglobuline (Ig) monoclonale de surface (sIg) kappa ou lambda : $\text{CD}19^+$, $\text{CD}5^+$, $\text{CD}23^+$, $\text{CD}20^{\text{low}}$, $\text{CD}79\text{b}^{\text{low}}$, sIg^{low} (Hallek et al., 2008).

La LLC atypique est définie par la détection concomitante de pro lymphocytes en proportions variant de 10 à 55 % des lymphocytes totaux périphériques. Un taux > 55 % est alors en faveur du diagnostic de leucémie pro lymphocytaire (Galton et al., 1974), qui est désormais définie comme une entité distincte de la LLC, classiquement $\text{CD}5^-$ (Swerdlow et al., 2016).

Le lymphome lymphocytaire à petites cellules ou SLL (Small Lymphocytic Lymphoma) est une entité très proche de la LLC, ne différant de cette dernière que par une lymphocytose monoclonale B périphérique < 5 G/L. Elle est ainsi considérée comme une forme « tissulaire » de la LLC, son diagnostic nécessitant ainsi la présence

d'adénopathies, d'une splénomégalie et/ou d'autres infiltrats tissulaires présentant les mêmes caractéristiques immunohistologiques que la LLC. Toutefois, les caractéristiques des centres prolifératifs au seins de ces organes permettront peut-être prospectivement de redéfinir plus précisément la frontière entre ces deux entités (voir pour revue Swerdlow et al., 2016).

Une autre entité est la lymphocytose B monoclonale ou MBL (Monoclonal B Lymphocytosis), définie par la présence dans le sang périphérique de LB monoclonaux ≤ 5 G/L de phénotype variable (LLC, LLC atypique ou LB non LLC CD5⁻) en l'absence d'adénopathies, de splénomégalie ou d'autres caractéristiques lymphomateuses. La nouvelle classification de l'Organisation Mondiale de la Santé de 2016 distingue deux sous-groupes au sein des MBL : les « low-count » (LC-MBL) présentant un taux de LB monoclonaux de type LLC $< 0,5$ G/L et les « high-count » (HC-MBL) avec un taux ≥ 5 G/L, basé sur le risque de progression vers une LLC symptomatique, plus élevé dans le groupe HC-MBL (Swerdlow et al., 2016).

2. EPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE

La LLC est la plus fréquente des hémopathies malignes de l'adulte dans les pays occidentaux avec une incidence est globalement la même entre les États-Unis et l'Europe. Les dernières données rétrospectives des registres américains rapportent une incidence globale de 4,4/100 000 personne-année, mais qui augmente progressivement avec l'âge pour atteindre 37/100 000 personne-année après 85 ans. Les patients de plus de 65 ans représentent plus de 70 % des LLC au diagnostic avec une un âge médian de 71 ans. Le pronostic est extrêmement variable, du fait de la grande hétérogénéité de la maladie (sera détaillé en partie B.5), mais la survie globale tout âge et stades confondu à 5 ans était en 2010 de 80,4 % (Howlader et al., 2014).

Les hommes sont plus fréquemment atteints que les femmes avec un sexe ratio de 2:1 qui reste toutefois stable selon l'âge, et sans différence de survie à 5 ans (Howlader et al., 2014).

Une susceptibilité génétique à développer une LLC est supportée par divers arguments. Tout d'abord, de larges études de registres montrent que les apparentés au premier degré des patients atteints de LLC ont un risque relatif (RR) important de développer la pathologie (RR = 8,5 ; intervalle de confiance (IC) à 95 % 6,1-12) (Cerhan and Slager, 2015). De plus, une MBL de phénotype LLC était observée dans 13,5 % des apparentés aux 1^{er} degré de patients LLC, contre 3,5 % dans la population générale appariée par âge (Rawstron et al., 2002).

D'autre part, les taux d'incidence les plus élevés sont observés dans les populations blanches non hispaniques, suivis par noires-américaines, les hispaniques et enfin les plus faibles étant dans les populations asiatiques (Li et al., 2015). Mais il est intéressant de noter que la faible incidence de LLC dans les populations orientales et asiatiques est aussi observée chez les personnes ayant migré en Occident, et persiste même chez leurs descendants de première et de seconde génération (Pan et al., 2002) plaidant pour une composante génétique chez ces patients plus qu'un facteur environnemental.

Le rôle des facteurs environnementaux est plus discuté. Une large étude rétrospective récente rapporte que les métiers agricoles et de coiffure sont des facteurs de risque indépendants de développer une LLC comparativement à la population générale. Inversement, l'exposition au soleil, un terrain atopique et le tabagisme semble avoir un effet protecteur, bien que modeste. Dans cette étude, un antécédent d'infection par le virus de l'hépatite C était aussi un facteur de risque indépendant (Slager et al., 2014), mais ceci est aussi observé dans différentes hémopathies B, notamment les lymphomes malins non Hodgkiniens (Marcucci and Mele, 2011).

3. DIAGNOSTIC

A) MANIFESTATIONS CLINIQUES

La plupart des patients sont totalement asymptomatiques au diagnostic, celui-ci faisant suite le plus souvent à la découverte fortuite d'une hyper lymphocytose à la numération formule sanguine (NFS). Parfois, ce sont l'apparition d'une splénomégalie et/ou d'adénopathies qui guideront alors des explorations complémentaires menant au diagnostic. Les symptômes B (fièvre > 38°C depuis au moins deux semaines sans preuve infectieuse et/ou amaigrissement involontaire d'au moins 10 % du poids dans les six derniers mois et/ou sueurs nocturnes depuis plus d'un mois sans preuve infectieuse) sont rarement présents dans la LLC et sont alors plutôt en faveur d'une transformation en lymphome B diffus à grandes cellules (syndrome de Richter) compliquant 2-3 % des LLC.

A un stade avancé de la maladie, différents symptômes révélateurs de complications mais aspécifiques, peuvent apparaître, tels qu'une asthénie et une fatigabilité à l'effort (en lien avec une anémie), ou plus rarement des pétéchies ou signes hémorragiques en cas de thrombopénie < 20-30 G/L, et/ou de thrombopathie marquée.

Des infections récurrentes peuvent aussi être un mode de révélation tardif de la LLC par déficit immunitaire secondaire humoral et/ou cellulaire (Morrison, 2010; Scarfò et al., 2016).

Les manifestations cutanées primitives de la LLC sont rares. Elles sont plutôt observées lors de l'évolution ou de complications de la maladie. Ainsi, les atteintes cutanées primitives de la LLC touchent principalement la tête et le cou, sous forme de papules et/ou de plaques érythémateuses chroniques récidivantes. L'histologie montre le plus souvent un infiltrat lymphocytaire monomorphe nodulaire à renforcement péri-annexiel et péri vasculaire, avec une immunohistochimie (IHC) confirmant l'origine monoclonale B de phénotype LLC (Plaza et al., 2009).

B) DONNEES BIOLOGIQUES

Dans sa définition, la LLC requière la présence dans le sang périphérique d'une hyper lymphocytose > 5 G/L. Au frottis sanguin, les lymphocytes apparaissent d'allure mature mais plus petits, avec un cytoplasme fin et une chromatine condensée. Du fait leur plus grande fragilité membranaire, ces cellules peuvent subir des cassures ou éclater, prenant alors l'aspect d'ombres nucléaires (« smudge cells » ou encore « Gumprecht shadows ») (Matutes and Polliack, 2000).

Le diagnostic de LLC est posé par l'immunophénotypage en cytométrie en flux. Ceci permettra tout d'abord de confirmer le caractère monoclonal B de la lymphocytose périphérique, en montrant une restriction de la chaîne légère (kappa ou lambda). Ces LB, outre leur expression classique du cluster de différenciation B CD19, sont classiquement négatifs pour FMC7 et CD79b, et expriment faiblement CD20 et les immunoglobulines de surface (IgM et/ou IgD principalement, plus rarement IgG ou IgA). Ces LB expriment aussi anormalement CD5 et C23. Plus récemment, la forte expression d'un autre marqueur T (CD200) dans la LLC semblent aussi participer au diagnostic différentiel avec les lymphomes à cellules du manteau (Fan et al., 2015). Ces paramètres sont aussi importants pour le diagnostic différentiel avec d'autres hémopathies B (Tableau 1) (Scarfò et al., 2016).

Tableau 1. Immunophénotype de la LLC et d'autres lymphoproliférations B malignes (adapté de (Scarfò et al., 2016)

Marqueur	1 point	0 point
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
CD79b ou CD22	Faible expression	Forte expression
FMC7	Négatif	Positif
SIg	Faible expression	Forte expression

De plus, un score diagnostique de la LLC a été établi par Matutes et al. en 1994, basé sur l'expression et/ou l'intensité d'expression par les LB de différents marqueurs : CD5, CD23, CD79b, FMC7 et slg (Matutes et al., 1994). Ce score a été optimisé en 1997 en remplaçant l'expression de CD79b par celle de CD22, permettant une augmentation de la sensibilité de 91,8 % à 96,6 % (Moreau et al., 1997) (Tableau 2). Ainsi, un score ≥ 4 (sur 5 maximum possible), est requis pour le diagnostic de LLC. Moins de 5 % des LLC ont un score de Matutes égal à 3 et un score < 3 exclue le diagnostic de LLC. (Matutes et al., 1994; Moreau et al., 1997).

Tableau 2. Score phénotypique de Matutes (optimisé avec l'utilisation du CD22 en lieu et place du CD79b) (Matutes et al., 1994; Moreau et al., 1997).

MARQUEUR	LLC	LCM	LZMS	LPL-B
CD19	+	+	+	+
CD5	+	+	+/-	+/-
CD20	Diminué	+	+	+
CD23	+	-	+/-	-
FMC7	-	+	+/-	+
CHAINE LÉGÈRE	Diminuée	Forte	Forte	Forte
CHAINE LOURDE	IgM/IgD	IgM/IgD	IgM/IgD	IgM/IgD
CD200	+	-	+/-	+/-

Un score ≥ 4 est requis pour le diagnostic de LLC. Un score < 3 élimine le diagnostic de LLC.
 SIg : immunoglobuline de surface ; LLC : leucémie lymphoïde chronique ; LCM : lymphôme à cellules du manteau ; LZMS : lymphôme de la zone marginale splénique ; LPL-B : leucémie prolymphocytaire à cellules B

Les analyses histologiques ne sont pas indispensables au diagnostic, car l'immunophénotypage typique peut être effectué sur les lymphocytes du sang périphérique. L'analyse médullaire (par myélogramme ou biopsie osseuse) montre dans la plupart des cas une infiltration lymphoïde > 30 % qui, selon son organisation, pouvait aider au pronostic avant l'ère des marqueurs moléculaires : infiltrat nodulaire (favorable), interstitiel (intermédiaire) ou diffus défavorable) (Hallek et al., 2008). Cet examen peut aussi aider au diagnostic différentiel des cytopénies (anémie, thrombopénie) qui peuvent être liées ou non à un infiltrat médullaire par la LLC. L'analyse histologique ganglionnaire montre classiquement un effacement de l'architecture classique, avec peu de centres germinatifs, et une caractéristique de la LLC nommée les centres prolifératifs. Ces derniers sont constitués majoritairement de zones claires comportant des cellules de moyenne et grande taille (pro lymphocytes et para-immunoblastes respectivement), entrecoupées de zones plus sombres contenant des cellules plus petites (Figure 6) (Ponzoni et al., 2011).

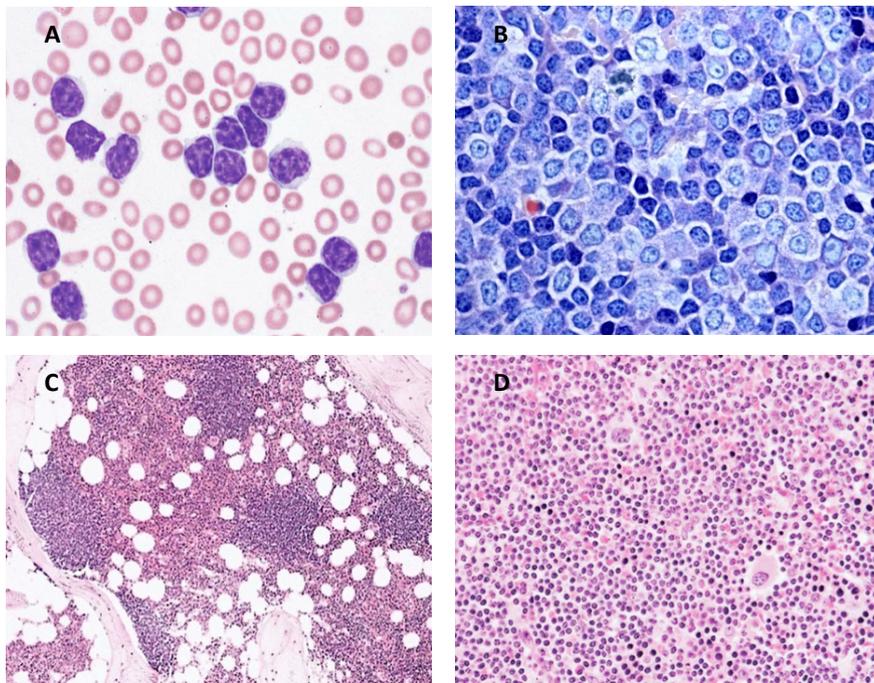


Figure 6. Caractéristiques microscopiques de la LLC.

- A) Frottis sanguin montrant des lymphocytes de LLC typique, petits, avec chromatine dense et cytoplasme fin.
 B) Cytologie ganglionnaire montrant un centre prolifératif avec petites cellules (bleu clair), prolymphocytes et para-immunoblastes (bleu foncé)
 C et D) Cytologies médullaires montrant un infiltrat lymphoïde nodulo-interstitiel (C) et diffus (D)
 (<https://basicmedicalkey.com/b-cell-neoplasms/> [consulté le 09-08-2017])

4. PATHOGENIE

Certains patients vont présenter une LLC évolutive nécessitant des thérapeutiques relativement peu de temps après son diagnostic, alors que d'autres vont au contraire avoir une pathologie indolente, ne nécessitant pas de traitement pendant de nombreuses années.

Cette grande variabilité clinique de la LLC est le reflet de son hétérogénéité moléculaire. La pathogénie de la LLC est en effet très complexe, multifactorielle et encore imparfaitement connue à ce jour (résumé simplifié en Figure 11 en fin de chapitre).

Les progrès scientifiques apportent régulièrement de nouvelles pistes physiopathologiques pouvant être la cible de thérapeutiques ciblées à l'avenir.

Toutefois, à ce jour des incertitudes persistent encore, notamment concernant l'origine cellulaire exacte des cellules de LLC, de même que les antigènes impliqués dans la sélection de ces cellules.

A) ORIGINE CELLULAIRE DES LB TUMORAUX

Au fil des progrès scientifiques, différents types cellulaires ont été évoqués comme pouvant être à l'origine des LB de LLC, dont le phénotype CD19⁺CD5⁺CD23⁺sIg^{low} diffère clairement de l'ensemble des sous-population lymphocytaires B normales.

Chez les patients atteints de LLC, les gènes codant pour la région variable de la chaîne lourde de l'Ig membranaire (IGHVs) sont non mutés dans approximativement 50 % des cas (LLC-NM).

Les patients avec LLC-NM présentent classiquement une évolution plus agressive comparativement aux patients LLC avec mutation des IGHVs (LLC-M). Ceci

suggère que les deux groupes de LB de LLC, mutés ou non mutés, proviennent de populations cellulaires distinctes et/ou avec des profils de différenciation et de sélection antigéniques différentes.

D'autre part, les profils d'expression génique de ces deux groupes de LLC se sont révélés similaires, arguant pour une origine cellulaire unique.

(1) LES LB « MEMOIRES »

Les études initiales des profils d'expression géniques montraient que les LLC-M et les LLC-UM étaient similaires aux LB mémoires (LBm) CD27⁺, suggérant que les deux groupes de LLC dérivait de LB ayant reconnu un ou plusieurs antigènes communs (Klein et al., 2001).

Les LLC-M pourraient ainsi être similaires à des LBm « classiques », générés suite à la rencontre avec leur(s) antigène(s) soit dans les centres germinatifs (CG) soit en dehors, puisque des LBm non switchés IgM⁺IgD⁺CD27⁺ peuvent être post-CG (Seifert and Kuppers, 2009).

Une hypothèse concernant les LLC-NM serait des « LBm-like » qui, durant leur maturation, n'auraient pas subi de réarrangement de leur BCR malgré une stimulation antigénique répétée (Chiorazzi and Ferrarini, 2010).

La stéréotypie récurrente du répertoire du BCR dans la LLC est aussi en faveur de l'hypothèse d'une sélection antigénique commune (Murray et al., 2008).

(2) LES LB DE LA ZONE MARGINALE

Afin de concilier les hypothèses d'une origine cellulaire unique ou de deux populations différentes, un modèle a été proposé dans lequel les LLC-M et les LLC-NM dérivait des LB de la zone marginale (ZM).

En effet, ces derniers sont capables de répondre à la fois aux antigènes T-dépendant et T-indépendants, et peuvent exprimer un BCR muté ou non.

Toutefois, le principal argument contre cette hypothèse est que le phénotype de ces cellules ($IgM^{high}CD5^{-}CD23^{-}$) est différent de celui de la LLC ($IgM^{low}CD5^{+}CD23^{+}$), bien que CD5 et CD23 puissent être secondairement exprimés suite à une stimulation antigénique (voir pour revue Chiorazzi and Ferrarini, 2010).

(3) LES LB CD5⁺ OU LB1A HUMAINS

Chez l'Homme, une sous population de LB, les LB1, a été assez récemment identifiée. Elle comporte les LB1a ($CD5^{+}$) et les LB1b ($CD5^{-}$). Les LB1a se développent en premier, quasi-exclusivement au cours de la période néonatale, puis persistent à de faibles taux uniquement par auto-renouvellement périphérique. Ces cellules produisent la majorité des auto-IgM sériques naturelles polys spécifiques et participent à l'immunité innée.

Les LB1b ne diffèrent des LB1a que de par leur absence d'expression du CD5, leur recrutement dans la protection contre certains parasites et bactéries et de par la possibilité substantielle de renouvellement médullaire en addition à leur autorenouvellement périphérique.

Les LB2 apparaissent plus tardivement, à la fin de la période néonatale, et représentent la population nettement majoritaire de LB se développant dans la MO adulte (Herzenberg and Tung, 2006).

Les LB1 sont d'un intérêt particulier car initialement, l'origine cellulaire de la LLC était supposée être les LB matures $CD5^{+}$ du fait de leur expression invariable du CD5, de leur tendance spontanée à proliférer de façon oligoclonale chez la souris, de leur capacité d'autorenouvellement et de leur production spontanée d'anticorps auto réactifs (Zenz et al., 2010).

Les arguments en défaveur de cette hypothèse étaient que près de 50 % des LLC ont des IGHVs mutées alors que les LB $CD5^{+}$, étant pré-CG, ne sont pas mutées

(Fischer et al., 1997), et que le marqueur CD5 n'est pas stable, pouvant être induit suite à l'activation des LB (Zupo et al., 1994).

Toutefois, des données plus récentes ont apporté de nouveaux arguments forts en faveur des LB CD5⁺ comme population originelle de la LLC. Chez l'Homme, les LB matures CD5⁺ sont CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻ et partagent les trois fonctions fondamentales des LB1 murins : la sécrétion spontanée d'IgM, la capacité de stimuler les LT et une signalisation intracellulaire constitutive à l'état basal (tonic signaling) (Griffin et al., 2011). Ces LB1a humains sont fortement similaires aux LB LLC car ces deux populations sont CD5⁺CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻, expriment ZAP-70 et ont un statut IGHV non muté (Griffin et al., 2011). De plus, une étude transcriptomique a comparé les LB de LLC à des LB de patients sains de type matures naïfs, ZM splénique, CD5⁺ matures, switchés et mémoires non switchés (IgM⁺) (Seifert et al., 2012). La résultante était que les LB LLC ont un profil d'expression génique très similaire à celui des LB CD5⁺. Ces mêmes auteurs ont aussi défini une nouvelle sous population distincte de LBm CD27⁺CD5⁺ présentant des mutations somatiques post-CG (attestées par des mutations de *BCL6* (Pasqualucci et al., 1998)).

Au final, les analyses mutationnelles des IGHVs ont montré que les LLC-NM dérivait des LB matures CD5⁺CD27⁻ non mutés alors que les LLC-M dérivait des LB CD5⁺CD27⁺ post-CG avec mutation de leur IGHVs (Seifert et al., 2012).

(4) LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES

La LLC est actuellement toujours classée comme une hémopathie des cellules B matures (Hallek et al., 2008; Swerdlow et al., 2016). Toutefois, des données récentes de xénogreffes où des cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34⁺CD38⁻ médullaires purifiés issus de patients atteints de LLC (CSH-LLC) ont été transplantés chez des souris immunodéficientes, semblent suggérer que les CSH pourraient être des réservoirs de cellules précancéreuses impliquées dans le développement de la LLC (Kikushige et al., 2011).

En effet, comme pour ce qui est observé chez les patients atteints de LLC, il a été observé chez ces souris une proportion de proB significativement plus importante comparativement aux souris transplantées avec des CSH de donneurs sains. De plus, les CSH-LLC produisaient significativement plus de LB périphériques comportant des LB CD5⁺ en quantité importante, suggérant que leur développement était switché vers un profil lymphoïde.

Enfin, ces LB matures présentaient des réarrangements mono ou oligoclonaux de leurs IGHVs. Ces réarrangements étaient différents de celui du clone de LLC initial correspondant, probablement en lien avec la sélection par des (auto)antigènes différents entre l'Homme et la souris.

B) LA MBL PRECURSEUR DE LA LLC ?

Une MBL de phénotype LLC est identifiée dans 13,5 % des apparentés aux 1^{er} degré de patients LLC, contre 3,5 % dans la population générale appariée par âge (Rawstron et al., 2002).

La MBL, outre le fait de partager le même phénotype que la LLC, présente parfois des anomalies chromosomiques similaires suggérant que la MBL représenterait une forme précoce de LLC, ou un stade pré-LLC pouvant évoluer en cette dernière.

Toutefois, seul environ 1 % par an des patients avec MBL développeront une LLC ou un lymphome, des modifications génétiques et épigénétiques additionnelles étant nécessaires pour que la MBL devienne une LLC (Rawstron et al., 2008). Inversement, la quasi-totalité des patients avec LLC présentent préalablement une MBL (Landgren et al., 2009; (Zhang and Kipps, 2014a).

C) STEREOTYPIE DU BCR ET SELECTION(S) ANTIGENIQUE(S)

L'immunité adaptative B nécessite la génération de LB extrêmement variés, chaque clone exprimant un type de BCR à sa surface, capable de reconnaître spécifiquement un Ag donné. La probabilité que deux clones B indépendants expriment exactement le même BCR est extrêmement faible ($< 10^{-12}$). Cependant, dans la LLC, les LB isolés à partir de différents patients expriment très souvent un BCR très similaire voire identique. On parle alors de stéréotypie du BCR, qui est caractérisée par l'utilisation des mêmes segments de gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères de l'Ig de surface, ainsi qu'une homologie de séquence de la CDR3 (complementary-determining region-3) de la chaîne lourde (HCDR3) (Messmer, 2004).

Chez l'Homme (ainsi que chez la souris), les différents VH dérivent tous de trois gènes précurseurs distincts et sont ainsi regroupés en trois classes selon leur origine phylogénétique (Kirkham et al., 1992). A ce jour, les différentes stéréotypies sont classées en sous-groupes, basés sur les critères suivants : i) utilisation des mêmes séquences germinales des gènes V/D/J ; ii) utilisation du même cadre de lecture pour HCDR3 ; iii) même longueur de HCDR3 et iv) homologie d'acides aminés $\geq 50\%$ et $\geq 70\%$ de similitudes de leurs propriétés physico-chimiques (Agathangelidis et al., 2012). Selon cette classification, l'analyse de plus de 7 500 séquences d'IGHV provenant de patients LLC a montré une stéréotypie du BCR dans environ 30 % de ces séquences, les 70 % restant comprenant les cas sans ou avec une faible similarité du BCR. De plus, parmi les BCR stéréotypés, 100 sous-groupes ont été identifiés, chacun défini par un motif HCDR3 unique dont 19 considérés comme majeurs. Ces derniers représentaient 41 % de l'ensemble des cas de stéréotypie et 12,4 % de toutes les LLC analysées, ce qui signifie factuellement que 1 patient sur 8 exprime la même HCDR3, comparativement à la probabilité de 10^{-12} dans la population générale.

D'autre part, outre cette utilisation préférentielle de certains IGHVs dans la LLC, la fréquence des hypermutations somatiques n'est pas uniforme selon les IGHVs, avec notamment IGHV1-69 présentant peu ou pas de mutations, à la différence des IGHV3-7, IGHV3-23 et IGHV4-34 par exemple (Fais et al., 1998). Cette restriction marquée dans le répertoire génétique de l'Ig de surface dans les cas de LLC, pourtant sans lien

de parenté et géographiquement distincts, n'est pas observée dans d'autres hémopathies B. Ceci suggère le rôle d'un nombre limité d'antigènes dans la sélection des LB LLC. Ceux-ci peuvent être des Ag du soi, exprimés par les cellules en apoptose, dont les protéines du cytosquelette et plus spécifiquement la myosine (Chu et al., 2008; Lanemo Myhrinder et al., 2008), ou encore la fraction constante des IgG (FcIgG) conférant alors au BCR une activité facteur rhumatoïde (IGHV4-59/IGKV3-20) (Kostareli et al., 2012). D'autres BCR avec d'autres stéréotypies vont différemment reconnaître des Ag microbiens (Landgren et al., 2007), viraux (Steininger et al., 2012), ou encore parasitaires (Hoogeboom et al., 2013).

D) SIGNALISATION MEDIATEE PAR LE BCR

De manière générale, les interactions Ag-BCR activent différentes voies de signalisation intracellulaires et facteurs de transcription déterminant la prolifération et la différenciation des LB.

Schématiquement, dans les LB normaux, la signalisation via le BCR intervient via différentes voies, notamment à travers la PLC- γ 2, la PI3K et la BTK (Bruton tyrosine kinase). L'activation du BCR permet le recrutement des protéines kinases FYN et LYN de la famille SRC, qui vont ensuite phosphoryler les ITAMs des protéines accessoires CD79a et CD79b du complexe du BCR. Ceci permettra alors la fixation et l'activation d'une autre protéine kinase SYK, qui à son tour phosphorylera et activera la protéine d'échafaudage BLNK (B-cell linker protein) qui elle-même recrutera BTK et PLC- γ 2 via ses domaines d'homologie SH2. Une fois le complexe SYK/BTK/BLNK/ PLC- γ 2 formé, PLC- γ 2 va être phosphorylée par BTK et SYK et cliver ensuite les phospholipides inositols membranaires PIP2 en IP3 (inositol triphosphate) et en DAG (diacylglycerol).

IP3 va entraîner un influx calcique intracellulaire provenant du réticulum endoplasmique et du compartiment extra cellulaire. Ceci va permettre l'activation de diverses enzymes calcium dépendantes, dont la phosphatase calcineurine qui, à son tour va activer et permettre la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT

DAG va, en association avec le calcium intracellulaire, activer la PKC (protéine kinase C), qui va notamment à son tour activer et permettre la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B

Suite à l'activation du BCR, la sous unité p85 de la PI3K est recrutée à la membrane où elle s'associe à LYN et FYN. De plus, LYN phosphoryle CD19 permettant sa liaison à p85 et d'activer l'autre sous unité p110 δ . La PI3K complète va alors phosphoryler PIP2 en PIP3 permettant d'activer à son tour la voie AKT/mTOR aboutissant in fine à l'activation de NF- κ B.

Enfin, une autre voie majeure est initiée par les GEFs (guanine-nucleotide exchange factors) qui, suite à l'activation du BCR vont être recrutées aux complexes et vont activer les membres de la superfamille des GFTPases RAS. Ces derniers vont en retour déclencher l'activation de la cascade des MAPK/ERK, migrant dans le noyau et activant FOS, un des composant du facteur de transcription de AP-1.

En condition physiologiques, une hyperactivation du BCR est contrôlée par divers régulateurs négatifs du BCR, tels que SHIP, inhibant notamment PI3K et SYK.

Dans la LLC, la signalisation médiée par le BCR joue un rôle crucial dans sa pathogénie (Figure 7. A) et est partiellement différente de celle dans les LB normaux, caractérisée notamment par une faible expression d'Ig de surface ainsi que du CD79b, mais une augmentation de l'expression des kinases de la famille SRC et de l'activité de la PI3K (Tableau 3).

ZAP-70 est une protéine kinase jouant un rôle crucial dans la signalisation du BCR dans la LLC. Son expression (normalement restreinte aux LT et NK) est corrélée au statut non muté des IGHVs et s'observe dans environ 50 % des cas de LLC, les LLC-NM (Rosenwald et al., 2001). Cette expression confère à la maladie un pronostic défavorable en termes de survie globale, de temps sans progression et sans traitements (Crespo et al., 2003; Rassenti et al., 2004). Son rôle dans la signalisation du BCR est complexe mais cruciale dans la pathogénie de la maladie et dans l'explication du différentiel d'évolution entre les LLC-M et les LLC-NM.

Tableau 3. Signalisation du BCR dans les LB LLC comparativement aux LB normaux (Woyach et al., 2012).

Characteristic	CLL cells
slg expression	Low
CD79b expression	Low
Response to antigen stimulation	Variable
Syk/Lyn/Btk expression	Elevated
PI3K p110 δ expression	Normal
PI3K kinase activity	Elevated
Calcium flux	Variable/generally low

Les études *in vitro* sur les LB LLC ZAP-70⁺ ont montré une augmentation de la signalisation intracellulaire médiée suite à l'activation du BCR. En effet, dans ces cellules, la phosphorylation de SYK (Tyr 72), de BLNK, de la PLC- γ de même que le flux calcique intracellulaire, étaient augmentés comparativement aux LB LLC ZAP-70⁻ (Chen et al., 2002). De plus, l'introduction de ZAP-70 dans les LB LLC par vecteur viral (adénovirus) résulte en une activation plus importante des voies de signalisation du BCR (SYK, BLNK, PLC- γ) (Chen, 2005).

Cependant, la façon dont ZAP-70 influence la signalisation du BCR reste incertaine. ZAP-70 a une activité kinase intrinsèque 100 fois plus faible que SYK *in vitro* (Latour et al., 1996) et est exprimé à un niveau plus faible que SYK dans la majorité des LLC ZAP⁺ (Laurenti et al., 2005). De plus, des LB LLC ZAP-70⁻ transfectés avec un variant muté de ZAP-70 ne possédant plus d'activité kinase présentaient, après stimulation du BCR, des niveaux de phosphorylation des voies d'aval du BCR et un flux calcique identiques aux LB CLL ZAP-70⁺, et supérieur aux LB CLL ZAP-70⁻. Cette réponse était par contre inhibée dans le cas de la délétion d'un des 2 domaines SH2 (Chen et al., 2008).

D'autre part, à la différence des LT, la stimulation du BCR dans les LB CLL ZAP⁺ n'induit pas de phosphorylation des résidus Tyr 319 et Tyr 493, impliqués dans l'activité catalytique de ZAP (Gobessi et al., 2007).

Enfin, la phosphorylation conservée de ZAP-70 en Tyr 292, suite à l'activation du BCR, pourrait entraîner une compétition avec p72Syk pour sa liaison à c-Cbl, et ainsi empêcher la dégradation de SYK par le protéasome (Gobessi et al., 2007).

Toutefois, la mutation du site de liaison de ZAP-70 à c-Cbl n'altérerait pas l'augmentation du signal médié par le BCR dans les LB LLC transfectés (Chen et al., 2008).

Au final, la fonctionnalité de ZAP-70 dans les LB LLC reste peu claire mais semble très différente de celle dans les LT. Ainsi, l'augmentation du signal médié par le BCR dans les LB LLC ZAP-70⁺ est indépendante de l'activité kinase catalytique de ZAP-70 et de sa liaison à c-Cbl, mais nécessite la fonctionnalité des 2 domaines SH2 pour le recrutement des molécules de la voie de signalisation du BCR. ZAP-70 semble donc être plutôt une molécule adaptatrice qui entraîne une signalisation chronique et accrue du BCR dans les LB tumoraux et favorise la prolifération clonale, participant ainsi au pronostic défavorable des LLC-NM.

Les LB LLC stimulés via leur BCR sont capables d'hyper sécréter les chémokines CCL3 et CCL4, permettant notamment le recrutement dans le microenvironnement de divers composants cellulaires et notamment les LT régulateurs, et favorisant ainsi leur survie et la croissance tumorale via des phénomènes de tolérisation locaux (Zhang and Kipps, 2014a).

CD38, un autre marqueur phénotypique pronostique péjoratif de la LLC, en se liant à CD31, présent à la surface de nombreux types cellulaires du microenvironnement, est capable d'activer ZAP-70 et les voies des MAPK/ERK et d'augmenter ainsi indirectement la signalisation du BCR et la prolifération des LB LLC (Zhang and Kipps, 2014a).

CD44, le récepteur à l'acide hyaluronique, est aussi exprimé à la surface des LB LLC. Il a été récemment identifié un complexe multiprotéique impliquant CD38, ZAP-70, CD49d, CD44 et MMP-9 dans les LLC ZAP-70⁺, suggérant le rôle indirect de CD44 dans l'hyperactivation du BCR et pourrait aussi faciliter l'invasion, la migration et le homing de ces cellules (Zhang and Kipps, 2014a).

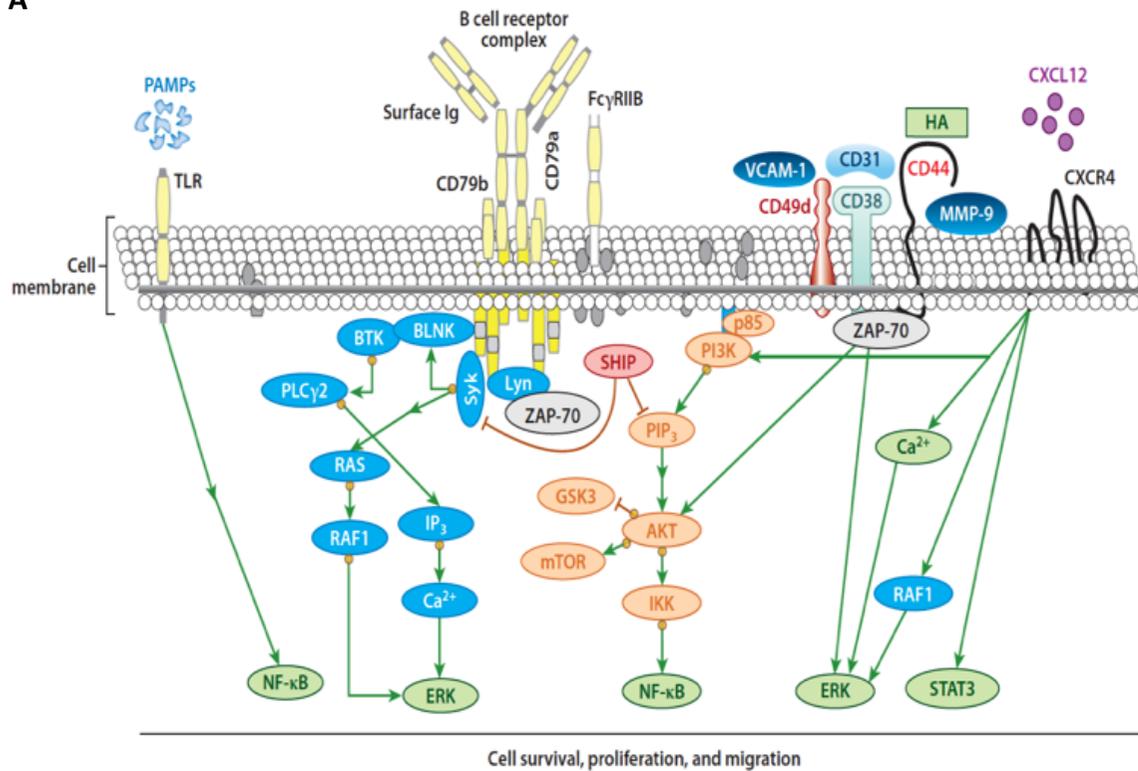
Les études d'expression géniques des LB LLC ont montré que, en parallèle de la signalisation via le BCR, les TLRs (Toll-like receptors), suite à leur stimulation par divers stimuli exogènes, sont aussi capables d'amplifier la voie NF- κ B, déjà constitutionnellement activée dans la LLC et contribuer à la survie et la prolifération clonale (Herishanu et al., 2011). Ceci a été renforcé par les données d'un modèle murin de LLC KO pour TIR8, un récepteur inhibiteur des TLRs, chez lequel a été constaté une progression de la LLC après stimulation par des agonistes des TLRs (Bertilaccio et al., 2011).

Les analyses fonctionnelles ont démontré que l'activation des TLRs dans la LLC entraîne principalement : i) une hyperactivation via l'expression forte des molécules de costimulation CD25 et/ou CD86 ii) une prolifération cellulaire accrue via l'hyperexpression des miARN221/222 (micro-Acide ribonucléique), qui vont bloquer l'action de la protéine inhibitrice d'entrée en cycle cellulaire p27 ; et iii) une chimiorésistance via l'expression de mi155-3p et de lymphotoxine- α . Toutefois, les réponses aux stimulations des TLRs sont très hétérogènes selon les types de LLC, notamment entre les LLC-M et les LLC-NM, ces dernières présentant principalement une évolution proliférative et anti-apoptotique, avec des effets opposés pour les LLC-NM, sans différence pour les niveaux d'expression des TLRs à la surface cellulaire entre ces deux groupes (voir pour revue Ntoufa et al., 2016).

Récemment, l'expression de ZAP-70 a été proposée comme le mécanisme permettant d'expliquer, du moins en partie, cette dichotomie de réponse aux stimuli des TLRs et notamment au CpG. En effet, l'expression de ZAP-70 et sa phosphorylation sont associées à une prolifération accrue et à un effet anti-apoptotique sous stimulation par CpG, avec même un effet discriminant supérieur à celui du statut mutationnel. Ces effets sont liés à l'inhibition de la protéine pro-apoptotique Bim dans les LB LLC ZAP-70⁺, ainsi qu'à l'activation complète de SYK (phosphorylation des domaines SH2 et du domaine kinase) par ZAP-70 entraînant la sécrétion d'une IgM soluble agissant de manière autocrine en stimulant continuellement le BCR (Figure 7. B).

Là encore, ZAP-70 semble jouer un rôle de protéine adaptatrice, mais en permettant cette fois-ci un lien mécanistique entre l'immunité innée (TLRs) et adaptative (BCR), impliqués dans la pathogénie de la LLC (Wagner et al., 2016).

A



B

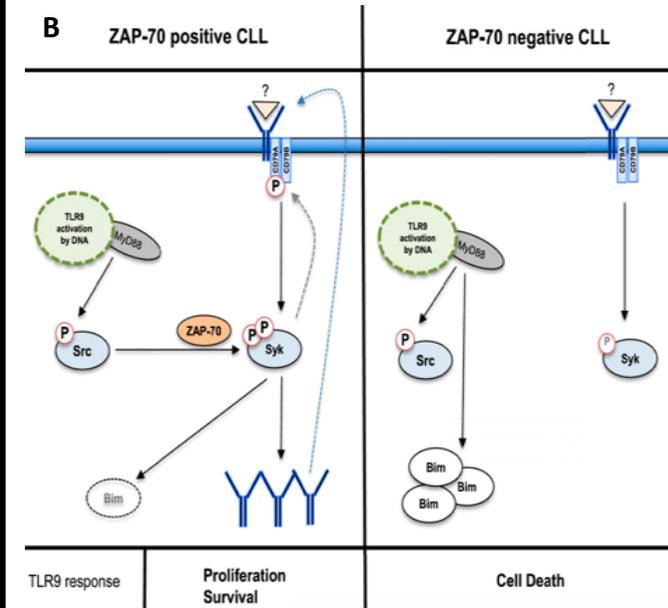


Figure 7. Représentation schématique de la signalisation dans la LLC (Zhang and Kipps, 2014, Wagner et al., 2016).

A) Signalisation médiée par le BCR et interactions avec les voies médiées par les autres récepteurs membranaires

B) Modèle proposé pour l'interaction entre la signalisation médiée par TLR9 et celle du BCR dans la LLC ZAP-70⁺.

GSK, glycogène synthase kinase; HA, acide hyaluronique; IKK, inhibiteur de κB kinase; IP₃, inositol triphosphate; PAMP, pathogène-associé moléculaire; PIP₃, phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate; PLC, phospholipase C; SHIP, SH2-contenant inositol phosphatase; VCAM, molécule d'adhésion cellulaire vasculaire

E) MICROENVIRONNEMENT

Le microenvironnement est important dans les pathologies cancéreuses en général, en fournissant aux cellules tumorales des sites (niches) privilégiés où celles-ci peuvent plus facilement échapper au système immunitaire et recevoir des signaux de survie et de prolifération. Le microenvironnement semble particulièrement riche et son rôle crucial dans le développement de la LLC, où la moelle osseuse (MO) et les organes lymphoïdes secondaires (OLS) constituent les sites privilégiés des LB tumoraux.

Les principaux éléments du microenvironnement dans la LLC sont les « nurse-like cells » (NLC), provenant de la différenciation de monocytes en présence de LB LLC, les cellules stromales mésenchymateuses et les LT (Figure 8) (voir pour revue Choi et al., 2016).

Ces éléments, et particulièrement les NLC, sécrètent diverses chimiokines qui, en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques fortement exprimés à la surface des LB LLC dans le sang périphérique (notamment CXCR4 et CXCR5), vont entraîner le recrutement de ces cellules au sein du microenvironnement de la MO et des OLS. En retour, les LB leucémiques vont sécréter des chimiokines telles que CCL3, CCL4, CCL17, CCL22, IL-4, et IL-8 permettant de recruter au sein du microenvironnement des monocytes ou d'autres lymphocytes. Le rôle des intégrines, et particulièrement de la sous unité CD49d, surexprimée à la surface des LB LLC, joue un rôle crucial dans l'adhésion et le franchissement de la barrière endothéliale.

Le microenvironnement est capable d'activer diverses voies de signalisation intracellulaires, complémentaires de celles médiées par le BCR, favorisant *in situ* la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ainsi, par la sécrétion de BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (A proliferation-inducing factor), les NLC induisent des signaux de survie aux LB LLC via leurs fixation aux récepteurs TACI (transmembrane activator and CAML interactor), BAFF-R et BCMA, en entraînant l'expression des gènes anti-apoptotiques *BCL2*, *SURVIVIN*, *BCL2A1* et *XIAP*. Les NLC, via la sécrétion de HMGB1 (high mobility group box 1) et sa fixation sur le récepteur RAGE-TLR9

(receptor for advanced glycation end-product - toll like receptor 9) sont aussi capables d'induire la différenciation des LB LLC. L'expression de CD31 par les NLC représente un ligand pour les LB LLC CD38⁺ menant à la phosphorylation de ZAP-70 et à un hypersignal du BCR.

Le rôle des cellules stromales mésenchymateuses est similaire à celui des NLC, de par leur sécrétion constitutive de facteurs chimio-attractants, ou encore d'interactions directes cellule-cellule induisant notamment l'expression de CD38 et de ZAP-70 impliqués dans la survie et la prolifération tumorale. Dans la MO, ces cellules peuvent sécréter Wnt5a qui, en se fixant sur ROR1 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1) à la surface des LB leucémiques, va favoriser la survie de ces cellules.

Les LT participent à la stimulation des LB LLC via l'interaction CD40/CD40L. Dans les centres prolifératifs, les LT CD4⁺ activés sont colocalisés avec les LB LLC CD38⁺Ki67⁺ suggérant que cette sous population de LT favorise l'expansion du clone tumoral au sein du microenvironnement (Patten et al., 2008). D'autre part, cette interaction chronique induit spécifiquement l'expression des marqueurs CD244, CD160, et PD1 ainsi que de BLIMP1, entraînant une réduction de leur cytotoxicité, de la synthèse de granzyme, de leur migration mais aussi une altération de la synapse immunologique. Des phénomènes de tolérance locaux interviennent aussi dans le microenvironnement de la LLC avec l'expression précoce de CTLA-4 par ces LT et l'augmentation du nombre de LT régulateurs CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺.

D'autres types cellulaires impliqués dans le microenvironnement de la LLC ont été plus récemment caractérisés : i) les cellules NK qui présentent une inhibition de leur activité cytotoxique par les LB LLC, associée à un pronostic plus défavorable de la LLC ; ii) les cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde (MDSC) en présence de LB LLC qui sont capables d'inhiber les fonctions LT du microenvironnement et d'induire la différenciation en LT régulateurs et iii) les cellules dendritiques folliculaires qui, via leur interaction avec CD44, sont capables d'induire l'expression de protéines anti-apoptotiques et participent à la formation du complexe multiprotéique CD44/CD38/ZAP-70/CD49d/MMP-9 facilitant la transmission de signaux de survie provenant du microenvironnement (Redondo-Muñoz et al., 2010).

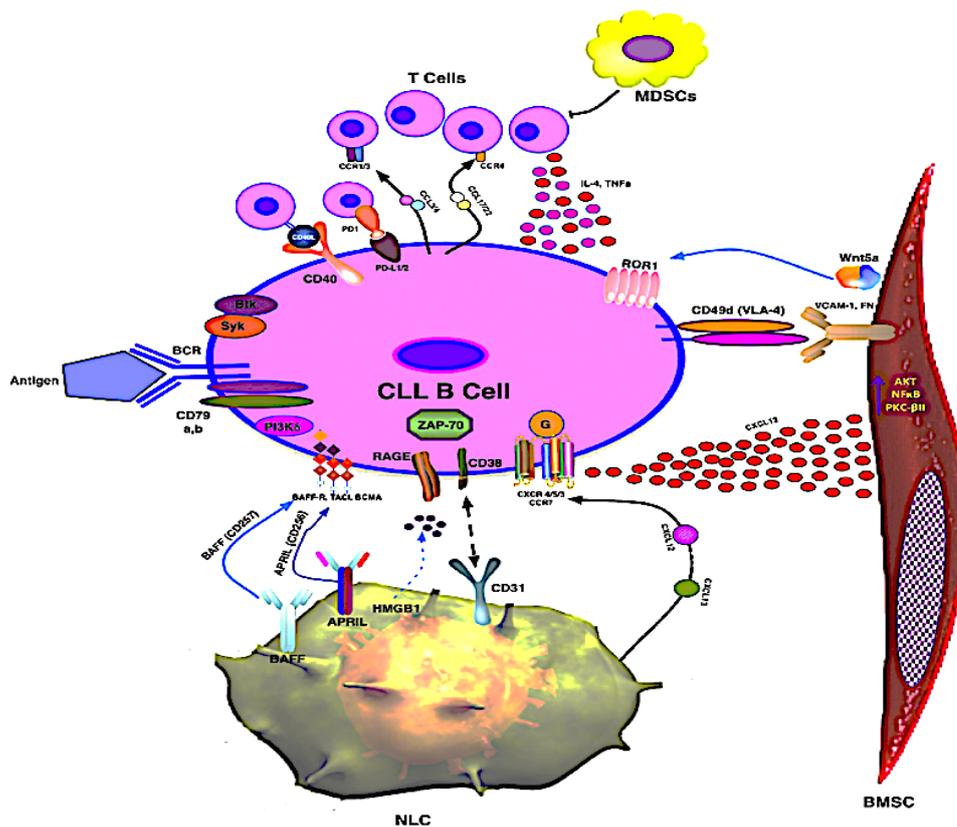


Figure 8. Modalités d'interaction entre les LB LLC et le microenvironnement (Choi et al., 2016).

F) ANOMALIES GENETIQUES

Les techniques de FISH (fluorescence in situ hybridization) plus récemment de séquençage haut débit par NGS (next generation sequencing) ont permis respectivement la mise en évidence de diverses aberrations chromosomiques et de mutations géniques dans la LLC, impliquées dans la pathogénie de la LLC et représentant des facteurs pronostiques très importants à ce jour.

(1) ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

La délétion 13q14 représente le plus fréquente des anomalies cytogénétiques isolée de la LLC, observée dans environ 55 % des cas (Hallek, 2017). Elle est associée à une forme bénigne de la maladie (Hallek, 2017). Cette délétion est associée à l'absence de synthèse des miARNs 15a et 16-1 dont les gènes sont précisément localisés dans la région 13q14 (Calin et al., 2005). Des modèles murins KO out pour ces miARNs ont développé des lymphoproliférations B parfois malignes, suggérant leur rôle dans le développement de la LLC (Klein et al., 2010).

Les délétions 11q sont observée dans 10 % des cas de LLC aux stades précoces et comportent fréquemment la délétion 11q23 qui inclue le gène *ATM* (ataxia telangiectasia-mutated) codant pour la protéine kinase correspondante impliquée la réparation des cassures double-brins de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Hallek, 2017). *ATM* active les points de contrôle du cycle cellulaire, induit l'apoptose en réponse aux cassures de l'ADN, et agit directement au niveau des cassures doubles brins en maintenant les extrémités au sein de complexes de réparation. Son déficit est associé à la survenue de la maladie orpheline Ataxie-télangiectasie qui, outre le déficit immunitaire sévère et l'ataxie cérébelleuse progressive qu'elle entraîne, est caractérisée par une instabilité génomique avec sensibilité aux radiations et une prédisposition aux cancers notamment aux hémopathies lymphoïdes (Lavin, 2008). Dans la LLC, sa délétion est associée à des adénopathies massives, une progression plus rapide de la LL et une réduction de la survie globale (Döhner et al., 1997)

La trisomie 12 est observé dans 10-20 % des LLC mais sa physiopathologie reste peu connue à ce jour (Hallek, 2017). Bien que sa présence semble conférer une durée d'initiation de traitement plus courte, ces patients ont une bonne sensibilité aux traitements et une survie globale comparable aux patients sans anomalies caryotypiques (Hallek et al., 2010).

Enfin, la délétions 17p13, observée dans 5-8 % des LLC, implique le gène suppresseur de tumeur *TP53* (codant pour la protéine p53) et est associée dans plus de 80 % des cas à une mutation de ce gène sur l'allèle restante (Hallek, 2017). Ces patients présentent principalement une chimiorésistance marquée et des rechutes précoces (Zenz et al., 2010b).

(2) MUTATIONS GENIQUES

Outre les anomalies chromosomiques détaillées précédemment, les techniques de NGS ont permis l'identification de 44 gènes porteurs de mutations, impliqués dans la synthèse et l'export des ARN, l'activité de MYC, la signalisation des MAPK et la réparation des dommages de l'ADN (Landau et al., 2015). Les principales mutations sont détaillées ci-dessous.

Les mutations de *TP53*, observées dans 4-37 % des LLC, sont principalement de type faux sens (70 %), suivies par les micro-délétions/insertions (20 %) et les mutations non-sens (4 %). La protéine p53 joue un rôle essentiel dans l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux lésions de l'ADN. Ces anomalies constituent des facteurs indépendants de mauvais pronostic avec une réduction de la survie globale et une moindre réponse aux chimiothérapies (Zenz and Stilgenbauer, 2009; Zenz et al., 2010b).

Les mutations activatrices de *NOTCH1*, qui code pour un facteur de transcription régulant la croissance cellulaire, confèrent aux LB LLC une résistance accrue aux signaux pro-apoptotiques (Rosati et al., 2009). Elles sont observées dans 4-10 % des LLC au diagnostic et jusqu'à 30 % des LLC en rechute ou réfractaires. Leur présence est associée au statut non muté des IGHV, à l'expression de ZAP-

70/CD38 et sont un facteur de risque indépendant de réduction de la survie globale et du temps de progression de la LLC (Oscier et al., 2013). De plus, ces patients répondent moins bien aux anti-CD20, du moins partiellement en lien avec sa dysrégulation épigénétique médiée par les mutations NOTCH1 (Pozzo et al., 2016; Stilgenbauer et al., 2014).

Les mutations inactivatrices du gène *BIRC3* s'observent dans moins de 5 % des LLC et entraînent une activation constitutive de la voie alternative de NF-κB. Ce gène est en interrelation étroite avec ATM dans la physiopathologie et le pronostic de la LLC du fait de leur écholocalisation avec ATM sur le bras long du chromosome 11. Le pronostic de ces patients semble similaire à celui de ceux avec mutations de TP53 (Rossi et al., 2012a) mais les interactions et rôles pronostiques respectifs des mutations *BIRC3* et ATM nécessitent d'être précisés par des études complémentaires.

Les mutations de *SF3B1* ont quant à elle été rapportées dans 9 % des cas de LLC. Ce gène code pour une sous unité protéique du spliceosome impliquant dans l'épissage des gènes contrôlant le cycle cellulaire et l'apoptose. Les patients porteurs de ces mutations présentent une moins bonne sensibilité aux traitements, une progression plus rapide de leur LLC et une survie globale réduite (Quesada et al., 2011).

(3) EPIGENETIQUE

En association aux altérations génétiques, les modifications épigénétiques contribuent à la pathogénie de la LLC. Elles incluent les modifications des histones, les altérations de méthylation de l'ADN, et les miARN, agissant le plus souvent de manière combinée sur les éléments régulateurs (activateurs ou inhibiteurs) de l'expression génique (promoteurs, enhanceurs, etc...).

Une hypométhylation globale de différents éléments régulateurs de l'ADN est associée à une forte activation de ces derniers et à la carcinogénèse en général, de par l'hyper expression d'oncogènes, l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur ou encore par instabilité de la chromatine (Madakashira and Sadler, 2017).

Dans la LLC, les niveaux d'expression de ZAP-70 sont corrélés au degré de méthylation de îlots CpG spécifiques du gène (Claus et al., 2014). Les profils de méthylation sont toutefois très hétérogènes selon les patients, et le degré d'hétérogénéité est corrélé au statut mutationnel des IGHVs et a une valeur pronostique indépendante (Landau et al., 2014). De plus, l'évolution de la méthylation de l'ADN au cours du temps chez les patients LLC est associée à un haut degré d'hétérogénéité de méthylation dès les stades précoces, ainsi qu'à la présence de mutations génétiques dans les sous clones tumoraux (Oakes et al., 2014).

Une forte hétérogénéité de méthylation localisée favorise le développement de sous clones tumoraux avec des profils génétiques différents, d'autant plus que ces désordres de méthylation sont préférentiellement observés dans les cellules souches. Ainsi, l'hétérogénéité de méthylation dans la LLC peut, en association avec les altérations chromosomiques et les mutations génétiques, contribuer à l'évolution clonale.

Les miARNs sont de petits brins d'ARN non codants de 18-23 nucléotides qui ont la capacité de moduler l'expression de gènes en se liant aux régions 3' non traduites des ARN messagers (mARNs) cibles, inhibant ainsi leur traduction ou favorisant leur dégradation.

De nombreux miARNs différents ont été décrits dans la LLC, ciblant différents gènes impliqués dans sa pathogénie tels que ZAP-70, BCL-2, TP53, NF- κ B, ou PI3K/AKT (Figure 9) (voir pour revue (Mirzaei et al., 2018).

Un étude récente *in vitro* a aussi montré une interaction entre miARN, ZAP-70 et microenvironnement, ce dernier pouvant induire une hyper-expression du miARN-21 via la signalisation de MAPK et STAT3 médiée par ZAP-70 dans les LB LLC, entraînant une inhibition de différents gènes suppresseurs et une survie de ces cellules (Carabia et al., 2017).

Les miARNs pourraient être utilisés dans un futur proche en pratique clinique comme biomarqueurs pronostiques alternatifs car leurs niveaux d'expression est corrélé aux marqueurs pronostiques classiques tels que l'expression de ZAP-70 ou le statut mutationnel des IGHVs (Calin et al., 2005)

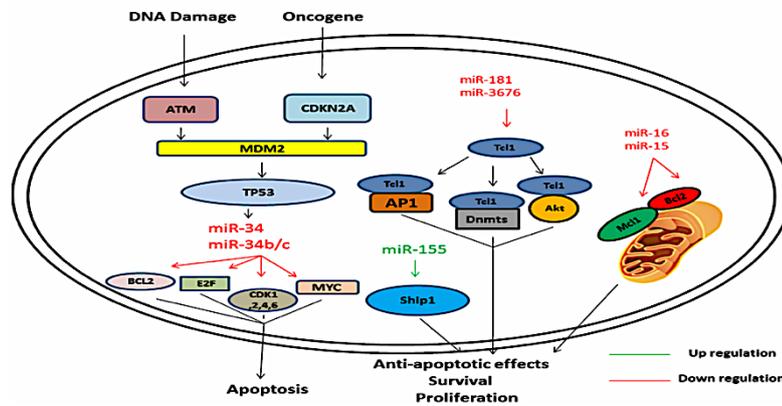


Figure 9. Cibles moléculaires et conséquences des principaux miARNs dans la LLC (Mirzaei et al., 2018)

(4) EVOLUTION CLONALE

La quasi-totalité des LLC sont précédées d'une MBL comportant peu d'altérations génétiques comparativement aux clones de LLC. Ceci suggère que l'évolution clonale de la MBL vers LLC s'accompagne d'une accumulation progressive d'altérations génétiques (Puente et al., 2015).

Les séquençages d'exomes de LLC ont récemment montré une grande hétérogénéité intra clonale avec la présence de multiples sous populations clonales génétiquement différentes et différant aussi de par leur évolution au fil de la maladie.

Ainsi, les variations du nombre de copies, telles que del13q, del11q ou la trisomie 12, sont considérées comme des événements clonaux précoces, intervenant dans la transformation néoplasique et l'expansion clonale, alors que les mutations de ATM, BIRC3 ou TP53 correspondent à des événements génétiques sous-clonaux plus

tardifs ou « second hit » (Landau et al., 2013, 2015). De plus, la présence de différents sous clones avec mutations clonales est un facteur prédictif indépendant de mauvais pronostic de la LLC (Landau et al., 2013).

La diversification clonale peut résulter d'effets synergiques de troubles de la méthylation de l'ADN et d'altérations génétiques, associés à des pressions micro-environnementales et/ou thérapeutiques.

Une forte diversité clonale peut entraîner l'émergence de sous clones entrant en compétition avec le clone prédominant et être responsable d'une forme plus agressive/chimio-résistante (Figure 10) (Guièze and Wu, 2015).

Ainsi, il est crucial d'identifier au diagnostic les profils de méthylation et la présence de mutations responsables de progression clonale et/ou de résistances aux traitements dans les sous clones de LLC.

Toutefois, il existe une compétition évolutive entre les divers clones, chacun porteur de mutations génétiques différentes, des mutations dans le même gène pouvant être sélectionnées chez un patient et contre sélectionnée chez un autre, rendant difficile l'estimation pronostique de chaque mutation. La seule exception concerne les clones porteurs des mutations de TP53 dont le nombre augmente constamment lors des récurrence de la LLC (Landau et al., 2013; Ojha et al., 2015).

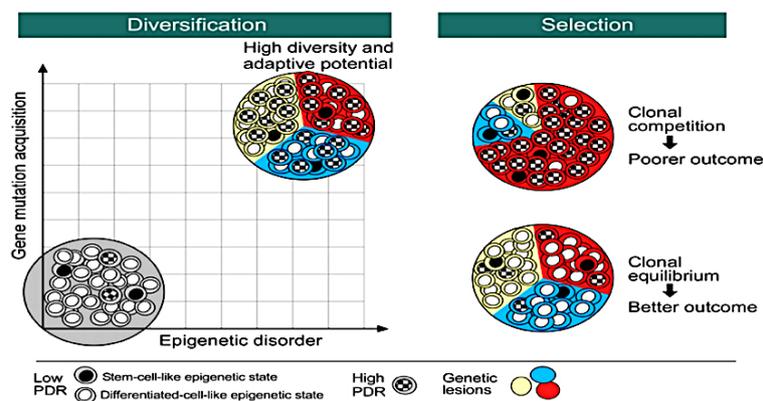
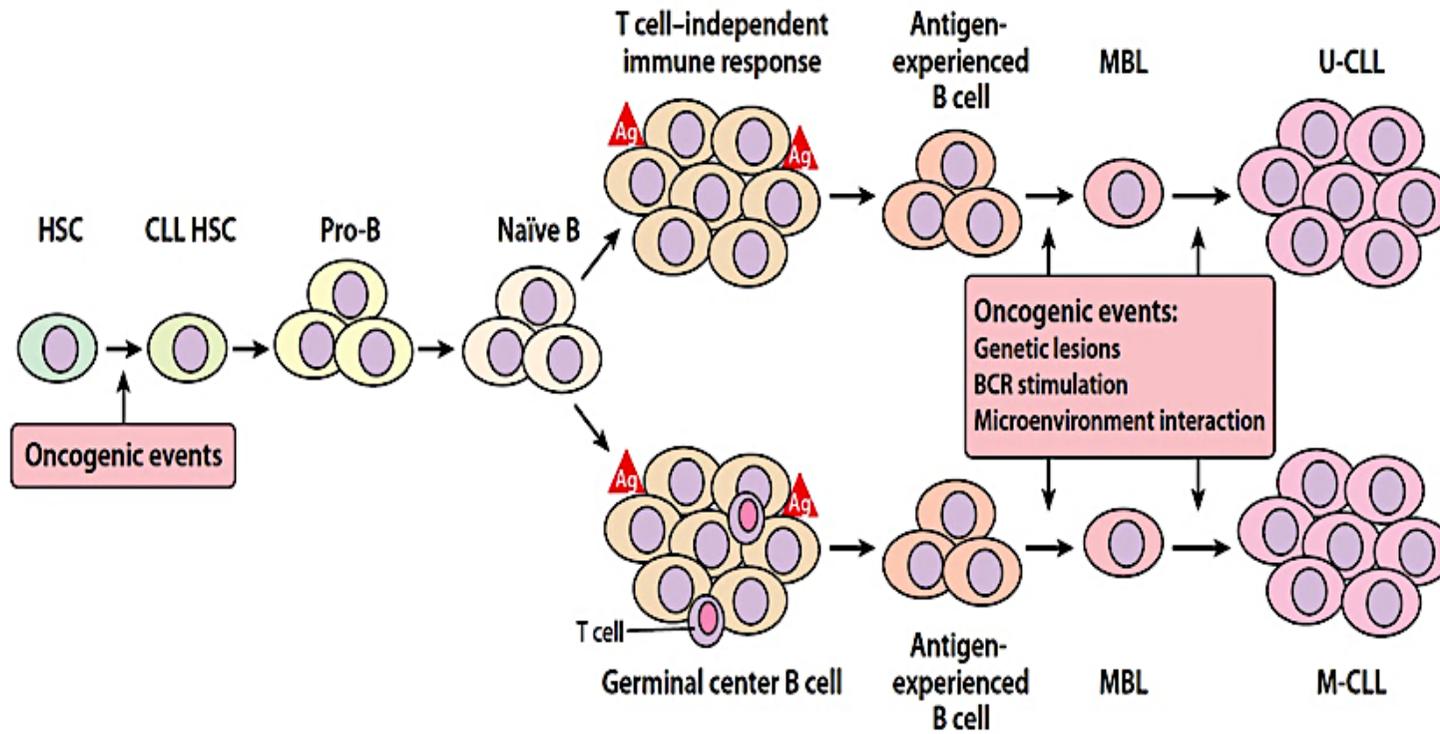


Figure 10. Évolution clonale dans la LLC (Guièze and Wu, 2015).

La diversification clonale peut résulter d'effets synergiques des troubles de la méthylation de l'ADN et de mutations génétiques acquises (gauche). La sélection clonale, liée à une pression microenvironnementale et/ou thérapeutique conditionne la composition sous clonale, variant d'un équilibre à une compétition entre les différents sous clones, cette dernière situation étant associée à une évolution péjorative de la LLC (droite). PDR, proportion of discordant reads = nombre de CpGs discordants/nombre total de CpGs d'un ensemble consensus de 63 443 (Landau et al., 2013).

Figure 11. Modèle pour le développement de la LLC (Zhang and Kipps, 2014).

HSC : hematopoietic stem cells ; CLL HSC : chronic lymphocytic leukemia-like hematopoietic stem cells ; MBL : monoclonal B lymphocytosis ; U-CLL : unmutated chronic lymphocytic leukemia ; M-CLL : mutated chronic lymphocytic leukemia ; Ag : antigen ; BCR : B cell receptor



5. CLASSIFICATION ET FACTEURS PRONOSTIQUES

La LLC est une pathologie avec une évolution et un pronostic très hétérogènes, les médianes de survies pouvant varier de quelques mois à plusieurs décennies. Ainsi, il est indispensable d'identifier précocement et facilement les patients les plus à risque de progression rapide de la maladie nécessitant une intervention thérapeutique rapide.

Globalement, environ 1/3 des patients ne nécessitent qu'un suivi clinique régulier sans instauration de traitement spécifique, 1/3 présentent une forme agressive de LLC, nécessitant un traitement dès ou rapidement après le diagnostic, en lien avec des cytopénies et/ou la présence de volumineuses adénopathies ou d'organomégalies, et le derniers tiers présentent des formes intermédiaires avec l'apparition de symptômes en lien avec la LLC et nécessitant l'instauration de traitements spécifiques à des temps très variables par rapport au diagnostic de LLC.

De nombreux marqueurs pronostiques existent dans la LLC afin de classer les patients atteints de LLC selon leur risque de progression de la maladie. Un tableau résumé de ces facteurs est proposé dans le tableau 7 en fin de chapitre.

On peut ainsi distinguer les marqueurs « traditionnels » basés sur la clinique et des examens de laboratoire de routine, et les « nouveaux marqueurs », abordant l'aspect moléculaire de la LLC.

De même, il existe différents score pronostiques utilisables en pratique clinique, intégrant des paramètres cliniques, biologiques et génétiques.

A) MARQUEURS TRADITIONNELS

Le premier marqueur pronostique publié et validé a été le système de classification de Rai en 1975, décrivant cinq principaux groupes pronostiques selon la présence ou non d'adénopathies et/ou d'hépatosplénomégalie, et de cytopénies (anémie et/ou thrombopénie). (Rai et al., 1975). Il a été modifié en 1987 en 3 groupes de risque (Rai, 1987): faible, intermédiaire et élevé (Tableau 4).

Tableau 4. Système de classification pronostique de Rai (Rai et al., 1975 ; Rai, 1987)

Stade	Description	Médiane de survie (mois)	Risque (Rai modifié)
0	Lymphocytose périphérique et infiltrat médullaire > 30 %	> 150	Faible
I	Stade 0 avec adénopathie(s)	101	Intermédiaire
II	Stade 0-I avec splénomégalie et/ou hépatomégalie	71	
III	Stade 0-II avec anémie (hémoglobine < 11g/dL)	19	Élevé
IV	Stade 0-III avec thrombopénie (plaquettes < 100 000/ μ L)	19	

Le système de Binet paraît en 1981 et propose aussi une classification en 3 stades (A, B, C) basée sur le nombre d'aires atteintes, définies par la présence d'au moins une 1 adénopathie > 1 cm ou d'organomégalies cliniques (splénomégalie et/ou hépatomégalie), couplée aux taux d'hémoglobine et de plaquettes. Les aires atteintes considérées sont : céphalique et cervical, incluant l'anneau de Waldeyer ; axillaire et inguinal, l'atteinte pouvant être soit unilatérale soit bilatérale, comptant comme une seule aire (Binet et al., 1981) (Tableau 5)

Tableau 5. Système de classification pronostique de Binet (Binet et al., 1981)

Stade	Description	Médiane de survie (mois)	Risque
A	Hémoglobine \geq 10 g/dL et plaquettes \geq 100 000/ μ L et < 3 aires atteintes	>120	Faible
B	Hémoglobine \geq 10 g/dL et plaquettes \geq 100 000/ μ L et \geq 3 aires atteintes	60	Intermédiaire
C	Hémoglobine < 10 g/dL et/ou plaquettes < 100 000/ μ L quel que soit le nombre d'aires atteintes	32	Elevé

Ces deux systèmes ont comme principal avantage d'être simples et rapides, basés sur l'examen physique et des examens biologiques de routine uniquement. Ils sont à la fois d'utilité pronostique mais permettent aussi d'identifier les patients nécessitant un traitement.

Ainsi, un stade III/IV de Rai ou un stade C de Binet sont des indications à débiter un traitement de la LLC. Il est à noter toutefois qu'aucun de ces 2 systèmes ne prend en compte l'origine des cytopénies, qui peuvent être liées à une insuffisance médullaire, mais aussi potentiellement auto-immunes.

D'autres paramètres ont été proposés comme facteurs pronostiques tels que l'organisation de l'infiltrat médullaire (Hallek et al., 2008a), le nombre de pro-lymphocytes sanguin ou médullaire (Melo et al., 1987), l'âge ou le sexe (Catovsky et al., 1989). Enfin, des éléments sériques reflétant la masse tumorale sont aussi parfois utilisés comme facteurs pronostiques : un temps de doublement lymphocytaire < 6 mois (Molica et al., 1990), les taux de β 2-microglobuline et de Thymidine kinase (Hallek et al., 1996) ou encore de CD23 soluble (Sarfati et al., 1996).

B) NOUVEAU MARQUEURS PRONOSTIQUES

Depuis près de 20 ans, de nombreux marqueurs biologiques ont fait leur apparition, permettant d'identifier plus précisément les patients les plus à risque de progression dès le au diagnostic de leur LLC. Ils incluent le statut mutationnel de la région variable de la chaîne lourde de l'Ig membranaire (IGHV), l'expression de ZAP-70, de CD38 et/ou de CD49b par les LB LLC, ou encore certaines anomalies caryotypiques et mutations géniques spécifiques.

(1) STATUT MUTATIONNEL DE L'IGHV

L'hétérogénéité moléculaire de la LLC a été clairement suggérée par le fait qu'environ 60 % des cas de LLC présentaient une IGHV mutée (LLC-M) et 40 % une IGHV non mutée (LLC-NM) (Cai et al., 1992). Ceci suggère que les clones LLC peuvent dériver de deux différents stades de l'ontogénie B, les LLC-M ayant une origine post centre germinatif, ayant subi un réarrangement des chaînes suite à la rencontre avec un antigène, et les LLC-NM étant d'origine pré centre germinatif ou « pré-antigène ».

Bien que les gènes de la région variable de la chaîne légère puissent être aussi mutés, seul ceux de la chaîne lourde sont séquencés en pratique clinique afin de déterminer le statut mutationnel de la LLC. Des recommandation techniques européennes existent afin de limiter au maximum les variations inter-laboratoires (Langerak et al., 2011). Une LLC-NM est définie par une similarité de séquence ≥ 98 % entre les gènes de l'IGHV et ceux des séquences germinales, un taux < 98 % définissant alors une LLC-M. Le pourcentage d'homologie de séquence se base sur le ratio entre le nombre de différences nucléotidiques (mutations au sein de la région IGHV) de la séquence réarrangée et la longueur nucléotidique de la séquence germinale IGHV la plus homologue, du premier codon de FR1 au dernier codon de la CDR3.

La valeur pronostique du statut mutationnel de l'IGHV a été démontrée par deux travaux importants la même année (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999). Indépendamment du stade clinique, les LLC-NM constituaient une forme plus agressive avec une médiane de survie de 117 mois contre 293 mois pour les LLC-M ($p = 0,001$). En ne considérant que le stade Binet A, les médianes de survies étaient de 95 et 293 mois respectivement ($p = 0,0008$) (Hamblin et al., 1999) (Figure 12).

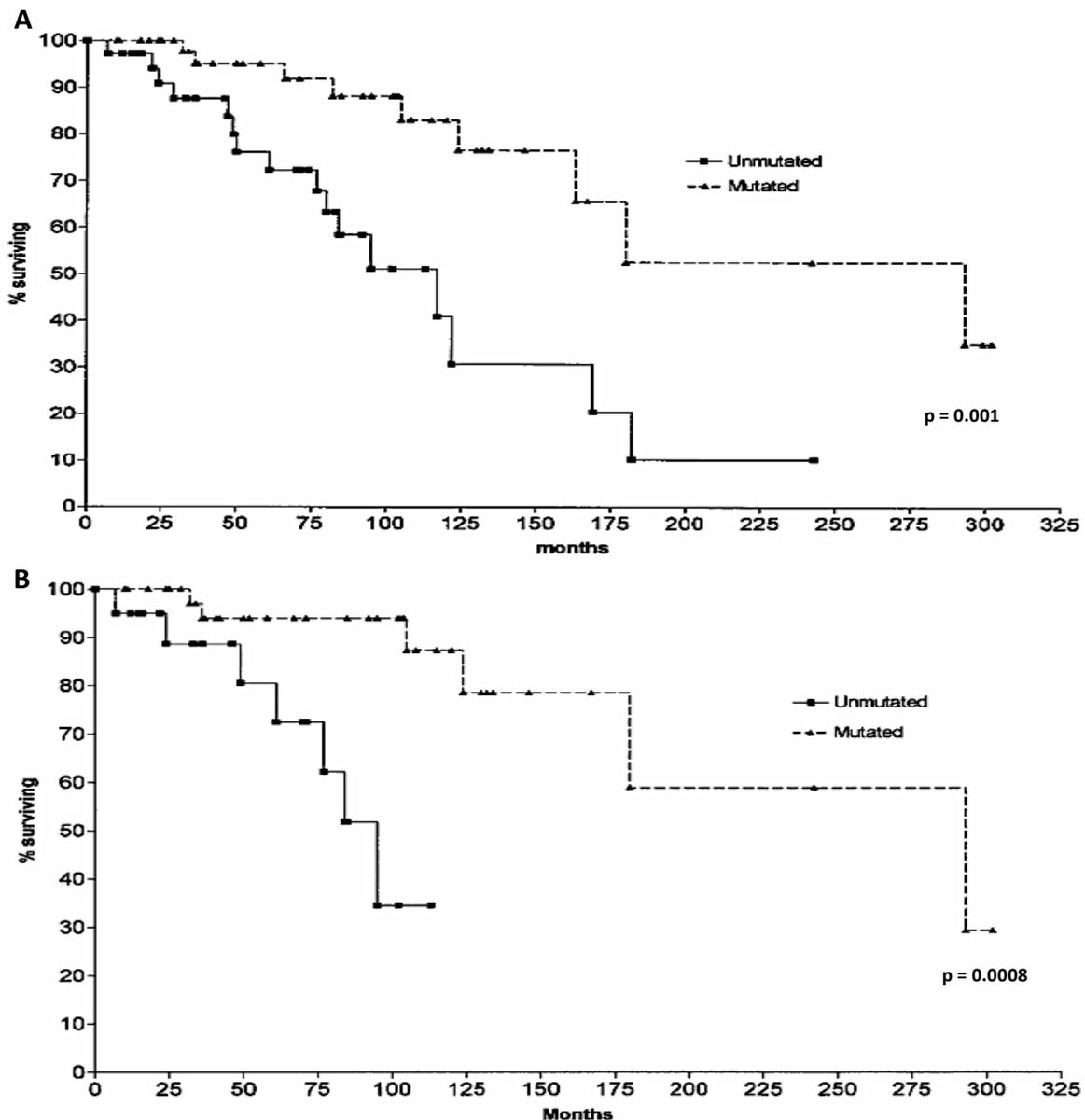


Figure 12. Courbes de survie (Kaplan-Meier) comparant 84 cas de LLC avec IGHV mutée ou IGHV non mutée (adapté de Hamblin et al., 1999).

A) Ensemble des patients, quel que soit le stade clinique.

B) Patients uniquement en stade Binet A.

Le seuil de 98 % d'homologie classiquement utilisé pour distinguer les LLC-M des LLC-NM est arbitraire, basé sur de possibles polymorphismes pouvant entraîner ce degré de variation (Matsuda et al., 1993). Ainsi, une étude rétrospective portant sur 310 patients avec divers pourcentages d'homologie de leur IGHV a montré que ceux avec une homologie de 97 à 98 % présentaient des médianes de survie globale et sans traitement plus faibles que les LLC-M mais plus grandes que les LLC-NM, leur conférant donc un pronostic intermédiaire (Hamblin et al., 2008).

Toutefois, l'intérêt de la détermination du statut mutationnel de l'IGHV est contre balancé par son coût financier et son temps d'analyse importants, rendant son utilisation en pratique clinique difficile. Ainsi, différents marqueurs pronostiques alternatifs ont été activement recherchés et comparés au statut mutationnel de l'IGHV.

(2) EXPRESSION DE ZAP-70

En 2001, Rosenwald et al. ont montré que les LLC-M et LLC-NM présentaient un profil d'expression génique spécifique mais globalement commun entre les deux formes, indépendamment du statut mutationnel, à l'exception d'une centaine de gènes. Parmi ceux-ci, celui présentant le différentiel d'expression le plus important était celui encodant l'expression de la protéine ZAP-70 (normalement exprimée dans les LT et les NK, cf. I), ce gène étant surexprimé uniquement dans les LLC-M et représentait environ 50 % des cas de LLC (Rosenwald et al., 2001).

Diverses méthodes de détection et de quantification de l'expression de ZAP-70 ont été proposées, notamment par PCR (polymerase chain reaction) temps réel ou IHC (Wiestner et al., 2003), mais la plus facile et utilisée en pratique clinique reste à ce jour la cytométrie en flux. Cette technique de détection a pour la première fois été décrite par Crespo et al. en 2003, et ont proposé un seuil pour la positivité de ZAP-70 dans les LB LLC de 20 %, correspondant à la positivité de 98 % des LT et des NK pour ZAP-70 (Figure 13) (Crespo et al., 2003). Les auteurs ont aussi montré que le taux de la protéine ZAP-70 ne variait pas au cours de l'évolution de la LLC, renforçant son intérêt clinique diagnostique et pronostique.

Avec cette méthode, les auteurs ont démontré la forte association entre l'expression de ZAP-70 par les LB LLC et le statut non muté des IGHV avec des valeurs prédictives positive et négative respectivement de 100 % et 87,5 %. La sensibilité et la spécificité de cette méthode étaient respectivement de 91 % et 100 %.

Depuis, diverses autres études et équipes ont confirmé l'association de l'expression de ZAP-70 dans la LLC au statut mutationnel de l'IGHV et sa valeur pronostique (voir pour revue Van Bockstaele et al., 2009).

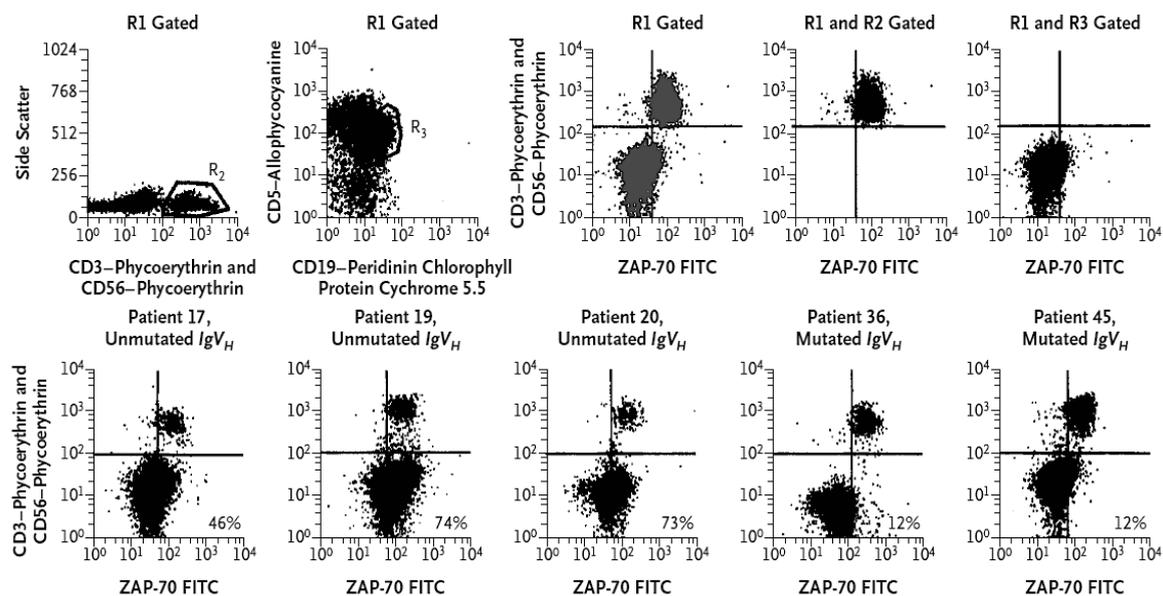


Figure 13. Méthode de cytométrie en flux utilisée pour la quantification de l'expression de ZAP-70 dans les LB LLC (adapté de (Crespo et al., 2003a).

R1 : lymphocytes totaux (taille/granulométrie) après lyse des érythrocytes ; R2 : LT et NK (CD3⁺CD56⁺) ; R3 : LB LLC (CD19⁺CD5⁺).

La ligne du haut représente la méthode pour quantifier l'expression de ZAP-70 dans les LB LLC. La ligne du bas montre un exemple d'expression de ZAP-70 chez 5 cas de LLC selon leur statut mutationnel IGHV.

Crespo et al. ont aussi montré que, pour les patients en stade Binet A, la positivité des LB LLC pour ZAP-70 (≥ 20 % des LB CD19⁺CD5⁺) était associée à une probabilité de progression de la maladie plus importante et à une survie plus faible (Figure 14).

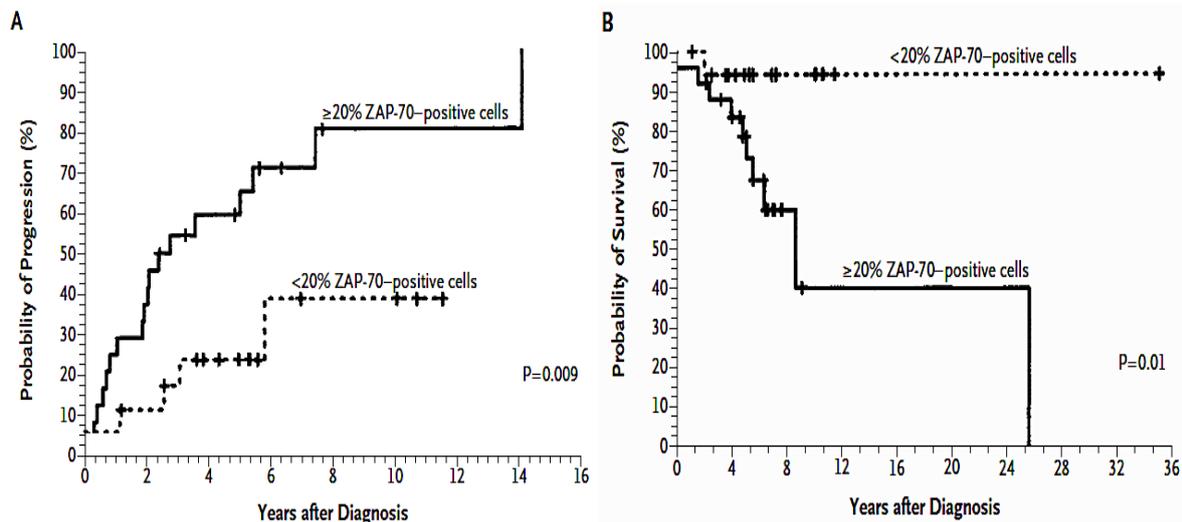


Figure 14. Probabilité de progression de la LLC (A) et de survie (B) des patients en stade Binet A selon la positivité ou non pour l'expression de ZAP-70 dans les LB LLC (Kaplan-Meier) (Crespo et al., 2003).

Il a été aussi démontré peu de temps après que le statut mutationnel de l'IGHV et l'expression de ZAP-70 par les LB LLC étaient des facteurs prédictifs indépendants. De plus, dans les rares cas discordants entre le statut mutationnel et l'expression de ZAP-70, cette dernière était plus discriminante concernant la probabilité de nécessiter de débiter ultérieurement un traitement de la LLC. Ces cas discordants sont généralement de profil intermédiaire, les LLC-M ZAP-70⁺ ayant un pronostic plus péjoratif que les LLC-NM ZAP-70⁻ (Rassenti et al., 2004). Enfin, en analyse multivariée, la valeur pronostique péjorative de ZAP-70 apparaissait supérieure à celle du statut IGHV et de CD38 (Rassenti et al., 2008).

L'expression de ZAP-70 dans les LB LLC est aussi associée à une réponse augmentée aux signaux de migration provenant du microenvironnement. Comparativement aux LB LLC ZAP-70⁻, ces cellules ont une hyper expression de CCR7, une réponse migratoire augmentée aux signaux médiés par CCL19 et CCL21, ainsi qu'une survie supérieure en réponse à CXCL12 (Calpe et al., 2011; Richardson et al., 2006)

La principale limite de la détermination de l'expression de ZAP-70 en routine reste le manque de consensus sur la méthode à utiliser. La détection de la protéine est préférable à celle du transcrite (ARNm) pour plusieurs raisons.

Premièrement, ceci est plus relevant d'un point de vue physiologique. Deuxièmement, les LT et les NK exprimant fortement de façon physiologique ZAP-70, les PCR quantitative temps réel (qPCR) et les Western blot nécessitent une grande pureté en LB LLC, ce qui est assez difficile à obtenir et peut manquer de reproductibilité. La cytométrie en flux permet de s'affranchir de ces difficultés, de détecter et de comparer simultanément l'expression de ZAP-70 dans les LB LLC, LT et NK de manière rapide et fiable (Crespo et al., 2003). Pour cela, elle reste à ce jour la méthode de détection classiquement utilisée. Toutefois, il persiste un manque de standardisation des pratiques, et ce sur différents points (Vroblova et al., 2012) : i) le choix de l'anticorps anti-ZAP-70 (clone, fluorochrome, reconnaissance directe ou indirecte) ; ii) le choix des kits de fixation/perméabilisation (étant donné le caractère intracellulaire de la protéine) ; et iii) la méthode d'analyse et d'interprétation des résultats. En effet, pour ce dernier point, certaines publications diffèrent sur le seuil de positivité retenu pour ZAP-70, sur le choix de la population lymphocytaire pour poser le seuil (LT, NK, LB normaux de donneurs) et d'autre utilisent le ratio de fluorescence ou encore un contrôle isotypique. De plus, dans les LB LLC, à la différence des LT et NK, l'expression de ZAP-70 est un continuum rendant difficile d'établir une distinction claire entre les LLC ZAP-70⁺ et les LLC ZAP-70⁻ (Vroblova et al., 2012).

Une approche alternative pourrait être le statut épigénétique de ZAP-70. En effet, il a récemment été montré que l'hypométhylation des dinucléotides CpG(+223) de la séquence régulatrice en 5' de ZAP-70 était fortement prédictive de la survie globale et de la durée avant traitement, et semblant même supérieure à l'expression de ZAP-70 et de CD38. Toutefois, le statut méthylé n'était pas corrélé à l'expression protéique dans cette étude (Claus et al., 2014).

Enfin, des résultats très récents suggèrent que l'expression de ZAP-70 pourrait à l'avenir aussi constituer un facteur prédictif de la réponse spécifique aux traitements par anticorps monoclonaux anti-CD20 (Skopelja-Gardner et al., 2017). En effet, un des mécanismes de résistance et/ou d'échappement à ces traitements est représenté par le phénomène de modulation antigénique appelé trigocytose. Ceci consiste à la

réduction de l'intensité d'expression du CD20 à la surface des LB suite à la capture du complexe CD19/CD20/Anti-CD20 par les cellules reconnaissant la fraction Fc de l'antiCD20 grâce à leurs récepteurs membranaires FC γ RI (monocytes, NK...) (Taylor and Lindorfer, 2015). L'obinutuzumab, un nouvel anti-CD20 qui a montré sa supériorité au rituximab dans la déplétion des LB-LLC (Cartron et al., 2014; Sehn et al., 2015), s'accompagne aussi d'une trogocytose plus importante que le rituximab, médiée spécifiquement par des adhésions homologues entre LB-LLC (alors que la trogocytose induite par le rituximab est liée à la densité membranaire de CD20 avant traitement). Or, la formation de ces adhésions homologues est corrélée à l'expression de ZAP-70 dans ces cellules, résultant en une trogocytose augmentée et, *in fine*, à la génération plus importante de LB LLC CD20⁻ et une moindre sensibilité aux anti-CD20 (Skopelja-Gardner et al., 2017).

(3) EXPRESSION DE CD38

Un des premiers biomarqueur pronostique alternatif et associé au statut mutationnel IGHV a été l'expression de CD38 par les LB LLC.

CD38 est une glycoprotéine transmembranaire qui semble jouer un rôle anti-apoptotique dans les LB matures (Zupo et al., 1994). Dans la LLC, les données cumulées de la littérature montrent que l'expression de CD38 par les clones de LLC CD38⁺ leur confère une plus grande sensibilité aux signaux médiés par le BCR et du microenvironnement, entraînant une prolifération et une survie accrues. Ceci est médié en grande partie par une interaction fonctionnelle directe entre CD38 phosphorylé directement ZAP-70 et implique la voie ERK1/2 (Deaglio et al., 2007; Malavasi et al., 2011).

L'expression de CD38 permet de classer les patients LLC en deux groupes : ceux avec des taux élevés de LB LLC CD38⁺ ($\geq 30\%$) étant des LLC-NM, et ceux avec des LB LLC CD38⁺ $< 30\%$ correspondant aux LLC-M. L'expression de CD38 est un facteur pronostique indépendant, les deux groupes différant significativement en termes de survie globale, de durée avant traitement et de réponse aux traitements

(Damle et al., 1999). Toutefois, son expression peut varier au fil du temps et semble associée au degré de prolifération cellulaire (Calissano et al., 2009; Hamblin et al., 2002), suggérant que son utilisation en pratique clinique doit être restreinte à un complément des autres facteurs pronostiques.

(4) EXPRESSION DE CD49D

CD49d est une sous unité de l' α -intégrine ($\alpha 4$). En se liant avec CD29 (la sous unité $\beta 1$) elle forme l'intégrine complète $\alpha 4\beta 1$ ou VLA-4 qui est capable de lier la fibronectine et VCAM-1. Son rôle principal est l'homing des cellules hématopoïétiques dans la MO et les OLS.

A l'instar de CD38, différentes études ont démontré que les patients avec ≥ 30 % de LB LLC exprimant CD49b auront une survie globale et un intervalle avant initiation de traitement significativement réduits comparativement aux LLC CD49b < 30 %. Un taux alternatif de 45 % semble augmenter la force pronostique (voir pour revue Brachtl et al., 2014). Un phénotype de LLC à la fois CD38^{low} et CD49^{low} étant associé au meilleur pronostic en termes de survie globale, il a été suggéré d'inclure ces deux marqueurs additionnels dans des scores afin d'affiner le pronostic initial de la LLC au diagnostic (Zucchetto et al., 2006).

Les mécanismes par lesquels CD49b contribue au pronostic défavorable de la LLC sont complexes et partiellement connus à ce jour. Il semblerait que CD49b, via sa liaison à la MMP-9 (métalloprotéinase matricielle 9) facilite la transmission de signaux de survie provenant du microenvironnement (Redondo-Muñoz et al., 2010). De plus, un complexe multiprotéique impliquant CD49d, CD38, CD44v et MMP-9 a été identifié dans les LB LLC-NM, suggérant un réseau fonctionnel entre ces différents biomarqueurs pronostiques. Une hyper-expression de CD49b est aussi observée dans quasiment tous les cas de LLC avec trisomie 12, et est régulée par des phénomènes de méthylation (Zucchetto et al., 2013).

(5) ANOMALIES GENETIQUES

Les principales anomalies génétiques ont été détaillées précédemment dans la partie pathogénie. Leur impact pronostique est très variable selon le type et l'association de ces anomalies. Ces paramètres génétiques, regroupés avec des facteurs cliniques et biologiques, ont permis de distinguer 4 sous-groupes de LLC avec des profils évolutifs distincts, allant d'une forme très indolente aux formes très agressives avec fort risque de transformation en lymphome de haut grade (syndrome de Richter) (Figure 15).

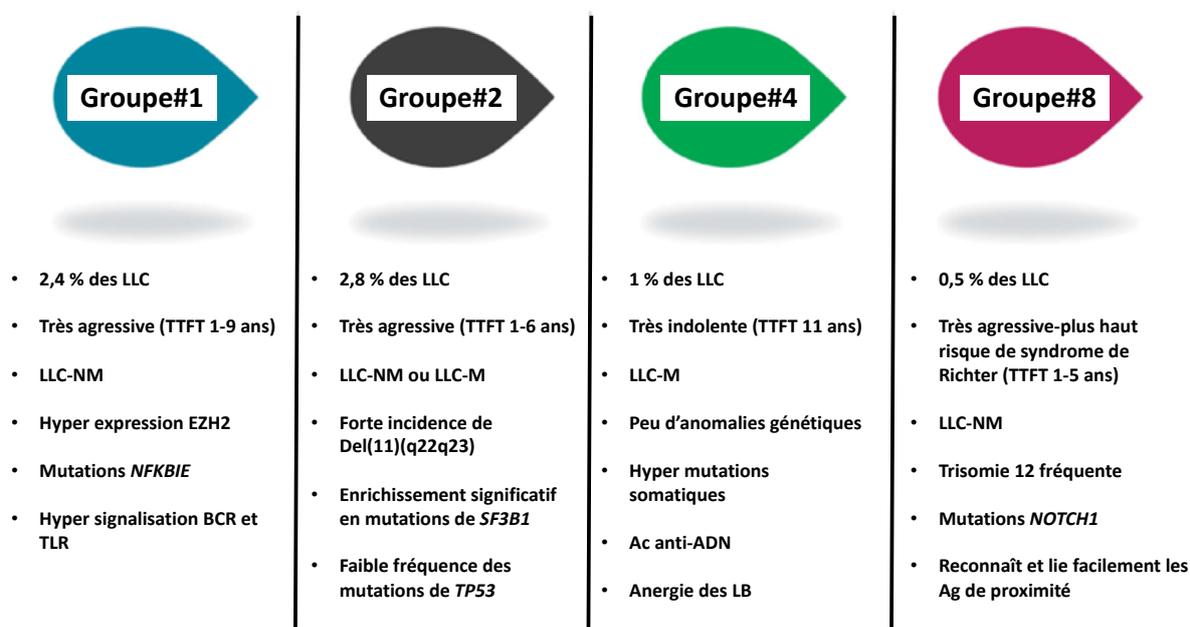


Figure 15. Résumé des principaux sous-groupes de LLC selon leurs profils clinico-biologiques et pronostiques (adapté de Stamatopoulos et al., 2017)

TTFT : time-free to first treatment ; LLC- leucémie lymphoïde chronique ; NM : non mutée ; M : mutée

Il est clairement établi que, de façon globale en oncologie, les patients atteignant la rémission complète après traitement ont une meilleure survie que ceux en réponse partielle ou incomplète.

Dans la LLC, la quantification de la maladie résiduelle est classiquement effectuée soit par la recherche spécifique de réarrangements clonaux de l'IGHV par PCR temps réel, soit plus récemment par cytométrie en flux dans la moelle osseuse et/ou dans le sang périphérique avec des résultats similaires (Raponi et al., 2014). Ainsi, à l'instar de nombreuses autres hémopathies malignes, l'éradication de tout clone tumoral résiduel après une première ligne thérapeutique constitue un facteur prédictif indépendant fort de survie sans progression et de survie globale dans la LLC (Böttcher et al., 2012; Strati et al., 2014).

Devant le nombre et la diversité des facteurs pronostiques identifiées au cours de dernières années, en 2016 un consortium européen a analysé, sur 3472 patients LLC naïfs de traitements, l'impact de 27 facteurs de risque en termes de survie globale, afin de faire émerger les facteurs prédictifs les plus significatifs (International CLL-IPI working group, 2016).

Ce travail a permis de créer un nouveau score pronostique pondéré simple, le CCL-IPI (Chronic Lymphocytic Leukemia-International Prognostic Index) (Tableau 6) qui regroupe 5 facteurs de risques indépendants cliniques, biologiques et génétiques : l'âge (≥ 65 ans vs < 65 ans) ; le stade clinique (Binet A ou Rai 0 vs Binet B-C ou Rai I-IV) ; la concentration sérique en $\beta 2$ -microglobuline ($\leq 3,5$ mg/L vs $> 3,5$ mg/L) ; le statut mutationnel des IGHVs (muté vs non muté) ; et le statut de TP53 (absence de mutation et de del(17p) vs del(17p) ou mutation de TP53 ou les deux). Cet index pronostique a permis d'identifier 4 groupes basés sur des survies globale significativement différentes à 5 ans.

Tableau 6. Score pronostique CLL-IPI (d'après (International CLL-IPI working group, 2016)

Risque CLL-IPI	Survie globale à 5 ans (%)	Indication à débuter un traitement
Faible	92	Non
Intermédiaire	83	Non sauf si LLC très symptomatique
Elevé	67	Oui, sauf si LLC asymptomatique
Très élevé	42	Oui, en privilégiant si possible les nouvelles molécules (inhibiteurs de tyrosine kinase, etc...)

De plus, ce score propose une approche pratique en termes d'initiation de traitement selon le risque du patient.

Son intérêt pronostique a depuis été validé dans différentes séries et pratiques cliniques, mais son utilité pronostique chez les patients sous thérapeutiques ciblées (Ibrutinib, idelalisib, venetoclax), étant très peu représentés dans ces séries, nécessite d'être évaluée (Molica et al., 2017).

Tableau 7. Résumé des facteurs pronostiques au diagnostic de la LLC (d'après Nabhan et al., 2015)

Catégorie	Facteur pronostique	Description	Fonction biologique	Signification pronostique	Inclusion dans recommandations	Valeur pronostique
Clinique et biologique	Stade Raï	Présence ou absence d'ADP, d'HPM, de SPM et de cytopénies	Sépare les patients en 2 groupes avec différents temps de survie selon la masse tumorale	Haut stade → survie réduite	OUI (NCCN, IWCLL, ESMO)	Forte
	Temps de doublement lymphocytaire	Durée en mois nécessaire pour doubler le nombre absolu de lymphocytes sanguins	Vitesse de progression de la maladie	Temps < 12 mois → haut risque	OUI (NCCN, IWCLL, ESMO)	Forte
	B2μglobuline et LDH	Mesure des taux sériques de B2μglobuline et de LDH	Vitesse de progression de la maladie	Taux augmentés → mauvais pronostic	OUI (NCCN, ESMO)	Forte
Statut mutationnel IGHV	IGHV	Statut mutationnel de la région variable de la chaîne lourde de l'immunoglobuline de surface	Détermine l'origine pré centre germinale (non muté) ou post-centre germinale (muté)	IGHV non mutée → survie réduite et plus haut risque de rechute	OUI (NCCN, IWCLL, ESMO)	Forte
Marqueurs de cytométrie en flux	CD38	Glycoprotéine transmembranaire	Rôle possible dans l'apoptose	Expression > 30 % → survie réduite	OUI (NCCN, IWCLL, ESMO)	Forte
	ZAP-70	Zeta chain associated protein of 70 kDa	Tyrosine kinase exprimée par NK et LT et non par les LB	LB LLC > 20 % → haut risque de progression, réduction TTFT, survie réduite	OUI (NCCN, IWCLL, ESMO)	Forte
Anomalies en FISH	17p-	Délétion de la région p13 du bras court du chromosome 17	Perte d'une copie du gène TP53	Réduction de la réponse au traitement, progression plus rapide, survie réduite sous chimiothérapie	OUI (NCCN, IWCLL, ESMO)	Forte
	11q-	Délétion de la région q22 du bras long du chromosome 11	Perte d'une copie du gène ATM	Haut risque	OUI (NCCN, IWCLL, ESMO)	Forte
	Trisomie 12	Gain d'un chromosome 12	Inconnue	Risque intermédiaire sauf si mutation NOTCH1 présente	OUI (NCCN, IWCLL)	Forte
	13q-	Délétion de la région q14 du bras long du chromosome 13 et perte du chromosome 13	Perte du cluster miARN-15a/16-1 impliqué dans la régulation du cycle et la prolifération cellulaires	Faible risque	OUI (NCCN, IWCLL)	Forte
	6q-	Délétion de la région q23 du bras long du chromosome 6	Inconnue	Risque intermédiaire	OUI (IWCLL)	faible
Mutations géniques	TP53	Tumor protein p53	Protéine suppressive de tumeur, arrêt du cycle cellulaire, apoptose, sénescence et réparation de l'ADN	Survie réduite sous traitement conventionnel	OUI (NCCN, ESMO)	Forte
	ATM	Ataxia teleangiectasia mutated	Membre de la famille PI3/PI4-kinase, checkpoint du cycle cellulaire	Haut risque de progression, surtout si association avec del11q	NON	Intermédiaire
	BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	Membre de la famille IAP (inhibiteurs de l'apoptose)	Défavorable	NON	Faible
	NOTCH1	Notch homologue 1, translocation associated	Protéine ligand transmembranaire activée qui régule des voies de signalisations importantes pour la croissance cellulaire	Défavorable	NON	Forte
	SF3B1	Splicing factor 3b, sous-unité 1	Epissage ARNm	Défavorable	NON	Forte
	MYD88	Myeloid differentiation primary response 88	Protéine adaptatrice cytosolique impliquée dans les réponses immunitaires innées et adaptatives	Favorable	NON	Intermédiaire
Autres	XPO1	Exportine 1	Transport protéique extranucléaire	Haut risque de progression ?	NON	Faible
	Complexité génétique	Multiples anomalies chromosomiques au caryotype ou FISH, ou mutations sous-clonales au niveau moléculaire	Instabilité génomique et évolution clonale	Défavorable	NON	Intermédiaire

ADP : adénopathies ; HPM : hépatomégalie ; SPM : splénomégalie ; ESMO : European Society of Clinical Oncology ; FISH : fluorescence in situ hybridization ; IGHV : immunoglobulin variable heavy chain ; IWCLL : international workshop on chronic lymphocytic leukemia ; LDH : lactate dehydrogenase ; ARNm : ARN messenger ; miARN : micro-ARN, NCCN : National Comprehensive Cancer network version 4-2014 ; NK : natural Killer

6. TRAITEMENT

La grande hétérogénéité de la LLC fait que certains patients présentent des formes indolentes, avec une durée de vie conservée et ne nécessitant jamais de traitements, et à l’opposé, d’autres présentent des formes agressives, rapidement fatales sans traitement spécifique. Il est ainsi crucial de caractériser précocement la LLC au diagnostic afin d’identifier rapidement les patients devant bénéficier d’un traitement.

Les recommandations internationales ont clairement défini qu’une indication de traitement doit être réservée aux LLC en stade Binet C ou Rai III/IV et/ou aux formes actives.

Une LLC active est définie par les symptômes suivants :

- Insuffisance médullaire progressive : apparition ou aggravation d’une anémie et/ou thrombopénie par infiltration médullaire
- Masse tumorale importante : adénopathie(s) > 10 cm ou rapidement progressive(s), et/ou splénomégalie > 6 cm en dessous du rebord costal ou rapidement progressive
- Anémie et/ou thrombopénie auto-immune(s) non contrôlée(s) sous corticostéroïdes
- Temps de doublement lymphocytaire < 6 mois ou augmentation > 50 % ≤ 2 mois
- Présence de signes B : amaigrissement non volontaire ≥ 10 % du poids dans les 6 derniers mois ; fièvre > 38°C ≥ 2 semaines sans cause infectieuse ; sueurs nocturnes > 1 mois ; performans status ≥ 2

Une fois l’indication thérapeutique retenue, le type de traitement dépendra du statut :

- Physiologique du patient : comorbidités, performans status, état mental...
- Génétique de la LLC : à ce jour, seules les del(17p) et/ou les mutations de TP53 sont dans le choix thérapeutique du fait leur pronostic globalement défavorable.
- Thérapeutique : 1^{ère} ligne thérapeutique versus \geq 2^e ligne, rechute versus LLC réfractaire

Les traitements de 1ère ligne sont désormais bien codifiés (Tableau 8).

Pour les patients en bonne condition physique (« go go patients »), définie par une clairance de la créatinine > 70 mL/min avec peu ou pas de comorbidités (cumulative illness rating scale CIRS ≤ 6), le traitement standard de 1^{ère} intention est la combinaison Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide (RFC) en 6 cures mensuelles, associant un anti-CD20 à deux chimiothérapies. Cette immunothérapie s'est avérée supérieure en termes de survie sans progression et de survie globale aux chimiothérapies seules par Fludarabine-Cyclophosphamide, au prix de neutropénies et de complications infectieuses légèrement plus importantes (Hallek et al., 2010). Des études prospectives sont en cours afin d'évaluer la possibilité de diminuer le nombre de cures à 3 ou 4 au lieu des 6 actuelles. L'association Rituximab-Bendamustine semble constituer une alternative intéressante pour les patients ≥ 65 ans (Kleeberg et al., 2016).

Les patients avec CIRS > 6 et/ou avec une clairance de la créatinine ≤ 70 mL/min (« slow go ») constituent la très grande majorité des LLC du fait de l'âge moyen au diagnostic de la maladie (71 ans). Les options thérapeutiques comportent, au choix, du chlorambucil en association avec un anti-CD20, ou de l'ibrutinib en monothérapie (un inhibiteur fort de BTK entraînant un blocage de la signalisation du BCR et de la prolifération des LB LLC ainsi que leur apoptose). Les alternatives en cas de contre-indication(s) et/ou de toxicité à ces traitements sont les combinaisons Rituximab-Bendamustine ou du RFC atténué (réduction des doses des chimiothérapies et majoration des doses pour le rituximab avec traitement d'entretien trimestriel) (Foon et al., 2009).

Une troisième catégorie de patients avec LLC active est représentée par ceux porteurs de la del(17p) et/ou de mutations de TP53, qui leur confère un risque plus élevé de progression et de résistances aux traitements. Il est actuellement recommandé de traiter ces patients en première intention par Ibrutinib en monothérapie. En cas de contre-indication, chez les patients « go go » la combinaison rituximab-idelasib (inhibiteur de la PI3K δ) peut être proposée mais au prix d'une toxicité légèrement plus importante. Chez les patients « slow go », les alternatives à l'ibrutinib sont l'alemtuzumab (anti-CD52 provoquant une lyse lymphocytaire cellulaire et complément-dépendante), médiée par le complément des LB > LT) ou de fortes doses d'anti-CD20 (rituximab ou ofatumumab).

Les recommandations de traitement des LLC en rechute ou réfractaires sont moins consensuelles. Elles se basent sur la durée de réponse après la fin de la 1^{ère} ligne de traitement, le statut physiologique du patient et les éventuels effets secondaires survenus lors de la 1^{ère} ligne (Tableau 8).

De manière générale, il est admis que si la durée de rémission après la 1^{ère} ligne de traitement a été > 36 mois, celle-ci doit être reconduite, en tenant toutefois compte de la toxicité médullaire cumulée notamment en cas de traitement par RFC.

La situation est clairement différente en cas de récurrence plus précoce ou de LLC réfractaire, définie par une maladie stable (réduction de la masse tumorale < 50 %) ou progressive (augmentation de la masse tumorale \geq 50 %) après traitement, ou rechutant dans les 6 mois après un traitement complet incluant de la fludarabine. Le principe global est de changer de traitement car le risque d'échec par épuisement thérapeutique est alors trop important et de traiter les patients réfractaires au sein d'essais cliniques dans la mesure du possible. Différentes options thérapeutiques validées existent à ce jour, telles que l'idelalisib-rituximab, l'ibrutinib ou en cas de contre-indication le venetoclax (inhibiteur de la protéine anti-apoptotique BCL-2) en monothérapies ou en combinaisons avec des anti-CD20, ou encore l'alemtuzumab seul ou en association.

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques doit être envisagée chez les patients « go go » avec LLC réfractaire et/ou avec del(17p) ou mutations de TP53, en rechute après un traitement de 1^{ère} ligne par inhibiteurs de tyrosine kinase (ibrutinib ou idelasib) et en réponse complète après une deuxième ligne, dans un objectif de consolidation (Dreger et al., 2014).

Tableau 8. Algorithmes de traitements de la LLC en 1^{ère} et 2^e lignes (adapté de Hallek et al., 2017)

1 ^{ère} ligne thérapeutique			
Stade	Statut physiologique	Del(17p) et/ou mutation TP53	Traitement
Binet A-B Rai 0-II et LLC inactive	NA	NA	Aucun
LLC active Ou Binet C Ou Rai III-IV	Go go	Non	RFC (RB si > 65 ans ?)
		Oui	Ibrutinib ; Idelasib + rituximab (ACSH)
	Slow go	Non	Chlorambucil + obinituzumab (ou rituximab ou ofatumumab) ; ibrutinib
		Oui	Ibrutinib ; Alemtuzumab ; Rituximab ou ofatumumab fortes doses
Seconde ligne thérapeutique			
Réponse à la 1 ^{ère} ligne	Statut physiologique	Traitement	
Réfractaire ou récurrence ≤ 36 mois après la fin de la 1 ^{ère} ligne thérapeutique	Go go	Ibrutinib, idelalisib + rituximab, fludarabine + alemtuzumab, RFC (si RB en 1 ^{ère} ligne), BR (si RFC en 1 ^{ère} ligne), venetoclax, Alemtuzumab-Dexaméthasone, Lenalidomide ± Rituximab, discuter consolidation par ACSH	
	Slow go	Ibrutinib, Idelalisib + Rituximab, venetoclax, Alemtuzumab, RFC atténué, BR, lenalidomide ± rituximab, ofatumumab, rituximab fortes doses	
Récurrence > 36 mois après la fin de la 1 ^{ère} ligne	Tout statut	Répéter la 1 ^{ère} ligne thérapeutique reçue	

ACSH, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ; RB, rituximab-bendamustine ; RFC, rituximab-fludarabine-cyclophosphamide ; F : fludarabine ; C, cyclophosphamide ;

7. COMPLICATIONS

Les complications au cours de l'évolution de la LLC sont très variées, comportant principalement les infections, la survenue de cytopénies d'origine centrale (insuffisance médullaire) et/ou périphériques (auto-immunes), et les néoplasies secondaires majoritairement représentées par le syndrome de Richter.

Le syndrome de Richter est défini par le développement d'un lymphome agressif au cours de la LLC ou chez des patients avec antécédents de LLC. Son incidence est d'environ 0,5 % par an et correspond très majoritairement à une transformation en lymphome malin non Hodgkinien (LMNH) diffus à grandes cellules, et beaucoup plus rarement en lymphome malin Hodgkinien. Il survient en moyenne dans les 2 ans suivant le diagnostic de LLC ce qui en fait donc une complication relativement précoce et pouvant survenir chez des patients encore naïfs de traitements. Il se manifeste principalement par l'apparition de signes B et d'adénopathies rapidement progressives associées à une élévation franche des LDH (lactate déshydrogénase). Dans ce cas, un TEP-TDM ^{18}F FDG (tomographie par émission de positron couplée à une tomodensitométrie au 18 fluorodésoxyglucose) est l'examen de référence de 1^{ère} intention, une SUV max ganglionnaire ≥ 10 permettant de différencier avec une excellente sensibilité et spécificité une transformation en lymphome de haut grade d'une LLC évolutive, et de guider la biopsie qui seule, permettra le diagnostic étiologique précis et la caractérisation tumorale (Cheson et al., 2014; Falchi et al., 2014).

Différents principaux facteurs de risque indépendants de transformation ont été identifiés, tels que les mutations de NOTCH1 et une stéréotypie du BCR et notamment l'utilisation de IGHV4-39 (prépondérant dans le sous-groupe pronostique n°8 (Rossi et al., 2009a, 2012b; Stamatopoulos et al., 2017). Une trisomie 12 (Stamatopoulos et al., 2017), des adénopathies ≥ 3 cm, une longueur des télomères ≤ 5000 paires de bases ou la del(17p) ont aussi été rapportés (Rossi et al., 2008, 2009b). Toutefois, le plus important facteur semble être la filiation clonale entre la CLL et le LMNH. En effet, 80 % des LMNH diffus à grandes cellules dérivent du même clone que celui de la LLC, les 20 % restant présentent des réarrangement V-D-J de la chaîne lourde des Ig

différents. Dans ce dernier cas, la survie moyenne est d'environ 5 ans, comparable aux LMNH *de novo*, et seraient plutôt à considérer comme tels, contre 8-16 mois pour les LMNH avec filiation clonale représentant une réelle transformation de la LLC en lymphome de haut grade.

Le pronostic du syndrome de Richter reste toutefois sévère. Les ressources thérapeutiques sont représentées par : i) des poly chimiothérapies telles que R-CHOP (rituximab-cyclophosphamide-doxorubicine-vincristine-prednisone), ou OFAR (oxaliplatine-fludarabine-aracytine-rituximab) chez les patients ayant préalablement reçu des chimiothérapies contenant des anthracyclines ; et ii) une consolidation chez les patients < 65 ans selon leur conditions physiologiques par greffe de CSH autologues ou allogéniques avec conditionnement atténué (Cwynarski et al., 2012; Rossi, 2016). L'intérêt des thérapeutiques ciblées seules ou en combinaison aux immunochemiothérapies reste à évaluer.

Bien que le syndrome de Richter soit le principal cancer secondaire dans la LLC, le risque global semble toutefois aussi augmenté, étant 2,2 fois supérieur au risque attendu dans la population générale du même âge dans une large étude rétrospective portant sur 2028 patients LLC (Tsimberidou et al., 2009). Les principales hypothèses sont une dysfonction immunitaire paranéoplasique et/ou secondaire au traitements reçus, ainsi que des altérations de l'ADN et une génotoxicité globale chimio-induite notamment dans les CSH (Tambaro et al., 2016).

Ainsi, parmi les cancers non hématologiques, les mélanomes et dans une moindre mesure les cancers du sein étaient significativement plus fréquents dans la LLC. Au sein des hémopathies malignes secondaires, les syndromes myélodysplasiques (SMD) et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) semblent aussi plus fréquents. Les facteurs de risque indépendants observés étaient un âge > 60 ans, le sexe masculin, et des taux de β 2-microglobuline > 3 mg/L ou de LDH > 618 U/L. Bien que les SMD et les LAM soient le plus fréquemment considérées comme chimio-induites, notamment par les analogues des purines telle que la fludarabine (Tambaro et al., 2016), les différents régimes de traitements ne sortaient pas comme facteur significatif dans cette étude (Tsimberidou et al., 2009). Les caractéristiques clinico-biologiques des LAM et SMD dans la LLC ainsi que leurs pronostics sombres sont semblables à ceux des LAM et SMD chimio-induites dans les autres cancers.

Toutefois, des LAM et des SMD sont aussi observées *de novo*, survenant chez les patients LLC naïfs de traitements, et représentant 4,2 % et 8,4 % des cas respectivement (Tambaro et al., 2016). Dans ces cas de SMD, la médiane de survie est alors plus longue que celle observée chez les patients LLC traités avec SMD. Il n'existait pas de différence significative pour les cas de LAM mais les effectifs étaient faibles. Une étude rétrospective incluant une revue de la littérature récente et s'intéressant spécifiquement aux LAM survenant *de novo* dans la LLC a suggéré que le pronostic de ces hémopathies était bien plus sévère que celui des patients du même âge avec LAM hors LLC, avec une faible réponse aux chimiothérapies, et que ceci n'était pas expliqué par des profils cytogénétiques différents (Ito et al., 2017).

Les infections sont une cause majeure de morbi-mortalité dans la LLC, touchant jusqu'à 85 % des patients au cours de leur maladie et impliquées dans 25 à 50 % des causes de décès (Dhalla et al., 2014). Le principal facteur favorisant reconnu à ce jour est l'hypogammaglobulinémie, touchant principalement les sous classes IgG3/4 mais aussi les isotypes IgA et IgM impliquées dans l'immunité muqueuse et les reconnaissance antigéniques poly spécifiques. Cette hypogammaglobulinémie reflète les altérations qualitatives des interactions LT-LB non tumoraux CD5⁻, touchant quasiment tous les patients LLC à des degrés variables et, bien que favorisée par les traitements cytotoxiques reçus, s'aggrave aussi progressivement indépendamment de ces derniers (Wadhwa and Morrison, 2006).

Un déficit cellulaire T et notamment CD4⁺ est aussi observé dans la LLC, indépendamment des traitements reçus, possiblement en lien avec la sécrétion de TGF- β par les cellules leucémiques et du récepteur soluble à l'IL-2 qui, en liant l'IL-2 endogène, va inhiber partiellement l'activation des LT. Des déficits quantitatifs et qualitatifs des polynucléaires neutrophiles (PNN) et des monocytes ont aussi été décrits (Wadhwa and Morrison, 2006).

Enfin, il existe une altération précoce de la voie du complément, faisant intervenir des déficits en properdine, d'activation du complément et de sa liaison, ainsi qu'une réduction d'expression des récepteurs au complément CR1 et CR2 à la surface de LB LLC (Wadhwa and Morrison, 2006).

Du fait de l'hypogammaglobulinémie, les infections du tractus respiratoire sont les plus fréquentes. Le spectre microbien est varié et dépend des différents régimes thérapeutiques reçus. Le traitement de référence de 1^{ère} intention RFC dans les LLC actives entraîne un déficit cellulaire à la fois B et T et confère ainsi un risque infectieux communautaire bactérien (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, etc...) mais aussi à germes opportunistes (*Listeria*, *Mycobacterium*, *Nocardia*), un risque fongique (*Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*), et viral (*cytomegalovirus*, *varicella zoster* et *herpes simplex* (Morrison, 2010).

Il n'existe toutefois pas à ce jour de recommandations concernant la prophylaxie antimicrobiennes dans la LLC, qui reste à adapter selon les combinaisons de traitements reçues, les taux de CD4⁺ et d'IgG. Sous RFC, il est par exemple classique de proposer une prophylaxie antivirale et anti-*pneumocystis*, souvent poursuivie jusqu'à 6 mois après la fin du traitement du fait de la longue durée d'action cytotoxique de la fludarabine (Morrison, 2010).

Bien que l'immunothérapie passive prophylactique par Ig semble réduire l'incidence des infections bactériennes mineures et modérées, elle n'a pas montré de bénéfices significatifs en termes de réduction des infections majeures ni de la mortalité dans des études randomisées, ce qui fait que cette prophylaxie n'est pas consensuelle à ce jour (Raanani et al., 2008). Elle pourrait toutefois être plus intéressante chez les patients les plus à risque infectieux, présentant un déficit humoral combiné et traités par immunochimiothérapie (Visentin et al., 2015).

Il n'existe pas non plus de recommandations de vaccination dans la LLC. Bien que la présentation antigénique et la production d'anticorps soient altérées dans la LLC, la vaccination antigrippale annuelle et anti-pneumococcique, de préférence conjugués ou avec adjuvants, sont généralement effectuées. Le vaccin anti-*varicella zoster* n'est à ce jour pas validé dans la LLC ni chez l'immunodéprimé en général (Morrison, 2010).

Enfin parmi les complications de la LLC, on peut citer l'insuffisance médullaire, se manifestant par l'apparition ou l'aggravation de cytopénies (anémie, thrombocytopénie, neutropénie). Cette insuffisance est le reflet d'une progression de la LLC mais peut aussi être favorisée par les chimiothérapies.

Les patients LLC sont aussi plus à risque de développer des manifestations auto-immunes, et notamment des cytopénies auto-immunes (CAI), qu'il conviendra de distinguer rapidement des cytopénies en lien avec une insuffisance médullaire, bien que les deux causes puissent être intriquées. Cette partie auto-immune et particulièrement le rôle de ZAP-70 sera détaillée dans le chapitre suivant.

8. SYNTHÈSE : RÔLE DE ZAP-70 DANS LA LLC

Au total, ZAP-70 est surexprimée de façon anormale dans environ 50 % des cas de LLC et est corrélée au statut non muté des IGHVs et s'observe dans environ, les LLC-NM (Rosenwald et al., 2001).

Cette expression confère à la maladie un pronostic défavorable de par une réduction de la survie globale, du temps sans progression et sans traitement (Crespo et al., 2003; Rassenti et al., 2004, 2008). Sa valeur pronostique péjorative semble même supérieure à celle du statut mutationnel des IGHVs et de l'expression de CD28 (Rassenti et al., 2004, 2008).

La méthode de détection de l'expression de ZAP-70 reste la cytométrie en flux et, bien qu'il existe une absence de réel consensus sur le seuil de positivité, une LLC est considérée comme ZAP-70⁺ si ≥ 20 % des LB tumoraux expriment ZAP-70⁺ (Crespo et al., 2003). Le statut hypométhylé de ZAP-70 (CpG(+233)) paraît prometteur mais reste à confirmer par d'autres études, notamment du fait de son absence de corrélation au niveau d'expression de la protéine (Claus et al., 2014).

Le rôle pronostic péjoratif de ZAP-70 dans la LLC s'explique notamment par son association à une hyper signalisation médiée par le BCR. Ceci est indépendant de l'activité catalytique de ZAP-70 (Chen et al., 2008; Gobessi et al., 2007), cette dernière agissant plutôt comme une protéine adaptatrice facilitant le recrutement et l'activation d'autres protéines d'aval, impliquée dans la signalisation BCR telles que SYK, BLNK, PLC- γ 2, résultant en la génération de seconds messagers, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et l'activation des MAPKs résultant en une prolifération et une survie cellulaire accrues (Chen, 2005; Chen et al., 2002). De plus, ZAP-70 est capable d'intégrer les signaux médiés par TLR9 favorisant la survie cellulaire et la prolifération des LB LLC ZAP-70⁺ (Wagner et al., 2016). Ces cellules sont aussi plus sensibles aux signaux de survie et de migration provenant du microenvironnement (Calpe et al., 2011; Richardson et al., 2006). Collectivement, ces données permettent d'expliquer, du moins en partie, la nature plus agressive des LLC ZAP-70⁺.

Toutefois, bien que ces études permettant d'expliquer partiellement pourquoi l'expression de ZAP-70 est associée avec une progression plus rapide de la LLC, le mécanisme d'activation précis de ZAP-70 dans ces LB LLC reste à ce jour peu clair.

C. ZAP-70 ET AUTO-IMMUNITÉ

1. ALTERATIONS DE L'ONTOGENIE T ET ECHAPPEMENT DE LT AUTOREACTIFS

Les premières données concernant le rôle éventuel de ZAP-70 dans l'auto-immunité sont issues des modèles murins.

Les souris SKG ont une mutation hypomorphe faux-sens dans la partie C-terminale du domaine SH2 de ZAP-70 qui diminue sa liaison à la chaîne ζ et la signalisation médiée par le TCR. Ces souris développent des arthrites inflammatoires et sont utilisées comme modèle de polyarthrite rhumatoïde, mais présentent aussi une hypergammaglobulinémie, des Ac anti-nucléaires et des titres élevés de facteur rhumatoïde (Sakaguchi et al., 2003). Des mutations hypomorphes dans le domaine catalytique de ZAP-70 entraînent un déficit immunitaire T sévère associé à des anomalies du développement des LTreg, la production d'Ac anti-ADN et une hyper-IgE (Siggs et al., 2007).

Ces mutations sont responsables d'un défaut de signalisation par le TCR et entraînent une altération de la sélection positive et négative des thymocytes avec échappement et survie de LT auto réactifs en périphérie qui, en réponse à des stimuli endogènes, contribuent au développement de divers auto-Ac. Une altération de l'ontogénèse et de la fonction des LT régulateurs a aussi été suggérée (Sakaguchi et al., 2012). Ainsi, ces données murines suggèrent que des mutations hypomorphes de ZAP peuvent mener à l'apparition paradoxale de phénomènes auto-immuns et d'un déficit immunitaire.

Chez l'Homme, jusqu'à récemment, un lien éventuel entre mutations de ZAP-70 et manifestations auto-immunes était peu clair.

A ce jour, 16 mutations différentes ont été répertoriées, la grande majorité étant de type faux-sens, survenant sur le domaine kinase, et altérant quantitativement et/ou qualitativement l'expression de ZAP-70 sur son activité catalytique et sa stabilité protéique (Chan et al., 2016; Liu et al., 2017; Schim van der Loeff et al., 2014; Shirvani et al., 2017). Ces mutations entraînent un déficit sélectif en CD8⁺ avec des taux de CD4⁺ circulants normaux ou augmentés, mais peu ou pas fonctionnels, rendant les patients beaucoup plus sensibles aux infections (bactériennes, virales et fongiques) (Schim van der Loeff et al., 2014). Le phénotype est très hétérogène car corrélé à l'activité résiduelle de ZAP-70. Ainsi, dans les cas de déficit total, ceci se manifeste dès les premiers mois de vie avec des infections récurrentes graves, similaires aux patients avec déficit immunitaire combiné sévère (Fischer et al., 2010).

A la différence des modèles murins, les patients avec des mutations hypomorphes de ZAP-70 ne semblaient pas présenter de manifestations auto-immunes significatives. Toutefois, certains patients présentaient un colite et/ou un purpura thrombopénique immunologique (PTI) (Poliani et al., 2013; Turul et al., 2009) et les dernières cas décrits sont associés avec des phénotypes auto-immuns.

Ainsi, Shirvani et al., rapportent le cas d'un enfant de 3 ans avec une nouvelle mutation de ZAP-70 (p.Asp521Asn), se manifestant par des infections ORL à répétition dès le 5^e mois de vie, associées à un eczéma récurrent et un PTI (Shirvani et al., 2017).

Un nouveau syndrome auto-immun, causé par 2 mutations combinées de ZAP-70, a été rapporté chez un frère et une sœur développant une hémophilie par auto-Ac anti-facteur VIII, une pemphigoïde bulleuse réfractaire, une colite et un syndrome néphrotique (Chan et al., 2016). Il n'existait pas de déficit immunitaire chez les deux patients. La première mutation dans la partie C-terminale du domaine SH2 (R192W) était hypomorphe, réduisant la liaison de ZAP-70 à la chaîne ζ , alors que la deuxième mutation dans la partie N-terminale du domaine catalytique (5360P) était activatrice en réduisant le mécanisme d'auto-inhibition de ZAP-70 (cf. partie I.B.1). Ceci est le

premier cas décrit chez l'Homme de mutation activatrice de ZAP-70. Celle-ci nécessite toutefois l'association à la mutation hypomorphe pour entraîner le phénotype car les parents sont tous deux porteurs sains hétérozygotes composites des mutations respectives, suggérant que dans leur cas, l'allèle sauvage suffit à contrebalancer l'allèle mutée.

Enfin, le cas d'un enfant présentant dans sa première année de vie un eczéma récurrent, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin cortico-dépendante et des infections pulmonaires à répétition a été récemment rapporté (Liu et al., 2017). Il était porteur de deux nouvelles mutations hétérozygotes composites de ZAP-70, l'une sur la partie C-terminale du domaine SH2 résultant en la création d'un codon stop prématuré (c.598-599delCT p.L200fsX28), l'autre de type non-sens dans l'inter domaine B (c.847 C>T, R283H), responsables d'une réduction du niveau d'expression et de modifications conformationnelles importante de la protéine. Il est intéressant de constater que chez ce patient, le nombre de LT follicular helpers et de LTreg était diminué, le taux d'IL-17 augmenté et ceux d'IFN- γ , d'IL-4, et d'IL-21 abaissés.

Le lien physiopathologique entre déficit en ZAP-70 et auto-immunité est imparfaitement connu.

Les cellules stromales thymiques jouent un rôle crucial dans l'ontogénie B. En particulier, les cellules épithéliales thymiques corticales (cTECs) permettent la différenciation et la sélection positive des thymocytes, alors que les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs) et les cellules dendritiques (DCs) de la médulla participent à la sélection négative des LT auto-réactifs via l'expression de AIRE et la présentation de différents peptides du soi, ainsi qu'à la génération de LTreg. Un défaut de ZAP-70 chez l'Homme est associé à un défaut de différenciation terminale des mTECs et à une réduction du nombre de mTECs AIRE⁺, ainsi qu'à une déplétion des DCs et des LTregFOXP3⁺ thymiques (Poliani et al., 2013) (Figure 16).

D'autre part, les LT ZAP-70 KO en périphérie présentent une stéréotypie de certaines famille V β , ce qui est observé dans de nombreuses maladies auto-immunes et peut refléter un défaut de régulation des LT. Ceci est renforcé par le fait que les LT ne parviennent pas à se différencier en Th2 et produisent significativement moins

d'IL10 et de TGF- β , levant ainsi une part de la régulation négative de l'activation des LT. De plus, un défaut de contrôle de la prolifération des CD4⁺ZAP-70^{-/-} peut survenir de par la réduction significative de l'apoptose médiée par FAS de ces cellules (Roifman et al., 2010).

Au total, un déficit en ZAP-70 entraîne une altération de la sélection positive et négative thymique et un profil d'expression génique pro-auto-immun, favorisant ainsi l'échappement et la survie de LT auto réactifs en périphérie et la prédisposition à la survenue de phénomènes auto-immuns.

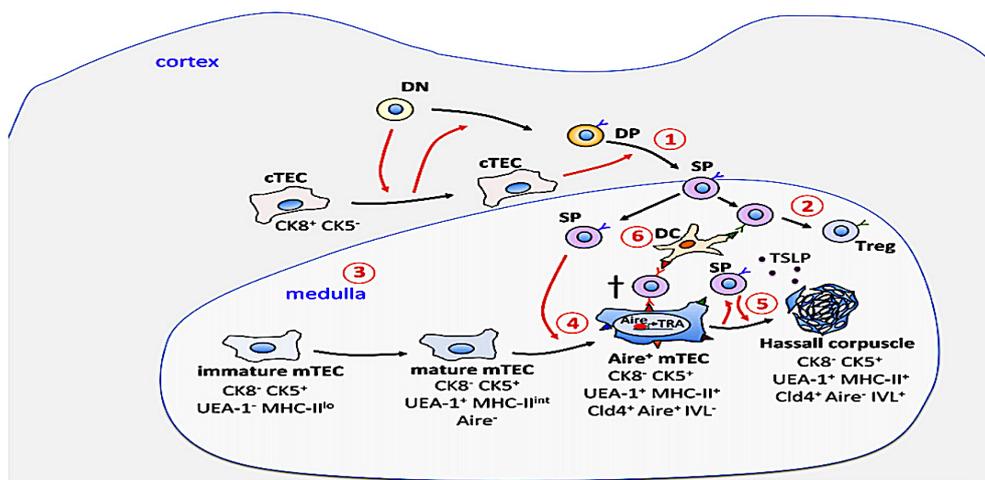


Figure 16. Interactions thymiques (flèches rouges) durant l'ontogénie T et anomalies observées dans les thymus des patients ZAP-70^{-/-} (chiffres entourés de rouge) (adapté de Poliani et al., 2013). (1) défaut de différenciation des CD8⁺ SP et altération fonctionnelle des CD4⁺ SP ; (2) réduction du nombre de LTregFOXP3⁺ ; (3) réduction de la taille de la medulla thymique ; (4) réduction du nombre de mTECsAIRE⁺ ; (5) défaut de différenciation terminale des mTECs dans les corpuscules de Hassall avec défaut d'expression d'IVL ; (6) réduction du nombre de DCs médullaires
CK, Cytokératine; cTEC, cortical thymic epithelial cell; DN, double-negative thymocyte; MHC-II, MHC class II antigen; SP, single-positive thymocytes; TRA, tissue-restricted antigen; TSLP, thymic stromal lymphopoietin.

2. ROLE DANS LES LB : LES CYTOPENIES AUTO-IMMUNES DE LA LLC

La LLC a la particularité de s'accompagner de divers phénomènes auto-immuns, pouvant survenir à tout moment au cours de l'évolution de la maladie, et même au cours de la phase pré-leucémique MBL.

Les mécanismes physiopathologiques sont multiples et complexes et encore partiellement connus à ce jour. Ils sont une voie de recherche importante du fait de leur implications pronostiques et thérapeutiques, notamment à l'ère des biothérapies ciblées.

Les principales manifestations auto-immunes rencontrées au cours de la LLC sont représentées par les CAI : l'anémie hémolytique auto-immune (AHAI), le purpura thrombopénique immunologique (PTI) et plus rarement l'aplasie érythrocytaire pure (ou PRCA pour pure red cell aplasia), la granulocytopenie auto-immune (ou AIG pour autoimmune granulocytopenia). D'autres complications auto-immunes rares sont aussi observées telles que le pemphigus paranéoplasique, l'angio-œdème neurotique acquis et la neuropathie périphérique à Ac anti-MAG (myelin-associated glycoprotein).

Ce chapitre se focalisera sur les CAI, en détaillant leur épidémiologie, leur diagnostic, les principaux mécanismes physiopathologiques et moyens thérapeutiques, puis précisera leur impact pronostique et le rôle de ZAP-70 dans la survenue de ces CAI dans la LLC.

A) EPIDEMIOLOGIE

La fréquence et l'incidence des CAI dans la LLC sont difficiles à estimer précisément car basées principalement sur des études rétrospectives de cohortes hétérogènes, incluant des patients naïfs de traitement et d'autres en stade avancé ou avec des LLC de plus mauvais pronostic. Or le type de LLC et certaines thérapeutiques sont des facteurs de risque de CAI (détaillé ensuite). De plus, la confirmation stricte du caractère auto-immun de ces cytopénies n'est pas toujours établie, notamment pour les PTI. Néanmoins, en tenant compte des études les plus récentes, 4-10 % des patients présenteront au moins une CAI au cours de leur LLC (Rogers and Woyach, 2016).

Parmi ces CAI, la plus fréquente est l'AHAI, représentant 55-70 % des cas (soit 10-15 % des LLC totales), suivie du PTI dans 18-57 % (5-15% des LLC) puis de la PRCA dans 12 % et de l'AIG dans 4 % (< 1 % des LLC pour ces deux dernières complications) (Rogers and Woyach, 2016).

Ces CAI peuvent survenir isolément, se succéder avec des intervalles parfois de plusieurs années, ou apparaître en association, notamment l'AHAI et le PTI qui, s'ils surviennent simultanément forment alors le syndrome d'Evans, représentant 9 % des cas de CAI (Duek et al., 2006).

B) DIAGNOSTIC

Les causes de cytopénies dans la LLC sont nombreuses et souvent intriquées (insuffisance médullaire par envahissement tumoral, hypersplénisme, toxicité des chimiothérapies, sepsis et auto-immunité). Ainsi, il est nécessaire d'être vigilant et d'explorer les diagnostics différentiels, notamment par des explorations médullaires, avant de conclure à une CAI, surtout dans les cas de thrombopénie et/ou de neutropénie.

(1) ANEMIE HEMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE SECONDAIRE

Le diagnostic d'AHAI est retenu sur la présence de l'ensemble des critères suivants (Visco et al., 2014) :

1. Hb < 11 g/dL en l'absence de tout médicament cytotoxique dans le mois précédent ou d'autre étiologie identifiée
2. Au moins 1 signe d'hémolyse parmi : hyperbilirubinémie non conjuguée sans atteinte hépatique sous-jacente, élévation des LDH sans autre cause identifiée, baisse de l'haptoglobine, hyper-réticulocytose (en valeur absolue) en l'absence de saignement
3. Mise en évidence d'un mécanisme auto-immun : soit par un test de Coombs direct (TCD) positif en IgG ou C3d, soit par la détection d'agglutinines froides

Toutefois, dans la LLC, le diagnostic AHAI peut être complexe. En effet, la réticulocytose peut être absente en cas d'infiltration médullaire tumorale importante et/ou de toxicité chimio-induite, et un taux élevé de LDH pouvant être plutôt le reflet de la masse tumorale.

Un TCD positif n'est pas toujours prédictif d'une AHAI. Ainsi, parmi 36 patients en stade Binet A avec un TCD positif, seuls 31 % développaient une AHAI sur une durée de suivi de 91 mois (Quinquenel et al., 2015). De plus, le TCD peut être faussement négatif dans 1-10 % des cas d'AHAI, en lien avec la présence d'IgA anti-érythrocytes (les anti-IgA ne sont pas utilisés en routine dans le TCD), ou d'auto-Ac de faible affinité ou encore à leur faible nombre à la surface des érythrocytes, en deçà du seuil de détection (400 Ig/érythrocyte) (Visco et al., 2014). Dans ces cas, un TCG à l'anti-IgA est recommandé ainsi que d'autres tests plus sensibles, en particulier le TCD avec stimulation mitogénique qui est une méthode fonctionnelle semi-quantitative estimée 6 fois plus sensible pour la détection des AHAI dans la LLC, comparativement au TCD standard (Barcellini et al., 2002).

(2) PURPURA THROMBOPENIQUE IMMUNOLOGIQUE (PTI)

Bien qu'une thrombopénie isolée dans la LLC soit assez évocatrice d'un PTI, car une anémie arégénérative accompagne ou précède le plus souvent la thrombopénie en cas d'insuffisance médullaire, le diagnostic de PTI est un diagnostic d'exclusion dans les causes des thrombopénies dans la LLC et nécessite classiquement la réalisation d'une exploration médullaire.

Ainsi, un PTI dans la LLC est défini par la conjonction de l'ensemble des critères suivants (Visco et al., 2014a) :

1. Chute du taux de plaquettes < 100 G/L non expliqué
2. Absence de splénomégalie palpable ou d'insuffisance médullaire
3. Mégacaryocytes en nombre normal ou augmenté dans la moelle osseuse
4. Absence de traitement cytotoxique dans le mois précédent
5. Exclusion des autres causes de thrombopénie : dysplasie mégacaryocytaire, infections, médicamenteuse, purpura thrombotique thrombocytopénique, thrombopénie induite à l'héparine et coagulation intravasculaire disséminée

Il est à noter toutefois que l'évaluation du nombre de mégacaryocytes dans les stades Binet C'est parfois difficile du fait de l'envahissement médullaire tumoral. Dans ces cas, le caractère auto-immun de la thrombopénie et leur destruction périphérique peuvent être suspectés devant l'absence de réponse aux transfusion plaquettaire et/ou à une réponse rapide (< 1 semaine) à de fortes doses d'Ig intraveineuses (Neunert et al., 2011).

A la différence du TDC, la mise en évidence d'un mécanisme auto-immun n'est pas requise en pratique clinique pour le diagnostic de PTI car, bien que de nombreuses techniques de détection des auto-Ac aient été développées (voir pour revue Curtis and McFarland, 2009), elles sont limitées par leur faibles sensibilité (45 % à 60 %) et spécificité, pouvant être observée à la fois dans les thrombopénies auto-immunes et

non auto-immunes (Kuwana et al., 2006; McMillan, 2003). Le défaut de sensibilité peut être dû à une clairance très rapide des complexes immuns dans la rate, à une association forte de la liaison Ag plaquettaire/auto-Ac rendant la détection de l'auto-Ac difficile ou encore à des isotypes non détectés dans les tests. La faible spécificité est notamment liée à la liaison aspécifique des Ag plaquettaires avec les Ac naturel poly spécifiques ou d'autre protéines sériques (Curtis and McFarland, 2009). Une nouvelle méthode de cytométrie (FCIA pour Flow cytometric immunobead array) a été proposée dans le PTI primaire pour la détection à la surface des plaquettes isolées et lysées, des auto-Ac dirigés contre les principaux Ag (GPIb, GPIIb, GPIIIa, GPIX, P-sélectine) (He et al., 2013). Cette méthode semble supérieure à la technique de référence actuelle MAIPA (Monoclonal antibody immobilization of platelet antigens) en termes de sensibilité et de spécificité (96 % vs. 44 % et 80,9 % vs. 64,7 % respectivement). Une version simplifiée de cette technique permettant la détection sérique des auto-Ac et non plus à partir de plaquettes isolées et lysée a été récemment publiée par la même équipe et semble montré des performances comparables (Zhao et al., 2015). Toutefois, ceci n'a pas été validé dans la LLC à ce jour.

(3) APLASIE ERYTHROCYTAIRE PURE (PRCA)

Le diagnostic de PRCA, bien que survenant dans moins de 1 % des LLC, doit être évoqué chez tout patient LLC avec anémie et réticulocytopénie.

Cela reste toutefois un diagnostic d'élimination après exclusion des autres causes plus classiques d'anémie, notamment hémolytiques, carentielles et l'hypothyroïdie.

Une aspiration médullaire de bonne qualité est essentielle afin d'éliminer aussi un syndrome myélodysplasique associé, notamment chez les patients âgés.

Des critères diagnostiques sont proposés sans qu'il n'existe toutefois de réel consensus (D'Arena et al., 2013; Visco et al., 2014a; Zent et al., 2008) :

1. Anémie marquée normocytaire et normochrome non expliquée
2. Réticulocytopenie (en nombre absolu)
3. Déficit sélectif en précurseurs érythroïdes médullaires ($\leq 1\%$) avec production leucocytaire et mégacaryocytaire globalement conservée
4. Absence d'infection concomitante par Parvovirus B19 (recherchée par PCR), EBV, VIH, VHB ou encore VHC
5. TCD négatif
6. Absence de stigmates d'hémolyse
7. Plus de 4 à 8 semaines depuis la dernière chimiothérapie

(4) GRANULOCYTOPENIE AUTO-IMMUNE (AIG)

De même que la PRCA, elle constitue une complication rare de la LLC mais doit être évoquée chez tout patient LLC avec neutropénie isolée persistante et non expliquée. Elle reste aussi un diagnostic d'exclusion et sa définition assez arbitraire (D'Arena et al., 2013) :

1. Neutropénie persistante et inexpliquée
2. Cellularité médullaire normale ou augmentée avec blocage tardif de la maturation des granulocytes
3. Présence d'Ac anti-neutrophiles (par méthode indirecte, plus sensible)
4. Plus de 4 à 8 semaines depuis la dernière chimiothérapie

Son diagnostic nécessite aussi d'exclure les autres causes de neutropénie, telles que la leucémie à larges lymphocytes granuleux (LGL) qui est associée dans 5 % des cas à une hémopathie maligne lymphoïde et un facteur de risque indépendant de CAI (Lamy et al., 2017), mais aussi des maladies auto-immunes hors CAI et les neutropénies congénitales.

La technique de détection des anti-neutrophiles est non standardisée à ce jour et manque de sensibilité et de reproductibilité, même si la méthode indirecte semble fournir de meilleurs résultats. Il est ainsi conseillé de répéter la recherche mensuellement sur une période de 4-6 mois en cas de négativité. Toutefois, ceci n'a été évalué que dans la population pédiatrique et hors LLC (Fioredda et al., 2011).

C) PHYSIOPATHOLOGIE

La physiopathologie des CAI dans la LLC est complexe et multifactorielle. Elle fait principalement intervenir des auto-Ac dirigés contre les membranes des érythrocytes, plaquettes et granulocytes.

Outre ces auto-Ac, d'autres mécanismes sont potentiellement impliqués, tels que l'inhibition de la maturation médullaire érythrocytaire, mégacaryocytaire et granuleuse par les LT auto réactifs et les cellules NK (cytotoxicité directe et/ou sécrétion de cytokines inhibitrices), entraînant une PRCA, et participant aux PTI et aux neutropénies respectivement.

Une dysrégulation du microenvironnement et des LT induite par des facteurs solubles sécrétés par les LB LLC est aussi rapportée. Un résumé des principaux mécanismes des CAI dans la LLC est proposé en Figure 17.

(1) IGG POLYCLONALES AUTOREACTIVES ISSUES DES LB NON TUMORAUX

Plus de 90 % des CAI dans la LLC sont dues à la présence d'IgG polyclonales de haute affinité produites par les LB non tumoraux, dirigées contre les membranes des érythrocytes, plaquettes et granulocytes (Hamblin et al., 1986). De par leur fixation sur les cellules, elles vont entraîner leur opsonisation et leur clairance accélérée par le système réticulo-endothélial splénique et les cellules de Küpffer hépatiques, et/ou leur lyse médiée par le complément.

La présence et le rôle potentiellement pathogène auto-immun des LB non tumoraux résiduels dans la LLC a été initialement démontré dans des expérimentations de greffe exogénique. Ainsi, Kobayashi et al. ont injecté des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de patients LLC à des souris SCID. Bien que les LB non tumoraux représentassent moins de 0,1 % des PBMC injectés, les souris ont développé entre 8 et 16 semaines post-greffe des IgG humaines dirigées contre les érythrocytes humains. De même que les auto-Ac pathologiques observés chez les patients LLC, ces auto-Ac humains produits par les souris SCID étaient produits par les LB circulants non tumoraux sans lien clonal avec les LB LLC transfectés (Kobayashi et al., 1992).

(2) LES LB LLC COMME CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENE

Le mécanisme par lequel les LB non tumoraux produisent les auto-Ac est un processus multi-étapes, initié par les LB LLC jouant le rôle de CPA.

Le cas de l'AHAI a été le plus étudié. De manière générale, la production d'IgG de haute affinité par les LB est un mécanisme T-dépendante et il en est de même pour la production d'IgG auto-réactifs. Ainsi, il a été démontré dans les AHAI primaires que les LB non tumoraux étaient capables de produire des IgG anti-érythrocytes suite à l'interaction avec des LTh auto réactifs, activés spécifiquement par une plus forte

présentation des épitopes des protéines Rh par les CMHII des CPA (Barker et al., 1997; Perry et al., 1996). En effet, des LTh spécifiques de différents auto-antigènes, incluant Rh, étant détectés chez les personnes sans AHAI ni TCD positif (Barker and Elson, 1994), ceci suggère que l'activation de ces LTh fait suite à une altération de la fonction des CPA ou du type de présentation des épitopes.

Il a été démontré que les LB LLC étaient capables d'avoir une activité CPA pour des épitopes de l'antigène RhD, entraînant l'activation et l'expansion de LTh auto réactifs spécifiques, et ainsi d'initier l'activation et la prolifération de LB non tumoraux et leur différenciation en plasmocytes sécréteurs des IgG polyclonales anti-érythrocytes. L'Ag RhD était capable d'entraîner une réponse plus intense des LTh en présence de LB LLC qu'en présence d'autres CPA issues des PBMC. Ceci n'était par contre pas observé pour des dérivés protéiques purifiés de Rh, suggérant un effet spécifique de l'Ag Rh sur le rôle de CPA des LB LLC. Ceci est en accord avec les données générales reconnaissant les LB LLC comme étant plutôt classiquement de faibles CPA pour des Ag conventionnels allogéniques (Dazzi et al., 1995). Une explication possible de la forte stimulation des LTh par les LB LLC serait l'exposition d'épitopes cryptiques de l'auto-Ag Rh, connus pour initier des AHAI (Barker and Elson, 1994; Perry et al., 1996).

Plus récemment, la protéine de transport anionique Band 3 a été suggérée comme un autre Ag majeur impliqué dans l'AHAI de la LLC (Galletti et al., 2008), notamment par sa liaison préférentielle au récepteur HMGN2 (high-mobility group nucleosome-binding protein 2) à la surface des LB LLC, nécessaire à l'activation des LTh (Morande et al., 2015).

La présentation Ag par les LB LLC est favorisée dans les stades avancés de la maladie, notamment du fait de l'infiltration splénique plus importante par les LB tumoraux, favorisant ainsi leurs interactions avec les Ag des érythrocytes, mais aussi plaquettaires, en cours de clairance physiologique dans le système réticulo-endothélial (Mauro et al., 2000).

(3) IGM MONOCLONALES ISSUES DES LB LLC

Dans moins de 10 % des CAI au cours de la LLC, l'auto-Ac produit est une IgM monoclonale, directement issue des LB LLC (Hamblin et al., 1986). Ceci s'observe notamment dans le cas de la maladie des agglutinines froides où l'IgM (principalement de type kappa) est dirigée contre l'Ag I/i des érythrocytes et entraîne une hémolyse intravasculaire.

(4) POLYREACTIVITE DU BCR ET SELECTION AG

La configuration du BCR et sa stimulation par des auto-Ag semblent aussi jouer un rôle important dans la survenue des CAI au cours de la LLC. Ainsi, il a été observé une association entre certaines stéréotypies du BCR et la survenue d'AHAI et de PTI.

Dans une étude rétrospective récente, la survenue d'un PTI était associée au statut non muté des IGHs, à l'altération génétique défavorable del(11)(q23) et à une stéréotypie des séquences HCDR3. Parmi ces stéréotypies, les sous-groupes #1 (IGHV1-5-7/IGHD6-19/IGHJ4) et #7 (IGHV1-69 ou IGHV3-30/IGHD3-3/IGHJ6) étaient observés dans 30 % des cas de PTI et constituaient des facteurs de risque indépendants du statut mutationnel (Visco et al., 2012).

Dans une autre étude rétrospective portant sur 585 patients LLC, Maura et al. ont montré que le statut non muté des IGHVs et les altérations génétiques défavorables del(17)(p13) et del(11)(q23) étaient des facteurs de risque indépendants d'AHAI et de sa survenue plus précoce. De même, une stéréotypie du BCR, et notamment le groupe #3 (IGHV1-69 et IGHV4-30/IGHD2-2/IGHJ6), était aussi plus fréquemment observée en cas d'AHAI mais, à la différence de l'étude précédente, ceci n'était plus significatif en analyse multivariée, probablement du fait du faible effectif (Maura et al., 2013). De plus, la plus forte prévalence du motif DFWSGY de la HCDR3 rapportée dans les cas de LLC avec AHA (Efremov et al., 1996) n'était ici pas significative. Dans ces deux études, à l'exception de la séquence IGHD6-19 pour le

PTI (Visco et al., 2012), il n'a pas été observé d'autre association significative entre l'utilisation préférentielle des gènes IGH V-D-J et la survenue d'une AHAI et/ou d'un PTI.

Ainsi, il semblerait que les LLC-NM, caractérisés par un BCR polyréactif capable de lier de multiples (auto)Ag, puissent promouvoir et faciliter le développement de CAI. Inversement, les LLC-M ont plutôt un profil anergique et sont associés à un plus faible risque de développer des CAI. De plus, l'association entre une stéréotypie du BCR et la survenue de CAI et notamment du PTI, suggère le rôle pathogène d'une activation du BCR par un ou des antigènes spécifiques.

(5) ALTERATION DE LA BALANCE LTREG/LTH17

Le compartiment T est clairement altéré dans la LLC et participe à la survenue des manifestations auto-immunes de cette maladie.

Les LTreg jouent un rôle crucial dans la suppression des réponses auto-immunes (Vila et al., 2009). Étonnamment, dans la LLC, plusieurs études montrent que les LTreg seraient au contraire augmentés (Lad et al., 2013, 2015; Riches et al., 2010), et particulièrement dans les cas de CAI (Lad et al., 2013, 2015) où un taux élevé au diagnostic est associé à la survenue de CAI (Lad et al., 2013). Les raisons de cette augmentation ne sont pas connues à ce jour. Ceci pourrait être le reflet d'un microenvironnement tolérogène induit par les LB LLC afin de favoriser leur expansion clonale, et/ou un dysfonctionnement des LTreg notamment de par des interactions cellule-cellule CD27-CD70 (Visco et al., 2014a).

Le développement des LTreg et des LTh17 est mutuellement exclusif et dépend du milieu cellulaire. Dans une étude récente comparant les taux de LTreg et LTh17 dans des LLC avec ou sans CAI, il a été montré que les nombres absolus des deux populations étaient significativement augmentées dans le groupe avec CAI, mais que seuls les LTh17 l'étaient aussi en proportion (Lad et al., 2015). Au final, le ratio LTh17/LTreg étant basculé en faveur des LTh17 en cas de CAI, il est suggéré que les LTh17 pourraient aussi jouer un rôle prépondérant dans la survenue de CAI dans la

LLC, à l'instar d'autres pathologies auto-immunes (Han et al., 2015), ce qui est aussi évoqué dans les CAI hors LLC (Ye et al., 2015; Xu et al., 2012).

(6) RÔLE DES TLRs

Les TLRs, outre leur rôle prépondérant dans l'immunité innée, sont aussi des initiateurs de l'immunité adaptative et notamment de l'activation des LB non tumoraux. Il est clairement démontré que, sous certaines conditions, la reconnaissance par les TLRs de PAMPS (pathogen-associated molecular patterns), de DAMPS (damage-associated molecular patterns) ou encore de MAMPS (microorganism-associated molecular patterns) peut mener au développement de manifestations auto-immunes, et que ces ligands peuvent promouvoir la réponse inflammatoire innée inductrice de LT auto réactifs (voir pour revue (Mills, 2011)). Or, dans la LLC, il a été montré que l'expression des TLRs était altérée, avec une réduction des TLR2 et TLR4 et une augmentation des TLR9, TLR10 et TLR10 (Barcellini et al., 2014; Grandjenette et al., 2007; Muzio et al., 2009).

De plus, une réduction de l'expression de TLR4 (mARN et protéique) était associée à la survenue de CAI, indépendamment du stade clinique ou des thérapeutiques reçues (Barcellini et al., 2014), suggérant l'implication de TLR4 dans l'inhibition de l'auto-réactivité dans la LLC. Toutefois, les faibles effectifs de l'étude n'ont pas permis de préciser si cette réduction d'expression était bien indépendante des facteurs de risque connus de CAI et/ou de progression clonale tels que le statut non muté des IGHVs, l'expression de ZAP-70/CD38 et les altérations cytogénétiques. Le lien physiopathologique entre TLR4 et auto-immunité est peu clair, mais il a été observé dans le PTI qu'une réduction de l'expression de TLR4 par les monocytes était associée à un défaut de différenciation des LTreg et de la production des cytokines inhibitrices IL-10 et TGF- β , au profit des LTh17 (Hao et al., 2017). Or, une anomalie du ratio LTh17/LTreg pourrait être impliquée dans la survenue de CAI comme vu précédemment (Lad et al., 2015; Ye et al., 2015; Xu et al., 2012).

La physiopathologie de la PRCA et de la neutropénie auto-immune est légèrement différente. Elles peuvent être dues à la présence d'auto-Ac polyclonaux et/ou monoclonaux dirigés contre les précurseurs érythroïdes à tous les stades de maturation, ou plus rarement contre le récepteur membranaire à l'érythropoïétine ou encore contre sa version endogène r-EPO.

Une destruction auto-immune des PNN via des auto-Ac anti-granuleux est aussi rapportée, mais la distinction entre des Ac-anti-HLA ou de vrais Ac anti-granuleux n'est pas toujours bien établie. Le mécanisme principal semble être lié aux LT et aux cellules NK. Ainsi, dans la LLC, il a été montré qu'il existe une surreprésentation médullaire de NK et de LT avec altérations fonctionnelles comparativement aux sujets sains, rebaptisées grands lymphocytes granuleux ou LGL. Des études *in vitro* dans la LLC ont montré que ces LGL inhibaient la croissance et la différenciation érythrocytaire et étaient incapables d'aider à la croissance des colonies de progéniteurs érythroïdes (BFU-E, burst-forming unit-erythrocyte) comme c'est classiquement le cas chez les individus sains (voir pour revue (D'Arena and Cascavilla, 2009). De même, il semblerait que ces LGL soient capables d'inhiber la croissance médullaire des précurseurs granuleux ou GMCFC (granulocyte-macrophage colony-forming cells).

Un mécanisme alternatif ou additif serait la destruction des précurseurs myéloïdes et des PNN via une apoptose médiée par FAS, dont le ligand (FAS-L) est anormalement exprimé de façon constitutive à la surface des LGL, contrairement aux LT cytotoxiques normaux où son expression est induite iniquement suite à leur activation (voir pour revue (Pontikoglou et al., 2011). Toutefois, ces données concernent principalement les leucémies à LGL non associées aux LLC, des études complémentaires sont ainsi nécessaires dans la LLC afin de confirmer une similarité physiopathologique.

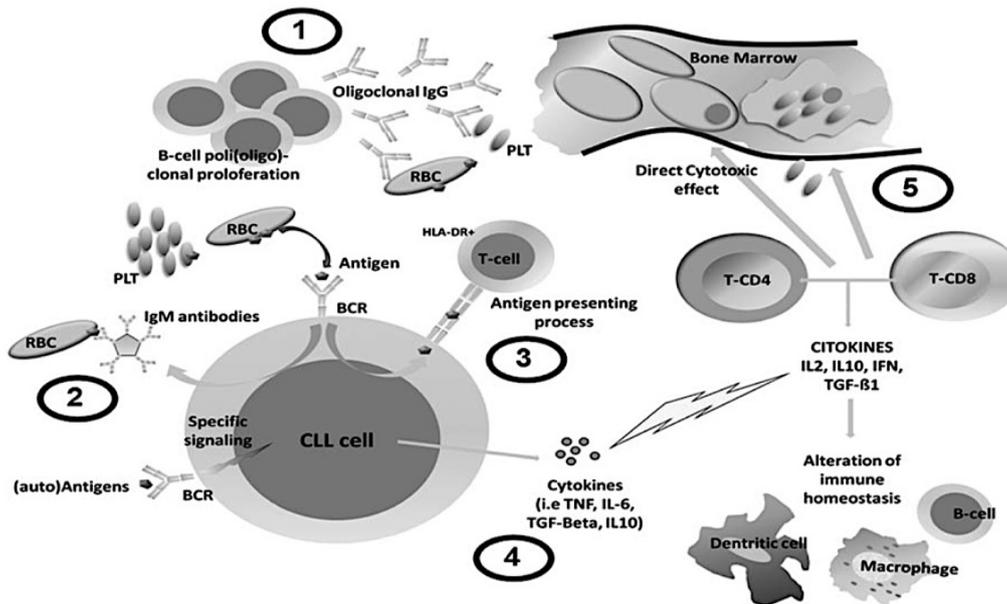


Figure 17. Principaux mécanismes pathogéniques impliqués dans la survenue de CAI dans la LLC (Visco et al., 2014a)

(1) Les CAI sont classiquement médiées par des auto-Ac de type IgG polyclonaux issus des LB non tumoraux (90 % des cas) qui accélèrent la clairance des érythrocytes et des plaquettes dans la rate et le foie ; (2) Dans 10 % des cas de CAI, l'auto-Ac est une IgM monoclonale issue du clone de LLC ; (3) Les LB LLC peuvent aussi agir comme des cellules présentatrices d'Ag, favorisant l'activation et la prolifération de LThelper autoréactifs et de LTreg mais ces derniers étant non ou peu fonctionnels ; (4) Les LB LLC peuvent aussi sécréter des cytokines immunosuppressives telles que TGF- β et IL-10 suite à leur stimulation par des signaux externes ; (5) les LT autoréactifs et les cellules NK peuvent interférer avec la maturation des mégacaryocytes et des érythroblastes dans la moelle osseuse par l'intermédiaire de cytokines inhibitrices et/ou par cytotoxicité directe.

D) IMPACT PRONOSTIQUE ET FACTEURS DE RISQUE

Dans les systèmes de classification de Binet et de Rai, encore couramment utilisés à ce jour en pratique clinique, la présence de cytopénie(s) est associée à un moins bon pronostic de la LLC, en lien avec une maladie à un stade plus avancé.

Toutefois, ces deux systèmes ne distinguent pas les cytopénies d'origine auto-immune de celles par insuffisance médullaire en lien avec une progression de la LLC. Ainsi, des patients peuvent être classés dans le même stade alors que l'étiologie de leur cytopénie diffère, de même que leur pronostic et la décision thérapeutique. Ceci a été pris en compte dans les recommandations internationales du NCIWG (National

cancer Institute Working Group) de 2008 qui requièrent dans ces classifications que les cytopénies soient dues à une infiltration médullaire de la LLC (Hallek et al., 2008).

L'impact pronostic réel des CAI dans la LLC est toutefois difficile à apprécier et reste débattu à ce jour. La méthode d'évaluation de l'impact des CAI sur la survie globale peut varier selon les études, certaines intégrant le temps depuis le diagnostic de la LLC (pouvant précéder de plusieurs années la survenue des CAI), d'autres depuis le début des CAI. De plus, le délai est très variable entre le diagnostic de LLC et la survenue de l'AHAI ou du PTI, ce dernier apparaissant plus précocement lorsque la LLC est quiescente alors que l'AHAI est plus fréquemment observée lors de LLC plus avancées ou progressives (Visco et al., 2014). Enfin certains traitements spécifiques de la LLC ont aussi été suggérés comme facteurs de risque de la survenue de CAI, notamment la fludarabine, en favorisant les AHAI (Weiss et al., 1998) et doivent donc être pris en compte dans les analyses multivariées évaluant l'impact des CAI sur la survie globale.

Malgré ces difficultés, il semblerait que les patients avec CAI au diagnostic de LLC (stade C « immun ») aient un pronostic plus favorable que ceux présentant des cytopénies en lien avec un envahissement médullaire (stade C « infiltratif ») (Moreno et al., 2010). De même, la médiane de survie depuis l'apparition des CAI est significativement plus grande chez ces patients avec CAI que ceux avec cytopénies par insuffisance médullaire (Zent et al., 2008). Il semble toutefois que la présence de CAI confère un pronostic « intermédiaire », la survie des stades C « immuns » restant inférieure à celle des patients en stade A sans CAI et soit plutôt de l'ordre des patients en stade B (Visco et al., 2014b; Zent et al., 2008).

Concernant spécifiquement l'AHAI, les résultats sont discordants. Une étude a rapporté que l'AHAI n'avait pas d'impact sur la survie globale (Mauro et al., 2000). A l'opposé, Dearden et al., ont évalué l'impact pronostic d'un TCD positif et/ou d'une AHAI au moment de l'initiation d'un traitement pour la LLC et ont montré qu'un TCD positif était lié à une moins bonne réponse au traitement de la LLC et, qu'associé à une AHAI, cela constituait un facteur mauvais pronostic avec une plus faible survie globale (Dearden et al., 2008).

Toutefois, cette dernière étude inclue des patients à pronostic plus sévère nécessitant un traitement de la LLC, ce qui n'est pas généralisable aux patients avec LLC avec AHAI sans indication de réduction tumorale. Une étude récente a montré que les facteurs de risque indépendants de développer une AHAI étaient le statut non muté des IGHVs et/ou les altérations génétiques défavorables del(17)(p13) et del(11)(q23) (Maura et al., 2013), eux-mêmes étant des facteurs pronostiques péjoratifs bien connus dans la LLC (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999; (Döhner et al., 1997); Zenz et al., 2010b).

Concernant le PTI isolé, les données sont moins nombreuses. Toutefois, dans une large étude rétrospective portant sur 1 268 patients avec LLC nouvellement diagnostiquée, à l'inverse de l'AHAI, la présence d'un PTI au diagnostic (confirmé par exploration médullaire) était un facteur pronostique péjoratif, avec une survie globale similaire à celle des patients en stade IV de Rai (thrombopénie < 100 G/L en lien avec une infiltration médullaire par la LLC). L'analyse multivariée montrait que la survenue d'un PTI dans les 24 mois suivant le diagnostic de LLC ainsi que le caractère réfractaire du PTI constituaient des facteurs pronostiques péjoratifs indépendants sur la survie globale. Là encore, ceci semble lié à l'association non indépendante entre la survenue d'un PTI et le statut non muté des IGHVs (Visco et al., 2008).

Au final, malgré quelques résultats discordants, il semble que la survenue de CAI dans la LLC soit associée à une réduction de la survie globale. Une partie de cette association peut s'expliquer par un plus haut risque d'infections, de saignements et d'évènements cardiovasculaires en lien avec les CAI elles-mêmes ou leurs traitements (corticostéroïdes, immunosuppresseurs). Une hypothèse complémentaire et probablement majoritaire est que les CAI dans la LLC sont le reflet clinique d'un clone plus agressif. Ceci est renforcé par l'association quasi-constante des AHAI et des PTI avec le statut non muté des IGHs, l'hyper expression de CD38 et de ZAP-70 ainsi que les altérations génétiques défavorables del(17)(p13) et del(11)(q23) dans différentes séries indépendantes (Moreno et al., 2010, Maura et al., 2013; Visco et al., 2014; Shvidel et al., 2013; Mauro et al., 2000; Zanotti et al., 2010).

L'étude ayant montré pour la première fois et de façon robuste une association entre l'expression de -70 et la survenue de CAI dans la LLC est celle de Zanotti et al. en 2010 (Zanotti et al., 2010).

Ils ont analysé rétrospectivement les données de 290 patients LLC pour lesquels l'expression de ZAP-70 était déterminée par IHC sur des biopsies médullaires fixées.

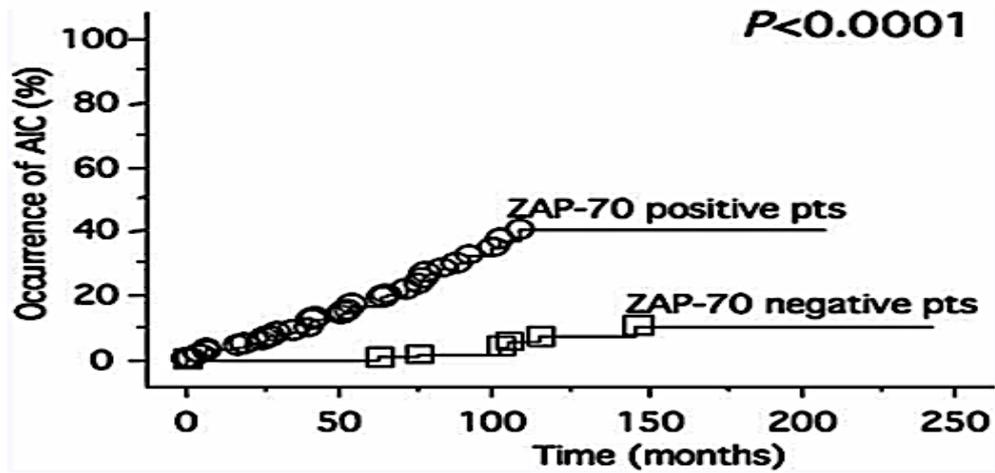
Ainsi, sur la durée moyenne de suivi de 80 mois, 16 % des patients développaient au moins une CAI. L'expression de ZAP-70 était le paramètre le plus discriminant entre les patients avec ou sans CAI, 80 % des patients avec CAI étant ZAP-70⁺ ($p < 0,0001$) en IHC. Le statut mutationnel des IGHVs était moins discriminant que l'expression de ZAP-70 ($p = 0,026$) avec la réserve toutefois qu'il n'a été évalué que chez 136 patients sur les 290 totaux. L'incidence cumulative projetée à 7 ans des CAI était de 30 % chez les patients ZAP-70⁺ vs 4 % chez les ZAP-70⁻ ($p < 0,0001$) (Figure 18. A).

Il est à noter que l'expression de ZAP-70 par IHC et par cytométrie en flux (avec un seuil de positivité de 20 %, cf. Figure 13 pour rappel de la méthode) était concordante dans 89 % des cas, et que seul 1 patient parmi les 22 avec CAI présentait des résultats discordants entre les 2 techniques, rendant ainsi peu probable un biais de résultats.

De plus, la survenue de CAI était associée à une réduction plus importante de la survie globale chez l'ensemble des patients mais ceci n'était plus significatif en analyse multivariée, à la différence de l'expression de ZAP-70.

De plus, la classification de l'ensemble des patients selon leur positivité pour ZAP-70 révélait que la survenue de CAI conférait un impact négatif sur la survie globale des patients ZAP-70⁺ (Hazard ratio = 1,75 ; IC 95% : 1,06 - 2,86) mais pas chez les patients ZAP-70⁻ (Figure 18.B) suggérant une interaction additive délétère entre ZAP-70 et les CAI dans la LLC.

A



B

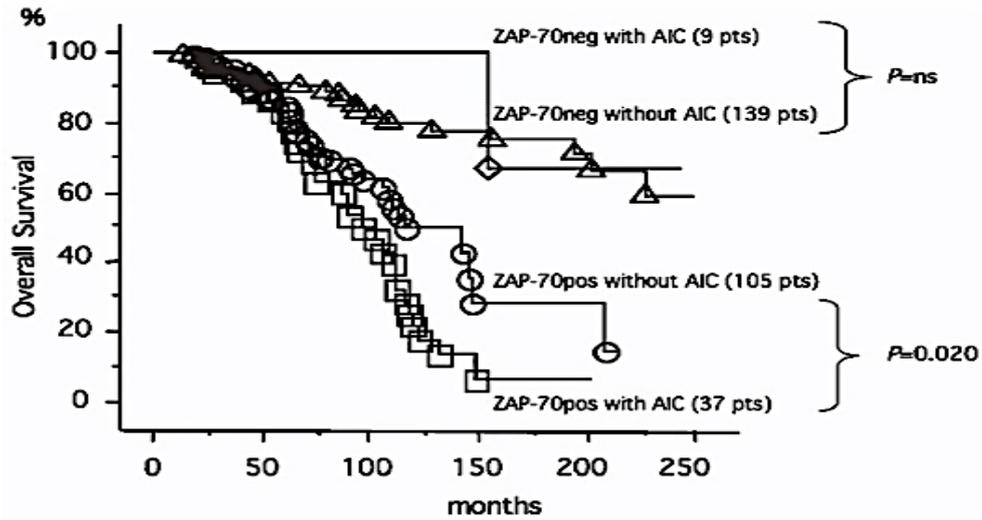


Figure 18. Relations entre l'expression de ZAP-70 et la survenue de cytopénies auto-immunes (CAI) dans la LLC (sur 290 patients) (Zanotti et al. 2010).

Fréquence des CAI et durée d'apparition des CAI depuis le diagnostic de LLC selon l'expression de ZAP-70 sur 290 patients

Survie globale selon l'apparition de CAI et l'expression de ZAP-70

E) TRAITEMENT

Il n'existe pas à ce jour d'essais randomisés évaluant les différentes thérapeutiques des CAI associées à la LLC. Ainsi, les informations et recommandations proposées proviennent d'études de cohortes pour la plupart rétrospectives. Il a été proposé en 2010 une classification des CAI de la LLC en deux groupes : CAI simples (survenant dans un contexte de LLC avec masse tumorale stable) et CAI complexes (en contexte de LLC évolutive). Le premier groupe doit être pris en charge comme les patients avec CAI primitives, alors que les CAI complexes nécessitent un traitement spécifique de la LLC.

Une voie d'avenir concerne la place des thérapeutiques inhibant spécifiquement les voies d'activation du BCR dans les CAI de la LLC, mais des études sont en cours.

En cas de rechute des CAI à distance de l'arrêt des thérapeutiques, il est préconisé de reprendre le traitement initial en 1^{ère} intention.

(1) AHAI ET PTI

Les schémas thérapeutiques sont globalement semblables pour l'AHAI et le PTI.

En cas d'AHAI simple, il est classiquement proposé en 1^{ère} intention des glucocorticoïdes à la dose de 1 mg/kg durant 2-4 semaines puis réduite progressivement par paliers avec un sevrage progressif en quelques mois. Une supplémentation en acide folique et une prophylaxie anti-infectieuse sont aussi recommandées. La dexaméthasone séquentielle a montré de bons résultats dans les AHAI primaire mais n'a pas été évaluée dans les AHAI associées à la LLC.

En cas de CAI corticodépendantes ou réfractaire ou en rechute précoce, le rituximab est alors classiquement en traitement de 2^e intention à la dose de 375 mg/m² hebdomadaire pendant 1 mois, avec des taux de réponse de 70 % à 100 %. Bien que validé par la Food and Drug Administration, l'expérience concernant l'utilisation de l'ofatumumab dans les CAI de la LLC est très limitée à ce jour. L'alemtuzumab semble aussi efficace mais au prix d'un risque infectieux plus important, rendant son utilisation limitée aux cas réfractaires aux traitements précédents. La ciclosporine A ou l'azathioprine ont aussi été proposés en 2^e intention à visée d'épargne cortisonique. Enfin, la splénectomie, bien qu'efficace, va encore majorer le risque infectieux qui est déjà augmenté chez les patients LLC du fait des altérations de l'immunité cellulaire et humorale intrinsèques à la LLC (cf. partie II. G) et est donc discutée au cas par cas.

Dans les cas de CAI multi-réfractaires ou complexes, une immunochimiothérapie est indiquée, permettant de cibler à la fois les LB LLC et les mécanismes des CAI. Différentes combinaisons sont possibles, telles que RCD (rituximab-cyclophosphamide-dexaméthasone ou RB (rituximab-bendamustine) avec des taux de réponse comparables. Les associations contenant de la fludarabine sont classiquement déconseillées du fait des données assez anciennes suggérant un risque de CAI induites par la fludarabine (Weiss et al., 1998) bien que des données plus récentes en association avec d'autres chimiothérapies et anti-CD20 ne semblent pas montrer de sur-risque (Hallek et al., 2010).

Les options thérapeutiques du PTI dans la LLC sont globalement les mêmes que celles de l'AHAI. A l'instar du PTI primaire, il convient d'instaurer un traitement pour des chiffres plaquettaires < 20-30 G/L voir < 50 G/L en cas de traitement anticoagulant et/ou antiagrégant. Les agonistes des récepteurs de la thrombopoïétine (eltrombopag et romiplostim) semblent aussi montrer des résultats très intéressants dans les rares études rétrospectives des PTI secondaires à la LLC avec de bons profils de sécurité, et permettent notamment de limiter voir d'éviter la prise d'immunosuppresseurs et ainsi de ne pas augmenter le risque infectieux chez ces patients (D'Arena and Cascavilla, 2011; Koehrer et al., 2010).

La prise en charge thérapeutique de la PRCA et de l'AIG dans la LLC diffère de celle de l'AHAI et du PTI. Les objectifs sont respectivement de restaurer l'érythropoïèse et la granulopoïèse en limitant d'une part les risques à long terme des transfusions itératives de concentrés de globules rouges les risques infectieux notamment fongiques.

La PRCA secondaire à la LLC est classiquement peu sensibles aux corticoïdes. De même que la PRCA primitive ou associée à d'autres pathologies, le traitement de 1^{er} choix dans la LLC est la ciclosporine, avec un taux de réponse observé > 75 %, objectivé par l'apparition de réticulocytes circulants en 2 à 3 semaines, mais nécessitant le plus souvent une durée de traitement > 12 mois pour maintenir une rémission (Means, 2016) avec les risques induits d'hypertension artérielle et d'insuffisance rénale. Dans les cas réfractaires, l'efficacité de l'alemtuzumab (Willis et al., 2001) ou du RCD (Rossignol et al., 2011) a été rapportée mais ceci concerne un très faible nombre de cas.

La rareté de l'AIG, notamment secondaire à la LLC, fait que ses options thérapeutiques proviennent de description de cas. Bien que certaines AIG puissent se résoudre spontanément, la plupart des patients nécessitent une prophylaxie anti-infectieuse et la mise sous G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) dès que le taux de PNN est < 0,5 G/L, avec une efficacité variable et le plus souvent uniquement suspensive (Rosenwald et al., 2001). La ciclosporine, seule ou en association avec du rituximab semble avoir montré une efficacité mais au prix de complications infectieuses non négligeables (Chakupurakal et al., 2007; Costello and Sébahoun, 2010). L'alemtuzumab peut aussi être proposé en 2^e intention mais sans niveau de preuve (Willis et al., 2001).

Diverses manifestations auto-immunes, autres que les CAI, ont été rapportées dans la LLC mais le plus souvent sous forme de case-report ou de petites séries ne permettant pas d'étude précise du rôle de ZAP-70 dans ces complications (Hodgson et al., 2011).

Le pemphigus est une pathologie auto-immune cutanéomuqueuse bulleuse et érosive parfois d'origine paranéoplasique dont la LLC représente la plus fréquente des causes, devant les LMNH, LMH et la maladie de Castelman (Zhu and Zhang, 2007). Le mécanisme est peu clair mais il a été suggéré que les Ac monoclonaux issus du clone tumoral B reconnaissent par réaction croisée les Ag épidermiques (Wang et al., 2004) et/ou par extension de reconnaissance antigénique (epitope spreading) (Zhu and Zhang, 2007). Des cas de polyneuropathies anti-MAG ont aussi été décrits, associées à la présence de paraprotéines d'isotypes IgG ou IgM et répondant au chlorambucil, sans que le lien physiopathologique soit clairement établi (Hodgson et al., 2011).

3. SYNTHÈSE : RÔLE DE ZAP-70 DANS L'AUTO-IMMUNITÉ

Son rôle semble très différent selon le type cellulaire impliqué.

Dans les LT où cette protéine est physiologiquement exprimée, ZAP-70 est fortement impliquée dans la sélection positive et négative thymique. Ainsi, un déficit en ZAP-70 entraîne un profil d'expression génique pro-auto-immun, favorisant ainsi l'échappement et la survie de LT auto réactifs en périphérie et la prédisposition à la survenue de phénomènes auto-immuns.

Dans la LLC, au contraire, son expression aberrante est associée à la survenue de CAI (AHAI, PTI, syndrome d'Evans) (Moreno et al., 2010, Maura et al., 2013; Visco et al., 2014a; Shvidel et al., 2013; Mauro et al., 2000; Zanotti et al., 2010). De plus, ces CAI confèrent un impact négatif sur la survie globale des patients ZAP-70⁺ mais pas chez les patients ZAP-70⁻, suggérant une interaction additive délétère entre ZAP-70 et les CAI dans la LLC (Zanzotto et al., 2010).

Là encore, bien que ces études démontrent le lien entre l'expression de ZAP-70 et la survenue de CAI dans la LLC, le lien physiopathologie reste peu clair. Étant donné que l'expression de ZAP-70 est associée à une hyper signalisation du BCR dans les LB LLC et que, de manière générale dans les LB, il est démontré qu'un défaut de régulation négative du BCR est corrélé à la survenue de manifestations auto-immunes (Nitschke, 2009; Pritchard and Smith, 2003; Schickel et al., 2012), l'expression de ZAP-70 dans les LB de LLC pourrait favoriser l'émergence de CAI. Toutefois, les données épidémiologiques vont à l'encontre de cette hypothèse, car seulement 10 % de ces CAI sont dues à une IgM monoclonale issue des LB LLC, 90 % des cas étant dus à des Ig polyclonales issues des LB non tumoraux résiduels, n'exprimant théoriquement pas ZAP-70.

D. RÔLE DE ZAP-70 DANS LES LB NON TUMORAUX

Comme détaillé précédemment, ZAP-70 est principalement exprimée physiologiquement dans les LT et les NK, et de façon anormale dans environ 50 % des LB tumoraux de LLC.

Des données robustes ont montré que l'expression de ZAP-70 jouait aussi un rôle dans l'ontogénie B précoce murine. Chez l'Homme, quelques papiers ont rapporté l'expression de ZAP-70 dans des LB non tumoraux, mais son rôle fonctionnel dans les LB reste totalement inconnu à ce jour.

1. ONTOGENIE B : LES MODELES MURINS

A) RAPPELS SUR L'ONTOGENIE B

L'ontogénie B et la signalisation médiée par le pré-BCR et le BCR sont très similaires entre l'Homme et la souris.

Brièvement, le développement lymphocytaire B débute dans la MO où les progéniteurs B vont initier la recombinaison des gènes des Ig, alors initialement en configuration germinale (voir pour revue (Herzog et al., 2009). Un résumé de l'ontogénie est proposé en Figure 19. Ceci débute par la recombinaison des fractions VDJ des gènes codant pour l'IGHV dès le stade du progéniteur lymphoïde commun (CPL) ou proB précoce. Les séquences DH-JH sont réarrangées en premier, suivies par VH-DJH au stade proB tardif, médié par le complexe protéique RAG1-RAG2 (recombination-activating gene 1 et 2), générant des cassures double brin de l'ADN entre ces segments de gènes qui sont reconnues comme des sites spécifiques de recombinaison. Un VHDJH productif sur les deux chromosomes constituent les chaînes Ig μ qui s'associent avec deux chaînes légères provisoires formées par les hétérodimères V μ préB et λ 5, et les sous-unités de signalisation intracellulaires Ig α et

Ig β . Ce complexe constitue le pré-BCR et est exprimé dès le stade de grande cellule préB (ou pré-B précoce).

L'expression d'un pré-BCR fonctionnel est un point de contrôle majeur dans l'ontogénie B. Il permet l'arrêt du réarrangement des IGHV assurant ainsi l'exclusion allélique, mais aussi permet l'expansion des pré-B et l'initiation du réarrangement des gènes des chaînes légères d'Ig (IGLV). L'expression d'un pré-BCR à la surface entraîne l'agrégation de multiples pré-BCR dû à la polyréactivité des sous-unités $\lambda 5$ qui lui permet de se lier avec différentes structures du microenvironnement et de former des complexes de pré-BCR. Ceci facilite l'activation du pré-BCR et sa signalisation intracellulaire aboutissant à une diminution de l'expression de $\lambda 5$ et à l'initiation du réarrangement des IGLV toujours par exclusion allélique (stade de petite cellule pré-B ou pré-B tardif). Ainsi, les chaînes légères provisoires sont remplacées par des chaînes légères κ ou λ (exclusion isotypique) suite aux réarrangements DL-JL et, en association avec les chaînes Ig μ et l'hétérodimère Ig α et Ig β , vont former le BCR qui, si fonctionnel, entraîne l'arrêt du réarrangement des chaînes légères, et sera exprimé à la surface des LB au stade immature.

Ces LB vont alors subir un test de tolérance aux auto-Ag dans la MO, c'est la sélection centrale (voir pour revue Goodnow et al., 2005).

En l'absence de réaction contre le soi, ces LB vont alors migrer en périphérie (LB transitionnels) dans les OLS (rate et ganglions) où elles vont poursuivre leur maturation et se différencier en LB matures. Dans ces cellules la transcription s'étend aux exons C δ et l'épissage élimine préférentiellement les séquences C μ . Ainsi, ces LB matures co-expriment à leur surface des IgM et des IgD (Figure 19).

En cas de reconnaissance de ligands du soi polyvalents (ex : CMH), les LB immatures subissent dans la MO soit une délétion clonale par apoptose en cas de forte signalisation médiée par le BCR, soit une révision du récepteur en cas de signal moins intense, aboutissant à un récepteur de nouvelle spécificité. Si ce dernier est encore autoréactif, le réarrangement des IGLV continue jusqu'à ce qu'un récepteur non autoréactif soit produit ou que les segments V et J soit épuisés, les cellules restant encore autoréactives subissent alors l'apoptose.

Les LB immatures fixant des Ag du soi capables d'interconnecter les BCR vont subir l'endocytose d'une partie de leurs BCR et une augmentation de leurs seuils d'activation via l'hyper expression de récepteurs inhibiteurs du BCR (tels que SHP-1), rendant ces LB incapables de répondre à l'Ag (anergie). Ces cellules vont tout de même pouvoir migrer en périphérie et exprimer des IgD de surface tout en restant anergiques.

Enfin, en cas de reconnaissance d'Ag solubles du soi avec une faible affinité ou d'Ag monovalents incapables d'interconnexion des BCR, ces LB ne reçoivent alors aucun signal de cette interaction et peuvent migrer en périphérie, se différencier normalement et exprimer à la fois des IgG et IgD de membrane. Ces cellules sont donc des clones ignorants et sont potentiellement autoréactives car leur ligand est présent mais incapable de les activer en conditions physiologiques. Toutefois, leur demi-vie est courte et elles entrent en compétition avec les autres LB non autoréactifs pour leur entrée dans les OLS (exclusion folliculaire), ce qui fait que ces LB subissent le plus souvent une forme de délétion retardée en périphérie et limite le risque de développement d'une autoréactivité.

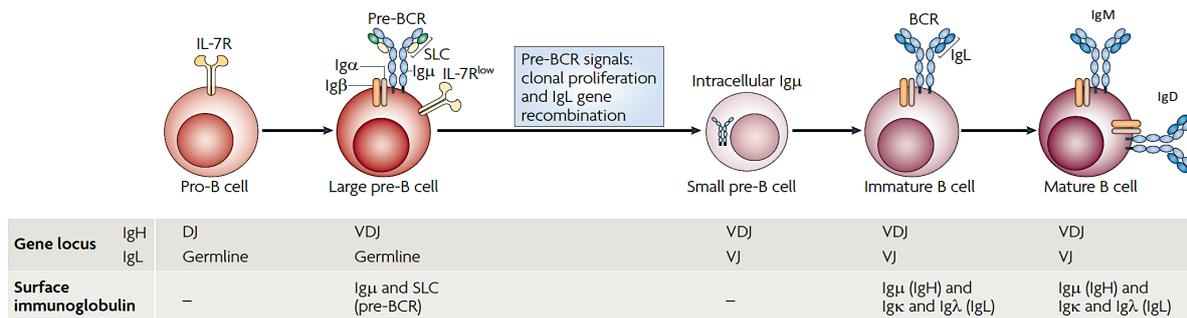


Figure 19. Ontogénie B et rôle du pré-BCR (adapté de Herzog et al., 2009)

Le réarrangement de la chaîne lourde de l'Ig (IGH) est initié dans le progéniteur lymphoïde commun ou au stade pro-B. En cas de réarrangement productif, la chaîne Igμ est alors produite et participe à la formation du pré-BCR exprimé à la surface des grands pré-B. La signalisation médiée par le pré-BCR induit la prolifération clonale de ces cellules et l'initiation des réarrangements de la chaîne légère de l'Ig (stade de petite cellule pré-B). Le réarrangement productif de cette chaîne résulte en l'expression d'un BCR complet, constitué de deux chaînes Igμ et deux chaînes Igκ ou Igλ à la surface des LB immatures. Ces cellules subissent le processus de sélection centrale et, en l'absence d'autoréactivité, peuvent maturer normalement en périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires et co-exprimer des IgG et IgD de surface.

V, variable; D, diversity; J, joining; IL-7R, interleukin-7 receptor; SLC, surrogate light chain.

B) REDONDANCE FONCTIONNELLE PARTIELLE ENTRE ZAP-70 ET SYK

La signalisation médiée par le pré-BCR (et le BCR) est similaire chez l'Homme et la souris. Comme détaillé précédemment, elle est médiée par l'hétérodimère Ig α et Ig β . Les protéines tyrosines kinases SYK, et dans une moindre mesure LYN, sont essentielles à cette signalisation (Jiang et al., 1998; Takata et al., 1994) en phosphorylant les ITAMs des Ig α et Ig β , permettant le recrutement de SYK sur ces ITAMs et son activation complète avec boucle d'amplification. Une fois pleinement activée, SYK va interagir avec et phosphoryler diverses protéines adaptatrices d'aval qui vont activer les voies de signalisation de la PI3K et de la PLC- γ 2. Ceci résulte en la génération de seconds messagers, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et l'activation des MAPKs.

Le rôle exclusif de SYK dans la signalisation du pré-BCR a été remis en question au milieu des années 1990 par des modèles murins SYK KO (SYK^{-/-}) où cette délétion entraînait uniquement un blocage partiel de la différenciation des pro-B en pré-B, suggérant que la signalisation du pré-BCR pourrait être indépendante de SYK (Cheng et al., 1995; Turner et al., 1997). Une redondance fonctionnelle avec une autre protéine a ainsi été évoquée, or la seule autre kinase de la famille de SYK est ZAP-70.

Il a ainsi été confirmé que ZAP-70 était exprimée physiologiquement dans les LB de façon très précoce, dès le stade pro-B (Fallah-Arani et al., 2008; Schweighoffer et al., 2003) et conservée dans toutes les populations lymphocytaires B, qu'elles soient médullaires (pro-B, pré-B, immatures, matures), spléniques (transitionnels, folliculaires, ZM) ou encore péritonéales (B1a, B1b et B2) (Fallah-Arani et al., 2008). Son niveau d'expression est toutefois bien plus faible que dans les LT, représentant, 2-4 % de l'intensité observée dans les thymocytes DP. Le niveau est par contre comparable entre les différentes population LB, à l'exception des pro-B où il est légèrement plus intense (Fallah-Arani et al., 2008). De plus, l'expression de ZAP-70 dans l'ensemble des sous population LB n'est pas modifiée suite à l'activation cellulaire, que cela soit de manière BCR-dépendante ou BCR-indépendante (LPS, IL-4) (Fallah-Arani et al., 2008).

Le rôle fonctionnel de ZAP-70, et son éventuelle redondance avec SYK, a été étudié dans différents modèles murins déficients pour une de ces kinases (*Syk*^{-/-} ou *Zap-70*^{-/-}) ou les deux (*Syk*^{-/-}*Zap-70*^{-/-}) (Fallah-Arani et al., 2008; Schweighoffer et al., 2003).

En présence physiologique de SYK, l'expression de ZAP-70 dans la lignée B n'est pas essentielle ni pour le développement normal des LB (Fallah-Arani et al., 2008; Schweighoffer et al., 2003), ni pour les réponses antigéniques T-dépendantes ou T-indépendantes (Fallah-Arani et al., 2008). De plus, les données *in vitro* montrent que, suite à la stimulation du BCR, l'activation cellulaire globale objectivée par le flux calcique, ainsi que la prolifération cellulaire, semblent être similaires entre les LB *Zap-70*^{-/-} et les LB wild type (Fallah-Arani et al., 2008).

Toutefois, dans le détail, ZAP-70 intervient en tant que suppléant de SYK. En effet, l'absence des deux kinases résulte en un blocage complet de l'ontogénie B au stade pro-B (fraction C), immédiatement avant le point de contrôle du pré-BCR, qui est nécessaire pour la transition du stade pro-B à pré-B. L'absence de ZAP-70 seule n'a par contre pas d'effet en termes de nombre de pré-B, de LB immatures ou matures, et l'absence isolée de SYK confère un phénotype intermédiaire (blocage partiel au stade pro-B avec réduction du nombre de pré-B et de LB immatures IgM⁺IgD⁻) (Schweighoffer et al., 2003). Ceci indique que ZAP-70 est capable d'induire l'ontogénie B en l'absence de SYK, mais de façon moins intense que cette dernière.

Cette utilisation de ZAP-70 est intrinsèque à la lignée B, éliminant l'hypothèse de l'intervention de cellules non B exprimant ZAP-70, notamment des LT, dans l'aide à la transition pro-B/pré-B. De plus, ce blocage de différenciation n'est pas dû à un défaut de synthèse ou d'assemblage du pré-BCR, comme en l'atteste la normalité des réarrangements des IGHV et des chaînes légères provisoires VpréB et λ5. De même, la chaîne μ est aussi fonctionnelle. Ce blocage semble donc résulter d'un défaut de signalisation du pré-BCR, qui est complet dans les souris *Syk*^{-/-}*Zap-70*^{-/-}, et partiel dans les souris *Syk*^{-/-}*Zap-70*^{+/+}, lié à un blocage du signal directement en aval de la sous-unité Igβ du pré-BCR qui elle, est fonctionnelle. Un autre facteur démontrant un défaut de signalisation du pré-BCR est l'absence du phénomène d'exclusion allélique dans

les souris *Syk^{-/-}Zap-70^{-/-}*, aboutissant à la production de deux chaînes lourdes μ fonctionnelles (IgMa et IgMb). Ce défaut de signalisation du pré-BCR est responsable d'une faible activation de la voie ERK1/2 (Königsberger et al., 2012) empêchant l'entrée normale en cycle cellulaire des pré-B suite à la stimulation du pré-BCR (Königsberger et al., 2012; Yasuda et al., 2008).

Ainsi, ZAP-70 a un rôle fonctionnel redondant avec SYK au point de contrôle du pré-BCR, les deux kinases étant capables, à des degrés divers, de transduire le signal du pré-BCR permettant la différenciation du stade pro-B à pré-B. Cette analogie fonctionnelle est similaire à celle observée dans l'ontogénie T où les souris double KO *Syk^{-/-}Zap-70^{-/-}*, présentent un blocage total au stade DN3 (Cheng et al., 1997). Toutefois, aucun blocage de signalisation du pré-TCR n'est observé dans les souris KO pour seulement une des deux kinases respectivement. Ceci suggère que la présence d'une des deux kinases suffit à la transmission du signal du pré-TCR et que ZAP-70 et SYK sont toute deux capables, et de façon équivalente d'induire cette signalisation contrairement aux LB où SYK transduit de façon plus efficace le signal médié par le BCR.

A la différence de SYK, l'expression constitutive de ZAP-70 ne semble pas jouer de rôle majeur dans la sélection positive médullaire des LB. En effet, les LB immatures *Syk^{-/-}Zap^{+/+}*, bien que réduits en nombre et capables de migrer en périphérie, subissent un phénomène d'exclusion folliculaire dans la rate, restant bloqués dans la pulpe rouge et hors des zones T avec une durée de vie réduite, à l'image de LB ignorants (Turner et al., 1995). Ces cellules sont de plus incapables de se différencier en LB matures, imputable au défaut intrinsèque de SYK, qui ne permet plus la transmission de la signalisation intracellulaire suite à l'activation du BCR (Cornall et al., 2000; Turner et al., 1997). Ces résultats suggèrent que SYK, à la différence de ZAP-70, est essentielle à la transition des LB immatures au stock de LB recirculants et peut refléter son rôle crucial dans la sélection positive des LB immatures.

Inversement, dans les LT, la sélection positive des thymocytes DP en SP CD4⁺ ou CD8⁺ est totalement bloquée dans les souris KO *Zap-70^{-/-}* malgré l'expression conservée de SYK (Kadlecek et al., 1998; Negishi et al., 1995). Ceci est possiblement

en lien avec un taux faible de SYK car une surexpression de cette protéine est capable de restaurer la sélection positive chez ces souris KO *Zap-70*^{-/-} (Gong et al., 1997). Ainsi, une explication similaire pourrait intervenir dans la transition des LB immatures à matures recirculant, avec une expression de ZAP-70 constitutive trop faible pour pallier au déficit de SYK. Cette hypothèse a été renforcée par des méthodes de transfection rétrovirales dans des LB *SYK*^{-/-} en montrant que la surexpression de ZAP-70 ou de SYK dans ces cellules permettait de restaurer le développement de LB matures IgM⁺IgD⁺ avec toutefois une efficacité moindre pour ZAP-70 comparativement à SYK (Fallah-Arani et al., 2008).

Königsberger et al. ont créé un modèle murin dans lesquels l'ADN complémentaire (ADNc) de ZAP-70 a été inséré dans le locus génique de SYK afin de générer des souris ZAP-70 KI dont l'expression de ZAP-70 était sous le contrôle du promoteur intrinsèque de SYK (Königsberger et al., 2012). Comme dans les modèles *Syk*^{-/-}, il a été observé le même blocage partiel au point de contrôle du pré-BCR, mais aussi un net enrichissement en LB matures de phénotype ZM (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) parmi la faible quantité de LB ayant migré en périphérie. Ces cellules ont une polyréactivité aspécifique de faible affinité parfois de nature auto-immune (Li et al., 2002). Les auteurs ont aussi montré que, suite à la stimulation du BCR, ces LB KI ZAP-70 présentaient une réduction de l'activité kinase de ZAP-70, se traduisant par une diminution de la signalisation intracellulaire médiée par le BCR, et notamment du flux calcique. De plus, ces souris développaient une auto-immunité avec des Ac anti-insuline associés à un état pré-diabétique, ainsi qu'une glomérulonéphrite à complexes immuns âge-dépendante.

Au total, l'expression de ZAP-70 ne peut que suppléer partiellement la fonction de SYK dans l'ontogénie B, en maintenant une faible signalisation du pré-BCR et du BCR, permettant une différenciation et une survie partielle de LB en périphérie, mais qui semble favoriser de plus de ce fait un enrichissement en LB potentiellement auto-réactifs de type ZM, avec un risque de développement de pathologies auto-immunes.

Des données mécanistiques récentes, utilisant des techniques d'immunoprécipitation, rapportent quelques précisions sur les interactions entre ZAP-70 et le complexe du BCR pouvant, du moins en partie, expliquer ces différences de signalisation médiée par le BCR entre ces deux kinases.

Ainsi, dans les LB normaux à l'état basal, SYK est déjà à proximité ou fixée sur le BCR (Alsadeq et al., 2014; Infantino et al., 2010). Lors de la stimulation du BCR par une anti-IgM, le recrutement de SYK au BCR est fortement augmenté dès 1 min et diminue à partir de la 5e minute de stimulation, et s'accompagne d'une augmentation du flux calcique, alors que le recrutement de ZAP-70 s'effectue beaucoup plus tardivement, après 15 et 30 min de stimulation, et sans modification du flux calcique (Alsadeq et al., 2014). Dans les LB double KO pour SYK et l'inhibiteur du récepteur du BCR SHP-1, une co-localisation BCR/ZAP-70 est observée à l'état basal et augmente significativement après 1 min de stimulation, comme dans les LB non mutés, mais toujours sans retentissement sur le flux calcique (Alsadeq et al., 2014).

Ceci suggère que ZAP-70 pourrait se substituer à SYK en cas d'absence de cette kinase, mais sans sa capacité à activer le flux calcique, ce qui est cohérent avec les données précédentes stipulant que ZAP-70 est moins efficace que SYK pour la transmission du signal médié par le BCR.

Les pro-B ont des taux augmentés d'ARNm de ZAP-70 (Fallah-Arani et al., 2008) et contiennent aussi LAT et SLP-76 (Oya et al., 2003; Su and Jumaa, 2003) qui sont classiquement impliqués dans la signalisation du TCR (cf. partie I.B.1). Ainsi, il est probable que ZAP-70 utilise soit les composants de la signalisation du BCR (PI3K et PLC- γ 2), soit ceux du TCR (LAT et SLP-76) pour promouvoir l'expansion et la différenciation des pro-B en pré-B. D'autre part, les souris double KO *Syk^{-/-}Shp1^{-/-}* présentaient un nombre de pré-B (fraction C) augmenté comparativement au souris simple KO *Syk^{-/-}*. Or, les données dans les LT montrent que SHP-1 est capable de réguler négativement ZAP-70 (Plas et al., 1996) en catalysant sa déphosphorylation (Kosugi et al., 2001). Ainsi, il est possible que, à l'instar de SYK, ZAP-70 soit aussi sous le contrôle négatif de SHP-1 dans les LB et ceci permettrait d'expliquer le recrutement tardif de ZAP-70 au complexe BCR. En effet, la concentration en espèces

réactives de l'oxygène (ROS), qui est sous la dépendance du flux calcique intracellulaire (Reth, 2002), est maximale seulement 10-15 min après l'activation du BCR, et inhiberait SHP-1, permettant alors à ZAP-70 de devenir active et d'être recrutée au complexe du BCR.

Au total, ces données suggèrent que SYK et ZAP-70 sont partiellement redondantes dans l'ontogénie B précoce, régulées négativement par SHP-1, et qu'un équilibre étroit entre ces enzymes est essentiel afin de maintenir un développement normal des LB et de leurs fonctions.

2. ROLE DANS LES LB NON TUMORAUX HUMAINS (HORS LLC) ?

En dehors de la LLC, le rôle de ZAP-70 est beaucoup moins clair chez l'Homme car les données concernant son expression dans les LB non tumoraux sont très pauvres à ce jour.

Son rôle dans l'ontogénie B humaine est toujours débattu à ce jour. La détection de ZAP-70 dans les LB chez la souris ont conduit à rechercher son expression chez les LB non tumoraux chez l'Homme et la comparer à celles observée dans les hémopathies malignes dérivées des LB matures.

Ainsi, l'expression de ZAP-70 a été identifiée dans des pro-B et pré-B de sujets sains (Crespo et al., 2006). L'intensité de son expression est inversement corrélée au stade de maturation médullaire, avec les cellules les plus immatures CD19⁺CD34⁺ présentant la plus forte intensité, suivies par les CD19⁺CD10⁺ et les LB matures CD19⁺CD34⁻CD10⁻ (cytométrie en flux et Western blot).

La présence de ZAP-70 dans les LB matures en périphérie est plus discuté. Les rares études disponibles s'accordent toutefois sur le fait que les LB matures périphériques sanguins ne semblent par contre pas ou peu exprimer ZAP-70 (Crespo et al., 2006; Cutrona et al., 2006; Nolz et al., 2005) (Figure 20. B). Ainsi, en se basant

sur le seuil d'expression dans les LT et NK, moins de 0,1 % des LB fraîchement isolés issus de sang périphérique de patients expriment ZAP-70 (Nolz et al., 2005).

Concernant les LB des OLS, Crespo et al. n'ont pas détecté d'expression de ZAP-70 dans les LB CD19⁺CD27⁻ ou CD19⁺CD27⁺ ou encore les cellules CD20⁺ issus d'amygdales issues de sujets sains, que cela soit en RT-qPCR, en immunohistochimie ou en Western blot alors que son expression était observée normalement dans les LT (Crespo et al., 2006) (Figure 20. A).

A l'opposé, ces mêmes auteurs montraient que ZAP-70 était exprimé dans 56 % des LB de leucémie lymphoblastique aigüe B (LLA-B) de phénotype pro-B/pré-B et dans 4 cas sur 6 de LLA-B de phénotype mature centre germinatif (Burkitt). Ainsi, du fait de l'absence d'expression de ZAP-70 dans les LB matures normaux, les auteurs ont suggéré que l'expression de ZAP-70 dans les hémopathies malignes dérivées de LB matures avec différentes origines cellulaires, telles que la LLA-B/ ou la LLC, reflète une aberration phénotypique acquise. L'expression de ZAP-70 dans la LLA-B de phénotype pro-B/pré-B serait par contre plutôt la conséquence d'une carcinogénèse d'une cellule exprimant déjà constitutivement ZAP-70 (pro/pré-B).

La majorité des études ont au contraire montré que ZAP-70 peut être détectée à des taux très faibles dans quelques lignées B humaines par qPCR ou Western blot (Admirand et al., 2004; Crespo et al., 2003; Rosenwald et al., 2001) Ceci concerne toutefois des LB transformés immortalisé ou issus de lymphomes.

Plus intéressantes sont les données concernant l'étude des OLS issus de patients indemnes de lymphomes, où il a été observé que 3,4 % et 2,3 % des LB fraîchement isolés à partir d'amygdales et de rates respectivement, exprimaient ZAP-70 en cytométrie en flux et aussi observée en immunoblot (Nolz et al., 2005).

D'autres équipes ont confirmé l'expression de ZAP-70 dans les amygdales Humaines par différentes techniques (Western blot, IHC et cytométrie en flux) (Cutrona et al., 2006; Scielzo et al., 2006 ; Gladkikh et al., 2017) (Figure 20. C, D) avec des niveaux d'expression plus faibles que ceux observés dans les LT, mais équivalents à ceux des LB LLC ZAP-70⁺ (Cutrona et al., 2006; Gladkikh et al., 2017) et cinq à dix fois supérieurs à ceux des LB périphériques des mêmes patients (Scielzo et al., 2006; Gladkikh et al., 2017).

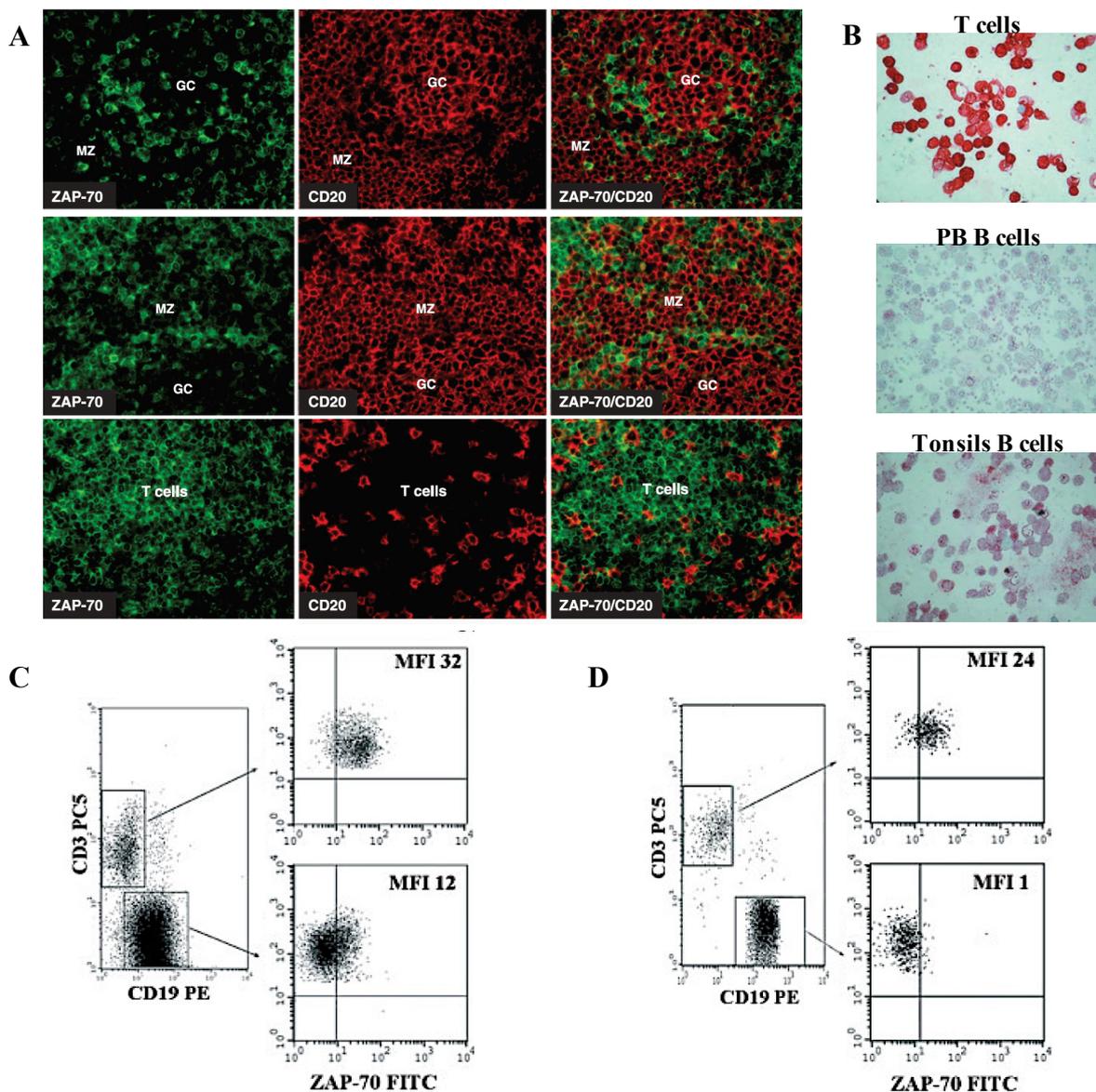


Figure 20. Différences d'expression de ZAP-70 dans les LB périphériques (adapté de Cutrona et al., 2006 et Crespo et al., 2006).

- A) Immunofluorescence marquant ZAP-70 et CD20 sur des coupes d'amygdales humaines fixées en paraffine. Haut, les cellules ZAP-70⁺ sont localisées dans les centres germinatifs (GC) et la zone du manteau (MZ) mais semblent être CD20⁻. Milieu, a plus fort grossissement, les trois images montrent bien l'absence de cellules doubles positives ZAP70/CD20. Bas, dans les zones interfolliculaires, les LT expriment ZAP-70 (en vert, à gauche) alors que les LB sont CD20⁺ (en rouge, au milieu et à droite)
- B) Immunocytochimie démontrant l'expression de ZAP-70 dans différentes populations lymphocytaires humaines (LT, LB du sang périphérique et LB d'amygdales)
- C et D) Cytométrie en flux montrant l'expression de ZAP-70 dans les LT et LB d'amygdales humaines (C) et du sang périphérique (D)

Concernant le phénotype de ces LB des OLS exprimant ZAP-70, les résultats sont assez divergents mais tendent à conclure que ces cellules présentent un phénotype activé.

Ainsi, ces LB sont fortement positives pour CD38 comparativement aux LB ZAP-70⁻. De même, les CD19⁺CD38^{high} présentent de plus fortes intensités de ZAP-70 comparativement aux CD19⁺CD38^{low} (Cutrona et al., 2006; Nolz et al., 2005). L'analyse des sous populations lymphocytaires montre toutefois des disparités dans le niveau d'expression de ZAP-70, les LB de phénotype activé (CD38⁺ ou CD71⁺, ou augmentation du volume cytoplasmique) étaient ceux exprimant le plus fortement ZAP-70, les LB du manteau (IgD⁺CD38⁻) et mémoires (IgD⁻CD38⁻) ceux l'exprimant le moins, et les LB des centres germinatifs présentant un profil intermédiaire (Nolz et al., 2005). Les LB ZAP-70⁺ sont des LB matures non switchés (IgM⁺IgD⁺), exprimant aussi des niveaux de CD27 légèrement plus importants que les LB ZAP-70⁻, mais sont CD138⁻ suggérant leur non appartenance à la sous population plasmocytaire (Nolz et al., 2005).

Il est à noter qu'il n'existe pas de corrélation entre la positivité pour ZAP-70 et pour CD5 dans les LB non tumoraux, suggérant que l'expression de ZAP-70 n'est pas qu'une caractéristique des LB CD5⁺, comme dans la LLC (Cutrona et al., 2006; Scielzo et al., 2006).

Une autre équipe a montré que l'expression de ZAP-70 n'était pas restreinte à des sous populations de LB.

En effet, après purification de LB amygdaliens, les auteurs ont séparé les LB naïfs (CD19⁺CD38⁻IgD⁺), des centres germinatifs (CD19⁺CD38⁺IgD⁻) et mémoires (CD19⁺CD38⁻IgD⁻) et montré une expression de ZAP-70 dans ces trois populations à des taux similaires. Ce taux était trois fois inférieurs à celui observé dans les LT mais cinq fois supérieur à celui des LB périphériques des mêmes patients (Scielzo et al., 2006). Les contrôles négatifs utilisés dans cette étude étaient les granulocytes CD15⁺ et les monocytes CD14⁺, qui sont strictement négatifs pour ZAP-70.

Cette expression de ZAP-70 dans les LB activés des OLS semble liée au caractère inductible de ZAP-70.

En effet, des données *in vitro* montrent qu'une stimulation polyclonale des LB purifiés issus du sang périphérique ou des amygdales par CD40L + IL-10 + IL-6 + IL-4 ou par CpG + IL-15, résulte en une augmentation de l'expression protéique en immunoblot de ZAP-70 à 72h comparativement aux LB non stimulés (Nolz et al., 2005). Le caractère inductible de ZAP-70 dans les LB non tumoraux périphériques a été confirmé par d'autres équipes, notamment suite à la stimulation du BCR, que cela soit par une anti-IgM seule ou par des molécules de co-stimulation (CD40L avec IL-4, IL-6 et IL-10) (Scielzo et al., 2006), mais aussi de manière BCR indépendante par des agonistes des TLR7/9 (CpG ADN) (Bekeredjian-Ding et al., 2008).

Les mécanismes précis de l'induction de ZAP-70 dans ces cellules est peu connu à ce jour. Dans le cas d'une stimulation du BCR, il semblerait qu'à la différence des données d'immunoprécipitation dans les LB murins cités précédemment, ZAP-70 soit activé et phosphorylé très précocement, dès la 30^e seconde pour diminuer ensuite progressivement dès la 5^e minute. Les mêmes résultats sont observés pour SYK dans ces cellules, mais de manière beaucoup plus intense que pour ZAP-70, suggérant que SYK reste la kinase principalement impliquée dans la signalisation suite à l'activation du BCR (Nolz et al., 2005).

L'expression de ZAP-70 induite par CpG ADN concerne particulièrement la sous population de LB mémoires (IgM⁺CD27⁺) (Bekeredjian-Ding et al., 2008). Ceci implique l'intégrité de voie de MYD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) qui va alors induire l'hyperexpression de la protéine chaperonne heat shock protein 90 (HSP-90) permettant la stabilisation et l'activation soutenue de la PKB, nécessaire à l'expression de ZAP-70 dans ces cellules. De plus, l'expression de ZAP-70 est associée avec l'induction de la cycline A2, une prolifération cellulaire accrue et une induction soutenue de PKB dans une boucle d'amplification. Le phénotype de ces LB activés ressemble à celui des LB LLC, avec l'expression des marqueurs CD5, CD23, CD25 et de HSP-90.

Enfin, une équipe a suggéré un lien entre ZAP-70 dans les LB normaux et auto-immunité, en montrant que l'expression protéique de ZAP-70 dans les LB du fluide

synovial issus de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) était augmentée comparativement aux LB du fluide synovial des patients atteints d'ostéo-arthrite (Tolusso et al., 2009). Chez ces mêmes sujets, le niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB sanguins périphériques était par contre comparable suggérant une accumulation de LB ZAP-70⁺ au sein des articulations atteintes dans la polyarthrite rhumatoïde. De plus, le pourcentage de LB ZAP-70⁺ était associé aux niveaux d'IL-6, de BAFF et des auto-Ac dans le fluide synovial, suggérant un lien avec l'inflammation synoviale. Les cultures *in vitro* ont aussi montré que, pour les mêmes patients, ces LB étaient moins sensibles à l'apoptose spontanée que les LB ZAP70⁻. Ces LB ZAP-70⁺ présentaient majoritairement un phénotype activé (CD38⁺), ce qui est cohérent avec les rares données disponibles (Cutrona et al., 2006; Nolz et al., 2005). Toutefois, contrairement aux études précédentes suggérant que l'expression de ZAP-70 n'est pas qu'une caractéristique des LB CD5⁺ (Cutrona et al., 2006; Scielzo et al., 2006), les auteurs rapportent ici que les LB ZAP-70 exprimaient fortement le CD5.

Ce lien supposé entre l'expression de ZAP-70 dans les LB synoviaux et auto-immunité a été infirmé par un travail ultérieur de la même équipe où, bien que confirmant un enrichissement significatif en cellules CD19⁺ZAP-70⁺ dans le fluide synovial comparativement au sang périphérique, il n'y avait pas de différence entre les niveaux d'expression de ZAP-70 dans les LB synoviaux issus de patients atteints de PR séropositive, ou de PR séronégative ou encore d'ostéo-arthrite (Michelutti et al., 2011). Ces LB étaient principalement de type mémoire non switchés (IgM⁺IgD⁺CD27⁺), suggérant ainsi une maturation dynamique des LB dans le compartiment articulaire où les LB matures s'activent et expriment ZAP-70 pour ensuite se différencier *in situ* en LB mémoires.

Au total, les profils d'expression et le rôle exact de ZAP-70 dans les LB non tumoraux humains ne sont que très partiellement connus à ce jour. ZAP-70 n'est ainsi pas l'apanage des LT/NK ni des LB-LLC et pourrait jouer un rôle redondant dans l'ontogénie B précoce, en addition à SYK qui reste la kinase prédominante dans cette fonction. Il semblerait aussi que l'expression de ZAP-70 soit inductible de manière BCR-dépendante et BCR-indépendante dans les LB matures périphériques activés IgM⁺, et participe à des processus de prolifération et de différenciation cellulaire spécifiques, sans que son rôle précis ne soit connu à ce jour.

3. EXPRESSION DANS LES LB CD5- DANS LA LLC

A ce jour, il n'existe pas de travaux publiés étudiant l'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux de la LLC. Ceci est probablement dû au fait que cette population est difficilement isolable car ne représentant que 0,01 % à 0,1 % des LB totaux, la quasi-totalité des LB étant de nature clonale LLC.

Notre équipe (UPR CNRS 3572) s'est ainsi intéressé à l'étude de l'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux de patients atteints de LLC avec des résultats intéressants et innovants.

Le seuil de positivité de ZAP-70 a été défini en cytométrie en flux par contrôle isotypique sur les LT (> 0,5 % de LT ZAP-70⁺). Une LLC a été classée comme ZAP-70⁺ si ≥ 20 % des LB tumoraux (CD19⁺CD5⁺) étaient ZAP-70⁺ (Crespo et al., 2003).

Ainsi, il a été montré qu'une fraction des LB non tumoraux de ces patients exprimaient ZAP-70 (Figure 21. A). Ceci n'était pas observé pour les LB normaux issus de patients sains (Figure 21. B).

Cette observation n'était pas en lien avec une contamination par un contingent de LB LLC ayant perdu l'expression du CD5 car, comparativement aux LB tumoraux CD19⁺CD5⁺ZAP-70⁺, les LB normaux CD19⁺CD5⁻ZAP-70⁺ exprimaient plus fortement CD19 et l'IgM de surface, et surtout, étaient polyclonaux avec un ratio *kappa/lambda* normal (Figure 21. C).

Ceci a aussi été démontré au niveau nucléaire par RT-qPCR sur cellules uniques préalablement triées par cytométrie en flux sur la base de leur expression de CD5 (Figure 21. D).

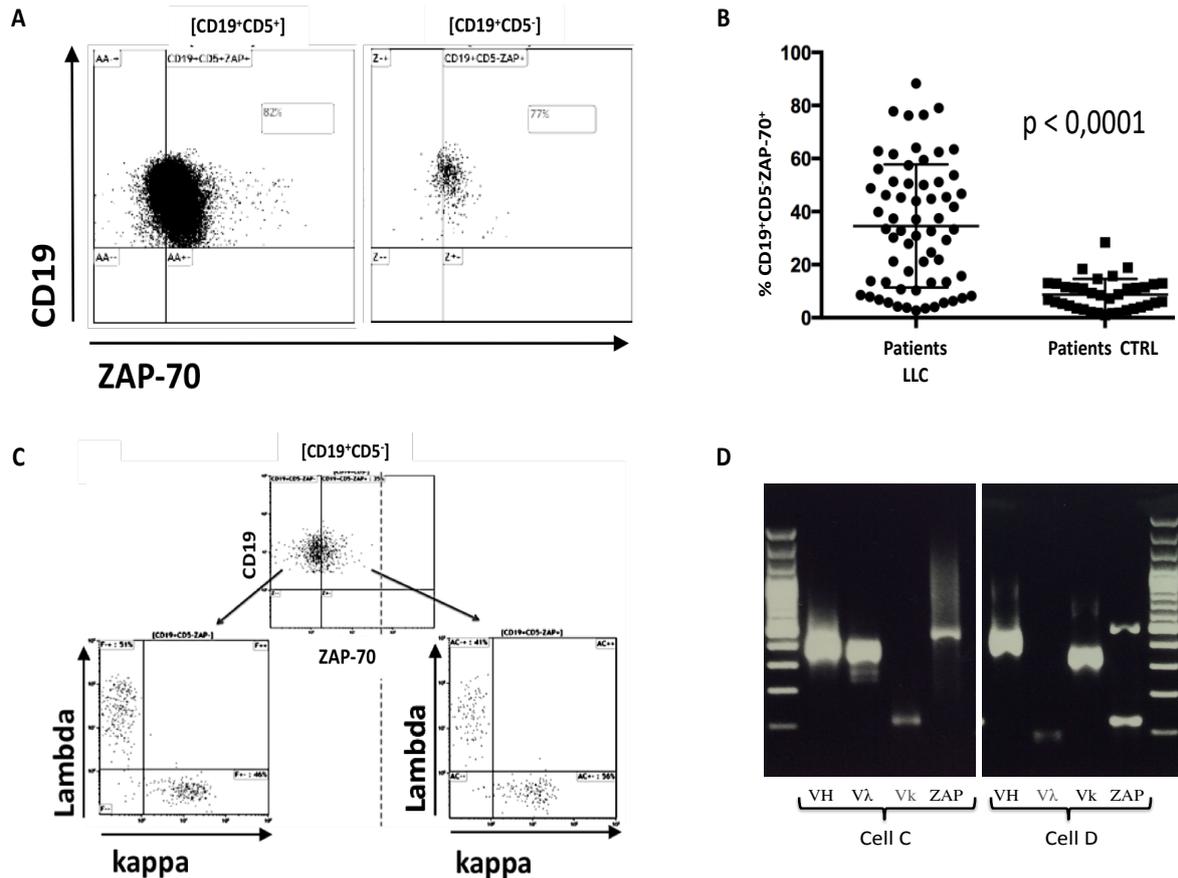


Figure 21. Expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux et caractère polyclonal.

- A) Comparatif d'expression de ZAP-70 par les LB LLC ($CD19^+CD5^+$) et les LB non tumoraux ($CD19^+CD5^-$). Haut : LLC typiquement ZAP-70⁺ avec 82 % des LB ZAP-70⁺. Bas : LB non tumoraux du même patient montrant une expression importante de ZAP-70 par ces cellules
- B) Comparatif de l'expression de ZAP-70 par cytométrie en flux entre les LB $CD19^+CD5^-$ issus de patients LLC et de patients sains (test de Mann-Whitney)
- C) Polyclonalité des LB non tumoraux ZAP-70⁺ dans la LLC. Les LB ZAP-70⁻ (gauche) et ZAP-70⁺ (droite) ont des ratio kappa/lambda normaux (0,9 et 1,3 respectivement).
- D) Exemple de détection de ZAP-70 au niveau nucléaire par RT-qPCR sur cellules uniques $CD19^+CD5^-$ issues du même patient. Détection conjointe de l'expression du transcrite ZAP-70 et des IGHVs, IGLV ou IGLV λ , confirmant le caractère polyclonal de ces cellules car exprimant différentes chaînes légères (λ dans la cellule C et κ dans la cellule D).

Le seuil de positivité de l'expression de ZAP-70 en cytométrie en flux a été défini par contrôle isotypique sur les LT (non montré ici)

LB, lymphocytes B; LLC, leucémie lymphoïde chronique; LT, lymphocytes T; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction

D'autre part, il existait une corrélation positive entre le niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux et les LB tumoraux pour le même patient (Figure 22). Ainsi, plus la LLC exprime fortement ZAP-70 dans ses LB tumoraux, plus cette expression est forte aussi dans les LB non tumoraux.

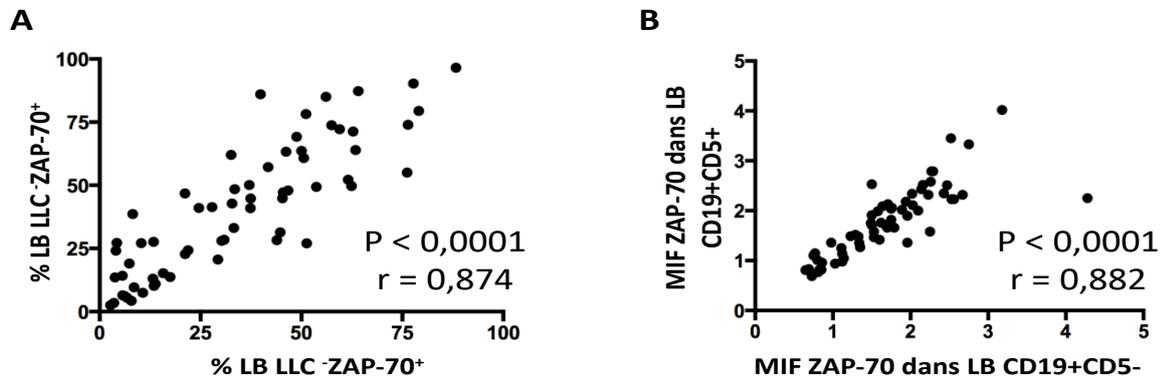


Figure 22. Corrélation du niveau d'expression de ZAP-70 entre les LB LLC et les LB non tumoraux chez les patients atteints de LLC.

A) En pourcentage de LB positifs par rapport au contrôle isotypique

B) En médiane d'intensité de fluorescence (MIF)

Test de corrélation de Spearman

La caractérisation phénotypique de ces LB non tumoraux ZAP-70⁺ a permis de montrer qu'ils n'appartenaient pas à une sous population B spécifique. En effet, la proportion de LB CD19⁺CD5⁺ZAP-70⁺ n'était pas statistiquement différente de celle des LB CD19⁺CD5⁺ZAP-70⁻ en regard des différentes sous populations B : naïves (IgM⁺IgD⁺CD27⁻), mémoires switchés (IgM⁺IgD⁻CD27⁺), mémoires non switchés (IgM⁺IgD⁻CD27⁻), mémoire CD27⁻ (IgM⁻IgD⁻CD27⁻), anergique (IgM⁻IgD⁺CD27⁻), et zone marginale (IgM⁺IgD⁺CD27⁺) (Figure 23, partie gauche).

De plus, les LB CD19⁺CD5⁺ZAP-70⁺ n'étaient pas enrichis en LB transitionnels précoces potentiellement autoréactifs (CD21^{low}). Enfin, étant donné la possibilité que les LB LL dérivent des LB1 humains (cf. partie II. D. 1. c) CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻, que ces cellules présentent une signalisation intracellulaire basale constitutive et produisent des auto-Ac naturels polyréactifs, il était intéressant d'étudier si cette population était enrichie en LB ZAP-70⁺, cette protéine étant associée à la survenue de CAI dans la LLC. Les résultats ne montraient pas de différence dans le pourcentage de LB de type B1 entre les LB non tumoraux ZAP-70⁺ et ZAP-70⁻ (Figure 23, partie droite).

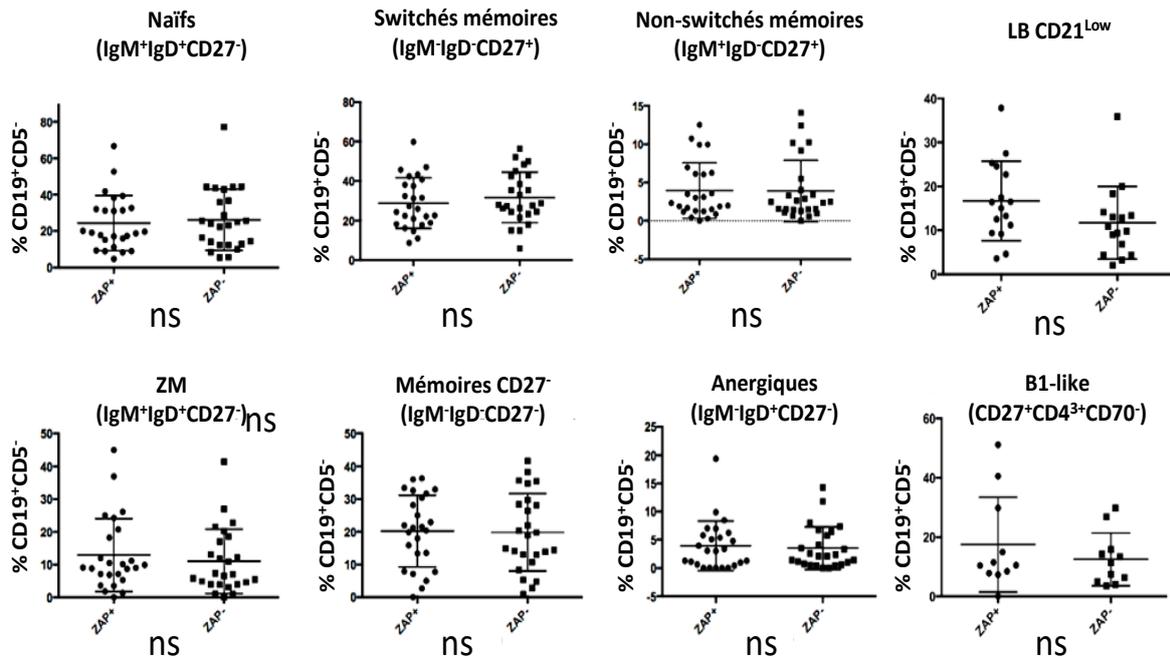


Figure 23. Les LB ZAP-70⁺ non tumoraux de la LLC n'appartiennent pas à une sous population B particulière. Les proportions au sein des différentes sous populations B étaient similaires entre les LB non tumoraux ZAP-70⁺ et ZAP-70⁻ (test de Mann-Whitney).

D'autre part, parmi les 63 patients LLC, 19 avaient présenté une ou plusieurs CAI typique (AHA1, PTI ou syndrome d'Evans).

La totalité de ces 19 patients avec CAI avaient une LLC ZAP-70⁺, corroborant le fait que les CAI sont l'apanage des LLC ZAP-70⁺ (Zanotti et al., 2010).

De plus, il existait une corrélation positive entre le niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux et la présence de CAI, par comparaison aux LB non tumoraux issus de LLC ZAP-70⁻ (Figure 24. A). A l'inverse, en comparant le niveau d'expression de ZAP-70 entre les LLC ZAP-70⁺ avec ou sans CAI, il n'existait pas de différence (Figure 24. B). Ceci suggère un effet on/off de ZAP-70 dans les LB car seule sa présence est associée avec la présence de CAI.

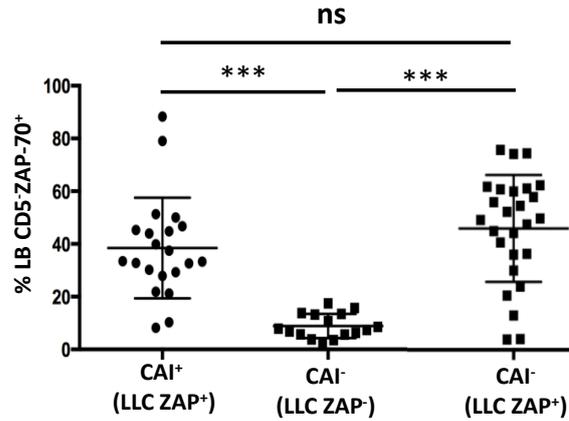


Figure 24. Expression de ZAP-70 par les LB non tumoraux et survenue de CAI dans la LLC.

Association entre le niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux et la présence de CAI, par comparaison aux LB normaux des patients avec LLC ZAP-70- sans CAI, et absence de différence du niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux entre les patients LLC ZAP-70+ avec ou sans CAI

CLL : chronic lymphocytic leukemia ; CAI : cytopénies auto-immunes

Ns : non significatif ; *** : $p < 0,001$ (test de Mann-Whitney)

Ainsi, il a clairement été démontré pour la première fois par notre équipe que la survenue de CAI dans la LLC était associée à l'expression de ZAP-70 à la fois par les LB tumoraux et les LB non tumoraux résiduels.

II. PROJET DE THESE

La LLC est une hémopathie lymphoïde maligne caractérisée par l'accumulation progressive de LB d'apparence mature principalement dans le sang périphérique, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, et la rate.

La physiopathologie est complexe et persistent à ce jour diverses interrogations concernant notamment l'origine cellulaire précise des cellules leucémiques, le rôle exact de la signalisation médiée par le BCR et l'influence des agents infectieux et/ou des Ag du soi comme facteurs déclenchants et favorisant de la prolifération clonale.

Dans le groupe des hémopathies lymphoprolifératives, la LLC a la particularité de présenter une dérégulation du système immunitaire favorisant la survenue de manifestations auto-immune, qui peut toucher jusqu'à près de 25 % des patients au cours de leur LLC. La manifestation la plus fréquente est représentée par les CAI, et notamment l'AHAI, suivie par le PTI. Cette auto-immunité au cours de la LLC peut survenir à tout moment de l'évolution de la LLC, et même dès le stade pré-leucémique de MBL. Les mécanismes physiopathologiques sont complexes et encore peu clairs, et la LLC constitue un modèle très intéressant et important pour la compréhension des interactions immunitaires entre cancer et auto-immunité.

ZAP-70 est une protéine kinase de 70 KDa, exprimée dans les LT et les NK et nécessaire à la signalisation du récepteur de surface. L'expression de cette protéine aussi observée de façon anormale dans environ 50 % des cas de LLC et est corrélée au statut non muté des IGHVs.

Elle constitue un facteur pronostique péjoratif indépendant fort de par son association à une réduction de la survie globale et du temps sans progression et sans traitement. Ceci est notamment dû à son rôle dans l'hypersignalisation médiée par le BCR et à la sensibilisation de ces cellules aux signaux du microenvironnement, favorisant *in fine* une prolifération et une survie cellulaire accrues et expliquant, du moins en partie, la nature plus agressive des LLC ZAP-70⁺.

De plus, il existe une corrélation positive forte entre l'expression de ZAP-70 dans ces cellules et la survenue de CAI au cours de la LLC, ZAP-70 étant le paramètre le plus discriminant entre les patients avec ou sans CAI.

Toutefois, bien que ces études permettant d'expliquer partiellement pourquoi l'expression de ZAP-70 est associée avec une progression plus rapide de la LLC, le mécanisme d'activation précis de ZAP-70 dans ces LB LLC reste à ce jour peu clair.

De plus, la très grande majorité (90 %) des auto-Ac associés aux CAI dans la LLC étant polyclonaux issus des LB non tumoraux résiduels, le rôle de ZAP-70 dans la physiopathologie de la LLC reste inconnu à ce jour.

Des données plus récentes pourraient permettre d'éclairer en partie le rôle de ZAP-70 dans les LB. En effet, il a été démontré, dans plusieurs études indépendantes, que l'expression de ZAP-70 n'était pas restreinte aux LT, NK et aux LB LLC mais pouvait aussi s'observer dans les LB non tumoraux.

Ainsi, chez la souris, ZAP-70 semble jouer un rôle fonctionnel redondant avec SYK au point de contrôle du pré-BCR, les deux kinases étant capables, à des degrés divers, de transduire le signal du pré-BCR permettant la différenciation du stade pro-B à pré-B. Un équilibre étroit est nécessaire entre ces enzymes afin de maintenir un développement normal des LB et de leurs fonctions.

Chez l'Homme, son rôle est beaucoup moins clair et les données sont parfois discordantes. Son expression a aussi été observée dès le stade précoce proB/préB, diminuant progressivement parallèlement à la maturation B pour devenir quasiment indétectable dans les LB circulants périphériques à l'état basal. Toutefois, ZAP-70 est surexprimée dans les LB des OLS (amygdales et rates) à des niveaux certes plus faibles que ceux observés dans les LT, mais équivalents à ceux des LB LLC ZAP-70⁺ (Cutrona et al., 2006; Gladkikh et al., 2017) et cinq à dix fois supérieurs à ceux des LB périphériques des mêmes patients (Scielzo et al., 2006; Gladkikh et al., 2017). A la différence de la LLC, il n'existe pas de corrélation entre la positivité pour ZAP-70 et pour CD5 dans les LB non tumoraux, suggérant que l'expression de ZAP-70 n'est pas restreinte aux LB CD5⁺ (Cutrona et al., 2006; Scielzo et al., 2006).

Le phénotype de ces LB non tumoraux ZAP-70⁺ est par contre parfois discordants, certaines études montrant que ces cellules sont de type matures activées non switchées (IgM⁺IgD⁺CD38⁺ et/ou CD71⁺) (Nolz et al., 2005b), d'autres au contraire

n'objectivant pas de différence d'expression entre les LB naïfs (CD19⁺CD38⁻IgD⁺), des centres germinatifs (CD19⁺CD38⁺IgD⁻) et mémoires (CD19⁺CD38⁻IgD⁻) (Scielzo et al., 2006).

De rares données suggèrent que l'expression de ZAP-70 dans ces LB non tumoraux serait liée à son caractère inductible suite à la stimulation du BCR (Scielzo et al., 2006), mais aussi de manière BCR indépendante par des agonistes des TLR7/9 (CpG ADN) (Bekeredjian-Ding et al., 2008), et participe à des processus de prolifération et de différenciation cellulaires spécifiques, sans que son rôle précis ne soit connu à ce jour.

Enfin, dans une cohorte de 63 patients atteints de LLC non traitée, notre équipe a montré qu'une fraction des LB non tumoraux de ces patients exprimaient ZAP-70 avec une corrélation positive entre le niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux et les LB tumoraux. La caractérisation phénotypique de ces LB non tumoraux ZAP-70⁺ montrait qu'ils n'appartenaient pas à une sous population B spécifique. D'autre part, il existait une corrélation positive entre le niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux et la survenue de CAI. Ainsi, il a clairement été démontré pour la première fois par notre équipe que la survenue de CAI dans la LLC était associée à l'expression de ZAP-70 à la fois par les LB tumoraux et les LB non tumoraux résiduels.

Au total, l'expression de ZAP-70 n'est pas restreinte aux LT, NK et aux LB LLC. Dans la LLC, il existe ainsi quatre grandes populations lymphocytaires B : tumorales CD5⁺, pouvant être ZAP⁺ ou ZAP⁻, et non tumorales résiduelles CD5⁻ pouvant être aussi ZAP⁺ ou ZAP⁻. Nous avons vu que l'expression de ZAP-70 est corrélée à une hypersignalisation de la voie du BCR, à une prolifération cellulaire accrue et à la survenue de CAI dans la LLC.

Toutefois, à ce jour, **il n'existe aucune donnée concernant la caractérisation et le rôle des LB non tumoraux CD5⁻ZAP-70⁺ dans la LLC.**

Ainsi, notre première hypothèse de travail est que **l'expression de ZAP-70 dans les LB résiduels non tumoraux dans la LLC pourrait refléter un phénomène précoce prédisposant à la transformation néoplasique de ces cellules.**

D'autre part, il est clairement établi que ce sont les LB non tumoraux qui sont à l'origine de la production des auto-anticorps polyclonaux responsables des CAI dans la LLC. Or, étant donné que l'expression de ZAP-70 est associée à une hypersignalisation du BCR et que, de manière générale dans les LB, il est démontré qu'un défaut de régulation négative du BCR est corrélé à la survenue de manifestations auto-immunes (Nitschke, 2009; Pritchard and Smith, 2003; Schickel et al., 2012), notre deuxième hypothèse est que **l'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux pourrait induire une rupture de tolérance immunitaire et favoriser l'émergence de phénomènes auto-immuns dont les CAI.**

Afin de tester nos hypothèses, nous utiliserons deux modèles expérimentaux différents.

Tout d'abord un modèle Humain *in vitro*, constitué des LB isolés à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (ou PBMC pour peripheral blood mononuclear cells) de patients atteints de LLC et non traités. Ceci nous permettra de tenter de répondre aux questions suivantes :

- **Existe-t-il une similarité moléculaire entre les réarrangements géniques du BCR tumoral (CD5⁺ZAP-70⁺) et ceux des LB non tumoraux (CD5⁺ZAP-70⁺) pour chaque patient atteint de LLC ?**
- **Existe-t-il une stéréotypie du BCR des LB non tumoraux (CD5⁺ZAP-70⁺) dans la LLC ?**
- **Les LB non tumoraux CD5⁺ZAP-70⁺ sont-ils auto-réactifs ?**

Ensuite, afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles de la surexpression précoce de ZAP-70 dans les LB *in vivo*, un modèle murin KI original a été créé, surexprimant de façon conditionnelle ZAP-70 dès le stade pro-B. Ainsi, l'étude de ce modèle nous permettra de tenter de répondre aux questions suivantes :

- **La surexpression précoce de ZAP-70 dans les LB prédispose-t-elle à la survenue d'une lymphoprolifération B maligne**
- **La surexpression précoce de ZAP-70 dans les LB prédispose-t-elle à la survenue de manifestations auto-immunes ?**

III. PATIENTS, MATERIEL ET METHODES

A. PARTIE HUMAINE DU PROJET

1. PATIENTS

Les échantillons biologiques utilisés dans cette étude ont été collectés prospectivement et provenaient de sang périphérique de patients atteints de LLC, après consentement écrit. Ceux utilisés comme contrôles provenaient de volontaires sains ou des couches leucocytaires (buffy coat) non utilisés issus de personnes saines donnant leur sang à l'établissement français du sang (EFS) de Strasbourg.

Les patients atteints de LLC étaient suivis dans les services d'hématologie ou d'immunologie clinique de Strasbourg ou d'Hématologie de Mulhouse. Les critères d'inclusion étaient la survenue ou la récurrence d'une ou plusieurs CAI nouvellement diagnostiquée. Les critères d'exclusion étaient l'administration de chimiothérapie et/ou d'immunochimiothérapie, notamment par anti-CD20, dans les 6 derniers mois afin d'éviter au maximum la présence d'une lymphopénie B résiduelle majeure.

2. RECUEIL ET CONGELATION DES PBMC

Les PBMC de chaque patient étaient isolées à partir du sang périphérique ou des buffy coat par centrifugation par gradient de densité (Ficoll Paque Plus GE Healthcare) (*Sigma Haldrich*). Brièvement, le sang ou le buffy coat étaient dilués dans un volume équivalent de milieu de culture (RPMI 1640 + 500 µl de gentamycine (50 µg/mL)), le mélange homogénéisé était déposé sur le Ficoll (0,8 mL/mL de sang dilué). L'ensemble était centrifugé à 2 500 rpm (1 200 g) pendant 30 min. Les PBMC étaient ensuite récupérés et à nouveau centrifugés (1 500 rpm pendant 7 min) puis le

surnageant ôté. Le culot cellulaire était resuspendu dans 15 mL de RPMI et centrifugé (1 000 rpm 10 min.) pour enlever au maximum les plaquettes. Un échantillon des cellules était ensuite marqué au bleu trypan puis celles-ci comptées manuellement au microscope sur plaque de Neubauer. Après un dernier lavage dans du RPMI, les PBMC étaient immédiatement congelées en cryotubes (entre $10 \cdot 10^6$ - $20 \cdot 10^6$ cellules/tube) : RPMI 2 mL + sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté 20 % +diméthylsulfoxyde (DMSO) 10 % et cryopréservées à -80°C à l'IPCB UPR CNRS 3572 CNRS jusqu'à analyse ultérieure.

3. DETERMINATION DU STATUT ZAP-70 DES LLC

Pour chaque nouveau patient LLC inclus dans l'étude, indépendamment du statut mutationnel IGHV connu ou non, le degré d'expression de ZAP-70 était déterminé par cytométrie en flux.

Premièrement, après décongélation rapide de PBMC, un marquage de viabilité était réalisé en tubes 12X75 mm (*BD Falcon*) dans du PBSX1 (NaH_2PO_4 18 mM, NaH_2PO_4 84 mM, NaCl 1,81 mM) par Fixable Viability Dye eFluor 780 (*eBioscience*), selon les recommandations du fabricant. Ce marquage est utilisable sur cellules fixées et perméabilisées.

Un marquage membranaire de 15 min à 4°C à l'obscurité était ensuite réalisé sur ces cellules avec un mélange d'Ac monoclonaux couplés à des fluorochromes : anti-CD19 PE-Cy7, -CD3 APC (*BD Biosciences*) -CD5 ECD (*Beckman Coulter*). Le marquage intracellulaire de ZAP-70 était réalisé à l'aide de l'Ac monoclonal anti-ZAP-70 PE (clone 1E7.2) (*BD Bioscience*) après incubation préalable avec 2 mL/ 10^6 PBMC de Lysing solution (*BD Bioscience*) pour la fixation et la perméabilisation, selon les recommandations du fabricant.

Une LLC était considérée comme ZAP-70⁺ si au moins 20 % des LB LLC (CD19⁺CD5⁺) étaient ZAP-70⁺ (Crespo et al., 2003), ce dernier étant défini comparativement au marquage avec un contrôle isotypique (mouse IgG1-PE) (*BD Bioscience*) (moins de 0,5 % de LB LLC ZAP-70⁺).

La lecture des marquages a été faite sur le cytomètre en flux Gallios (*Beckman Coulter*) et l'analyse en utilisant le logiciel Kaluza flow analysis version 1.5a (*Beckman Coulter*).

4. ETUDE DU REPERTOIRE DU BCR

A) A PARTIR DE POOLS CELLULAIRES LYMPHOCYTAIRES B

(1) TRI DES LB EN TUBES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Après décongélation rapide des cryotubes, les LB ont été triés en tubes (*Falcon*) par FACS (fluorescence activated cell sorting) à l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGMBC) (Illkirch), après marquage membranaire par mélange d'Ac monoclonaux suivants : CD19-PE-Cy7, CD3-APC (*BD Biosciences*) CD5-ECD (*Beckman Coulter*) et après marquage intracellulaire de ZAP-70 selon la technique détaillée précédemment.

Ceci permettait de définir et de trier d'une part les LB tumoraux ZAP-70⁺ (CD19⁺CD5⁺ZAP-70⁺) et les LB non tumoraux ZAP-70⁺ (CD19⁺CD5⁺ZAP-70⁺). Les cellules étaient ensuite rapidement lavées à deux reprises dans du PBSX1 puis congelées et stockées en culots secs à -80°C jusqu'à analyse.

(2) EXTRACTION D'ARN TOTAL

L'extraction des ARN à partir des culots secs stockés à -80°C a été réalisée avec le kit RNeasy Mini (*Qiagen*) selon les recommandations du fabricant, en incluant l'étape d'incubation à la DNase I pour éliminer l'ADN génomique. La quantité et la pureté des ARN extraits ont été ensuite analysées à l'aide du NanoDrop2000c (*Thermo Scientific*).

Les ARN extraits étaient immédiatement utilisés pour la synthèse des ADNc correspondants.

(3) SYNTHÈSE D'ADN COMPLEMENTAIRE (ADNC)

Un volume de 4 µL de mix, contenant 2 µL de Random primer (0,5 µg/mL) (*Promega*) et 2 µL de dNTP Mix (10 mM) (*Invitrogen*) était déposé dans des barrettes à PCR (*Sarstedt*), auquel étaient ajoutés 9 µL d'ARN extrait, pour un volume final (Vf) de 13 µL.

Après une incubation à 65°C 5 min, le mélange était immédiatement placé 1 min sur glace puis étaient ajoutés 7 µL d'un deuxième mix, contenant 4 µL de 5X Buffer (*Invitrogen*), 1 µL de dithiothréitol (DTT) (*Invitrogen*), 1 µL de RNase out (*Invitrogen*) et 1 µL de Superscript III (*Invitrogen*), pour un Vf de 20 µL.

Après amplification en thermocycleur (25°C 5 min, 50°C 45 min et 70°C 15 min), l'ADNc était immédiatement utilisé pour la suite des expériences.

(4) AMPLIFICATION DES CHAINES LOURDES ET LEGERES DES IG PAR PCR NICHEES

Les amorces utilisées pour l'amplification des régions *IGHV* et *IGLV κ* sur cellules fixées et perméabilisées ont été publiées (Küppers et al., 1993) et sont décrites dans le tableau 9.

(A) PCR 1

Un volume de 95 μ L de mix, contenant 20 μ L de 5X Buffer (*Promega*), 8 μ L de MgCl₂ (*Promega*), 2 μ L de dNTP Mix (10 mM) (*Promega*), 1 μ L de TaqHF (*Roche*), 1 μ L de chaque amorce sens et antisens des gènes de la chaîne lourde (VH) et légère (VK) (*Sigma*) et 46 μ L d'eau stérile (DNase et RNase free), était déposé dans des barrettes à PCR (*Sarstedt*) auquel était ajouté 5 μ L de ADNc pour un Vf de 100 μ L/tube.

Les conditions de la PCR I étaient les suivantes : 94°C 1 min, puis 35 cycles à 94°C 45 sec, 59°C 90 sec, 72°C 180 sec, suivis d'une élongation finale à 72°C 10 min.

(B) PCR 2

Un mix de 48 μ L, pour l'amplification des VH, constitué de 25 μ L de 5X GoTaq MasterMix Green (*Promega*), 2 μ L de chaque amorce sens spécifique des VH (6 totales), 2 μ L de chaque amorce anti-sens spécifique des JH (3 totales) et 5 μ L d'eau stérile, était déposé dans des barrettes à PCR (*Sarstedt*) auquel était ajouté 2 μ L de produit de PCR 1 pour un Vf de 50 μ L/tube.

La même chose était effectuée en parallèle pour l'amplification des V κ selon le même protocole mais avec des amorces sens et anti-sens spécifiques des V κ et J κ respectivement.

Le protocole d'amplification était le même que la PCR I.

Les amplicons de la PCR2 étaient ensuite placés sur glace et la présence des transcrits des gènes amplifiés a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (*Sigma-Aldrich*) contenant 0,005 % d'intercalant d'ADN (*GelRed, Biotium*). La taille attendue des amplicons pour VH et VK était la même, de 300 pb.

Tableau 9. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des Ig sur pools lymphocytaires B fixés et perméabilisés, à partir du ADNc en PCR nichée (d'après Küppers et al., 1993)

PCR1		Sens	Anti-sens		
XJ 160	V _H 1	ACTAGTCGACCTCAGTGAAGGT(CT)TCCTGCAAGGC	XJ 166	J _H 1,2,4,5	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
XJ 161	V _H 2	ACTAGTCGACGTCTTCGCTGGTGAAG(GC)CCACAC	XJ 167	J _H 3	TACCTGAAGAGACGGTGACCATTGT
XJ 162	V _H 3	ACTAGTCGACGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAG	XJ 168	J _H 6	ACCTGAGGAGACGGTGACCCTGGT
XJ 163	V _H 4	ACTAGTCGACCTGCCCCTCACCTGC(AG)CTGTCTC			
XJ 164	V _H 5	ACTAGTCGACAAAAAGCCCGGAGTCTCTGA(AG)GA			
XJ 165	V _H 6	ACTAGTCGACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG			
XL 47	V _L 1	TGATGTCGACATCC(AG)G(TA)TGACCCAGTCTCC(AT)TG	XL 53	J _L 1,2,4	ACTCACGTTTGAT(TC)TCCA(AG)CTTGGTCC
XL 48	V _L 2	TGATGTCGACAG(TA)CTCCACTCTCCCTG(CT)CCGTCA	XL 54	J _L 3	GTAAGTACGTTTGATATCCACTTTGGTCC
XL 49	V _L 3	TGATGTCGACTCCAG(GC)CACCTGTCT(GT)TGTCTC	XL 55	J _L 5	GCTTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC
XL 50	V _L 4	TGATGTCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC			
XL 51	V _L 5	TGATGTCGACAGTCTCCAGCATTCATGTCAGCGA			
XL 52	V _L 6	TGATGTCGACT(CT)CTCTGTGTGACTCCA(AG)(AG)GGAG			
PCR2		Sens	Anti-sens		
Idem PCR1			XJ 169	J _H 1,3,4,5	ACTAGTCGACGGTGACCAGGGT(GCT)CC(CT)GGCC
			XJ 170	J _H 2	ACTAGTCGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC
			XJ 171	J _H 6	ACTAGTCGACGGTGACCCTGGTCCCTTGCC
			XL 56	J _L 1,2	TGATGTCGACTTGAT(CT)TCCA(GC)CTTGGTCCC(CT)TGCC
			XL 57	J _L 3	TGATGTCGACTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGC
			XL 58	J _L 4	TGATGTCGACTGATCTCGACTTTGGTCCCT
			XL 59	J _L 5	TGATGTCGACTAATCTCCAGTCGTGTCCTTGCC

(5) CLONAGE ET SEQUENCAGE DES AMPLICONS OBTENUS

Les amplicons de PCR2 ont été purifiés à l'aide du kit Wizard® Genomic DNA Purification (*Promega*) selon les recommandations du fabricant, puis la quantité et la qualité de l'ADN amplifié a été analysée à l'aide du NanoDrop2000c

La ligation des produits de PCR 2 dans un vecteur de clonage a été réalisée à l'aide du kit TA Cloning (*ThermoFischer*). Brièvement, 25 ng de chaque amplicon de PCR 2 purifié dans 50 ng de vecteur d'expression linéarisé a été réalisée par la ligase T4 DNA dans un volume total de 10 µL, durant une nuit à 14°C.

Des bactéries compétentes *Escherichia coli* (50 µL) (*Top 10, Invitrogen*) ont ensuite été transformées avec la totalité du produit de ligation par choc thermique à 42°C suite à une incubation préalable de 30 min sur glace. Après une incubation d'une nuit à 37°C sous agitation, les colonies ont été criblées par PCR en utilisant les

amorces sens et anti-sens spécifiques des V_H et V_K des PCR2 et le kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (*Promega*) afin de déterminer les colonies ayant intégré l'insert. Ces colonies sélectionnées ont ensuite été incubées une nuit dans du milieu LB avec ampicilline (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) afin d'augmenter la quantité d'ADN plasmidique de chaque colonie en vue du séquençage.

L'ADN plasmidique a ensuite été isolé à partir de ces colonies avec le kit QIAprep Miniprep (*Qiagen*) selon les recommandations du fabricant, puis séquencés par méthode Sanger par les services de GATC Biotech (Mulhouse, France) à l'aide des amorces sens et anti-sens respectives utilisées en pour la PCR2. Chaque séquence sens et anti-sens respective était ensuite alignée dans le logiciel vector NTI (*Life Technologies*).

Chaque séquence d'Ig a été analysée par comparaison IgBLAST avec la base de données IMGT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) et par IMGT/V-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=hulanlg), afin d'identifier les segments de gènes germinaux $V(D)J$ avec les la plu uns haute concordance.

La longueur de la CDR3 et le nombre d'acides aminés (AA) chargés positivement (histidine, arginine, lysine) ou négativement (aspartate, glutamate) ont été déterminées à partir des données d'IgBLAST.

Les séquences D des chaines IGH et les cadres de lecture des séquences D ont été identifiés selon les critères de Corbett et al. (Corbett et al., 1997).

Le nombre et le type de mutations nucléotidiques des différents cadres de lectures et des CDRs comparativement aux séquences germinales ont été évalués afin de déterminer le ratio de mutations non silencieuses (remplacement : R) sur les mutations silencieuses (silent : S). Un ratio R/S > 2,925 dans les CDRs était considéré comme la signature d'une sélection antigénique (Shlomchik et al., 1987).

Enfin, le degré d'homologie nucléotidique avec les séquences germinales été déterminé pour chaque chaîne lourde et légère. Une séquence présentant degré d'homologie $\geq 98\%$ avec la séquence germinale était considérée comme non mutée.

B) A PARTIR DE CELLULES UNIQUES LYMPHOCYTAIRES B

(1) TRI DES LB EN PLAQUE DE 96 PUIITS PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Après décongélation rapide des cryotubes, les LB tumoraux (CD5⁺) et non tumoraux résiduels (CD5⁻IgM⁻IgD⁻) ont été triés en cellule unique sur plaques sèches (*Hard-Shell High-Profile Biorad*) indépendantes de 96 puits par FACS à l'IGBMC (Illkirch), après marquage membranaire par mélange d'Ac monoclonaux suivants : CD19-PE-Cy7, IgD-biotine, CD3-APC (*BD Biosciences*) CD5-ECD (*Beckman Coulter*). Ces plaques ont été immédiatement recouvertes par une feuille d'aluminium étanche (*Adhesive PCR Sealing Foil Sheets, Thermo Scientific*) et congelées à -80°C jusqu'à analyse.

(2) SYNTHÈSE D'ADNC

Du fait de la très faible quantité d'ARNm par puit (1 cellule), la synthèse de l'ADNc a été effectuée directement sur cellule unique, sans étape préalable d'extraction d'ARN.

L'ADNc de *ZAP-70* étant plus difficile à obtenir que celui des Ig, probablement du fait du taux d'ARNm plus faible, il a été utilisé à la fois des amorces aléatoires pour l'amplification de l'ARN total, et une amorce spécifique anti-sens spécifique de *ZAP-70* (Tableau 10). Ainsi, la synthèse d'ADNc a été effectuée directement dans les plaques 96 puits. Un mix était ajouté dans chaque puit, contenant 0,75 µL d'amorces hexamériques aléatoires pd(N)6 (*Takara, ClonTech*), 1 µL d'amorce spécifique anti-sens *ZAP-70* 10 µM (LIP 564, conçue dans notre laboratoire, cf. ci-dessous), 0,4 µL de dithiothréitol (DTT) 100 mM (*Invitrogen, kit Superscript III*), 0,5 µL de NP40 Surfact-Amps 10 % (*Thermo Fischer Scientific*), 0,5 µL de RNase out (*Invitrogen*), et de l'eau stérile (DNase et RNase free) pour un Vf de 9 µL/puit.

Les plaques étaient ensuite placées 1 min à 65°C puis immédiatement sur glace. Un second mix de 11 µL était ensuite ajouté, contenant 4 µL de 5X first-strand Buffer (*Invitrogen, kit SuperScript III*), 1 µL de mix dNTP (*ClonTech*) 10 mM, 1 µL de DTT 100 mM (*Invitrogen, kit Superscript III*), 0,5 µL de RNase out (*Invitrogen*), 0,8 µL U de SuperScript III RT (*Invitrogen*), et 3,7 µL d'eau stérile pour un volume final de 20 µL/puit.

La transcription inverse a été effectuée en thermocycleur selon le protocole suivant : 42°C 5 min, 25°C 10 min, 50°C 55 min et 94°C 5 min.

Les amorces spécifiques du gène *ZAP-70* ont été conçues à l'aide du vecteur NTI, à partir de l'isoforme 1 de l'ARNm de *ZAP-70* (NM_001079.3 NCBI) (Tableau 10).

Tableau 10. Séquences des amorces spécifiques de *ZAP-70* utilisées pour son amplification par RT-PCR et PCR nichées

Type de PCR	Sens de l'amorce	Séquence	Nomenclature utilisée pour l'étude
PCR1	Sens	ACCCATCCACGTTGACTCATCCTCA	LIP 563
	Antisens	TTGGAGAGGCCAAAGTCGCTGATCTTG	LIP 564
PCR2	Sens	ATACACCCCTGAGCCAGCACGCAT	LIP 565
	Antisens	CATCTCCATGACCAGCATGA	LIP 566

(3) AMPLIFICATION DES CHAINES LOURDES ET LEGERES DES IG PAR PCR NICHEES

Les amorces utilisées pour l'amplification des régions *IGHV*, *IGLV λ* et *IGLV κ* ont été publiées (Tiller et al., 2008) et sont décrites dans le tableau 11.

La technique était faite en deux étapes pour des raisons de temps-coût car l'expression de *ZAP-70* n'est pas présente dans tous les LB non tumoraux résiduels (cf. Introduction, partie IV. C).

Ainsi, l'amplification de *ZAP-70* a été d'abord effectuée sur l'ensemble des ADNc issus des LB cellules uniques non tumoraux afin de sélectionner pour la suite uniquement celles étant *ZAP-70*⁺. Dans la PCR1, les amorces sens et anti-sens des *Ig* étaient constituées d'un mix d'oligonucléotides spécifiques, les premières se fixant sur la séquence complémentaire du ADNc correspondant initialement à la région non traduite 5' de l'ARNm (5'UTR), et les secondes se fixant sur les régions constantes (mix de C γ pour IGHV ; C λ pour IGLV λ ; et C κ pour IGLV κ).

La PCR2 était une PCR nichée, dans laquelle les amorces sens se localisaient spécifiquement dans la framework region (FR) 1, et les amorces anti-sens dans les séquences correspondant aux gènes J (pour IGHV et IGLV κ) ou dans les régions constantes (pour IGLV λ). Les amorces utilisées dans la PCR2 contenaient des sites de restriction enzymatique permettant la digestion ultérieure et ligation dans des vecteurs de clonage.

Les transcrits des gènes de *ZAP-70*, *IGHV*, *IGLV λ* et *IGLV κ* ont donc été amplifiés de manière indépendante par des PCR1 nichées à partir de 6 μ L d'ADNc pour *ZAP-70* et 4 μ L pour les *Ig*. Toutes les réactions de PCR ont été réalisées plaques de 96 puits (*Denville Scientific*) dans un Vf de 38 μ L, contenant 0,73 μ L de chaque primer (10 μ M), 0,45 μ L de mix dNTP 10 mM (*Clontech*), 0,44 μ L de HotStarTaq (*Qiagen*), 4 μ L de PCR Buffer 10X (HotStarTaq kit, *Qiagen*,) et de l'eau stérile. Le protocole était identique pour les PCR2 avec respectivement 6 μ L et 4 μ L des produits de PCR1 pour *ZAP-70* et pour les *Ig*.

Tableau 11. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des Ig à partir du ADNc en PCR nichée. Les lettres en gras et en rouge représentent les sites de restriction enzymatique (d'après Tiller et al., 2008)

IgH	Sens		Anti-sens	
PCR1	5' L-VH1 5' L-VH2 5' L-VH3 5' L-VH4/6 5' L-VH5	ACAGGTGCCCACTCCAGGTGCAG CTGAACCGGTGTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG CCCAGATGGGTCTGTCCAGGTGCAG CAAGGAGTCTGTCCGAGGTGCAG	3' C μ CH1 3' IgD CH1	GGGAATTCTCACAGGAGACGA GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC
PCR2	5' AgeI VH1/5 5' AgeI VH3 5' AgeI VH4 5' AgeI VH3-23 5' AgeI VH4-34	CTGCA ACCGGT GTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG CTGCA ACCGGT GTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG CTGCA ACCGGT GTACATTCCAGGTGCAGCTGCAGGAG CTGCA ACCGGT GTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG CTGCA ACCGGT GTACATTCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG	3' SalI JH1/2/4/5 3' SalI JH3 3' SalI JH6	TGCGAA GTGACG CGTGAGGAGACGGTGACCAG TGCGAA GTGACG CGTGAAGAGACGGTGACCATTG TGCGAA GTGACG CGTGAGGAGACGGTGACCCTG
Ig λ	Sens		Anti-sens	
PCR1	5' L V λ 1 5' L V λ 2 5' L V λ 3 5' L V λ 4/5 5' L V λ 6 5' L V λ 7 5' L V λ 8	GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG GTTCTTGGGCCAATTTATGCTG GGTCCAATTCYAGGCTGTGGTG GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	3' C λ 1	CACCAGTGTGGCCTTGTGGCTTG
PCR2	5' AgeI V λ 1 5' AgeI V λ 2 5' AgeI V λ 3 5' AgeI V λ 4/5 5' AgeI V λ 6 5' AgeI V λ 7/8 5' AgeI V λ 3-19	CTGCT ACCGGT TCCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG CTGCT ACCGGT TCCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG CTGCT ACCGGT TCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG CTGCT ACCGGT TCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA CTGCT ACCGGT TCTTGGGCCAATTTATGCTGACTCAG CTGCT ACCGGT TCCAATTCYAGRCTGTGGTGACYCAG CTGCT ACCGGT TCTGTGACCTCTTCTC	3' XhoI C λ 1	CTCCTCA CTCGAG GGYGGGAACAGAGTG
Ig κ	Sens		Anti-sens	
PCR1	5' L V κ 1/2 5' L V κ 3 5' L V κ 4	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG CTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAG ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG	3' C κ 1	CCAGATTTCAACTGCTCATCAGA
PCR2	5' AgeI V κ 1-5 5' AgeI V κ 1-9 5' AgeI V κ 1D-43 5' AgeI V κ 2-24 5' AgeI V κ 2-28 5' AgeI V κ 3-11 5' AgeI V κ 3-15 5' AgeI V κ 3-20 5' AgeI V κ 4-1	CTGCA ACCGGT GTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTC TTGTGCTGCA ACCGGT GTACATTCAGACATCCAGTTGACCCAGTCT CTGCA ACCGGT GTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC CTGCA ACCGGT GTACATGGGGATATTGTGATGACCCAGAC CTGCA ACCGGT GTACATGGGGATATTGTGATGACTCAGTC TTGTGCTGCA ACCGGT GTACATTCAGAAATTC CTGCA ACCGGT GTACATTCAGAAATAGTGATGACGCAGTC TTGTGCTGCA ACCGGT GTACATTCAGAAATTTGTTGACCGCAGTCT CTGCA ACCGGT GTACATTCGGACATCGTGATGACCCAGTC	3' BsiWI J κ 1/2/4 3' BsiWI J κ 3 3' BsiWI J κ 5	GCCAC CGTACG TTTGATYTCCACCTTGGTC GCCAC CGTACG TTTGATATCCACTTGGTC GCCAC CGTACG TTTAATCTCCAGTCGTGTC
Autres amorces	5' Pan V κ 5' AbSense (screening)	ATGACCCAGWCTCCABYCWCTG GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	3' IgG1 int	GTTCGGGAAGTAGTCCTTGAC

Le programme d'amplification en thermocycleur était de 94°C pendant 5 min, suivi de 50 cycles à 94°C 30 sec, 58°C (PCR1) ou 51,7°C (PCR2) 30 se, 72°C 55 sec (PCR1) ou 45 sec (PCR2), suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 7 min.

Les amplicons de la PCR2 étaient ensuite placés sur glace et la présence des transcrits des gènes amplifiés a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 % (*Sigma-Aldrich*) contenant 0,005 % d'intercalant d'ADN (*GelRed, Biotium*). Les tailles des bandes attendues étaient les suivantes : ZAP-70 : 375 pb ; IGHV : 400 pb (pouvant varier légèrement selon la taille de la CDR3) ; IGLV κ : 345 pb ; IGLV λ : 295 pb

(4) SEQUENÇAGE DES AMPLICONS

Les amplicons de PCR2 ont été purifiés en utilisant le kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (*Promega*) selon les recommandations du fabricant, puis la quantité et la qualité de l'ADN amplifié a été analysée à l'aide du NanoDrop2000c

Ces amplicons ont ensuite été directement séquencés et analysés de la même façon que décrit précédemment (Cf. D.1.e) à l'aide des amorces sens et anti-sens respectives utilisées en pour la PCR2.

Pour ZAP-70, la séquence a été analysée par méthode BLAST (basic local alignment search tool) NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), afin de confirmer que la séquence amplifiée était bien spécifique de l'isoforme 1 de ZAP-70 (NM_001079.3).

5. GENERATION D'AC MONOCLONAUX RECOMBINANTS A PARTIR DE LB NON TUMORAUX ZAP-70+ TRIES EN CELLULE UNIQUE

Les étapes initiales étaient identiques à celles pour l'étude du répertoire sur cellules uniques jusqu'à l'obtention des amplicons purifiés de la PCR2.

A) CLONAGE DES PRODUITS DE PCR2 DANS DES VECTEURS D'EXPRESSION

Les amplicons purifiés des PCR2 ont été digérés avec les enzymes de restriction respectifs *AgeI*, *Sall*, *XhoI* et *BsiWI* (NEB, *BioLabs*) selon les recommandations du fabricant, puis purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR purification (*Qiagen*) préalablement à la ligation dans des vecteurs d'expression.

Les vecteurs d'expression humains *Igγ1*, *Igκ* et *Igλ* ont été gentiment fournis par le Pr Éric Meffre, du laboratoire d'Immunobiology (Yale University School of Medicine, New Haven, USA). Ils contiennent une séquence peptidique signal murine d'Ig (Genbank accession n° DQ407610) et un site de clonage multiple en amont des régions constantes des *Igγ1*, *Igκ* et *Igλ* humains. La transcription est sous l'influence du promoteur du cytomégalo virus humain, et les clones peuvent être sélectionnés sur la base de leur résistance à l'ampicilline.

Les vecteurs ont été digérés et purifiés à l'aide des mêmes réactifs que pour les amplicons de PCR2 écrits précédemment, puis déphosphorylés par de la phosphatase alcaline intestinale de veau (*Roche*), selon les recommandations du fabricant, avant d'être à nouveau purifiés selon la même méthode que ci-dessus.

La ligation d'environ 110 ng de chaque amplicon de PCR2 digéré et purifié dans environ 60 ng de vecteur d'expression linéarisé a été réalisée par la ligase T4 DNA (NEB, *BioLabs*) dans un volume total de 10 µL, pendant 1h à température ambiante (TA).

Des bactéries compétentes *Escherichia coli* (75 µL) ont été transformées avec la totalité du produit de ligation par choc thermique à 42°C suite à une incubation préalable de 30 min sur glace. Après une incubation d'une nuit à 37°C sous agitation, les colonies ont été criblées par PCR en utilisant, pour *IGH*, l'amorce sens 5' Absens et l'anti-sens 3' IgG1 int, et les amorces anti-sens respectives des PCR2 pour les chaînes légères (Tableau 12).

L'ADN plasmidique a été isolé à partir des colonies sélectionnées après une incubation préalable d'une nuit dans du milieu LB avec ampicilline (50 µL/mL) à l'aide du kit QIAprep Miniprep (*Qiagen*), puis séquencé afin de confirmer l'homologie avec le produit de PCR original et l'absence de mutation(s) induite(s) par la ligation. En cas de concordance, cet ADN plasmidique était alors utilisé pour la transfection.

Les premières transfections cellulaires, purifications des surnageants, quantification des IgG produites et tests initiaux des autoréactivités ont été réalisées dans notre unité, puis ces techniques ont été secondairement effectuées par l'équipe du Pr Éric Meffre, du laboratoire d'Immunobiology (Yale University School of Medicine, New Haven, USA).

B) TRANSFECTIONS CELLULAIRES

Les Ac monoclonaux ont été produits par cotransfection transitoire de cellules de reins embryonnaires humains (HEK) 293 (ATCC, n°CRL-1573) (*Gibco Invitrogen*) en utilisant la méthode de précipitation à la polyéthylénimine ramifiée (PEI) (*Sigma*).

Les cellules adhérentes (HEK 293A) en croissance dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (*Lonza*) + GlutaMAX (*Gibco Invitrogen*) supplémenté avec 10 % de serum de veau foetal décomplémenté et ultra-pauvre en IgG, du 1 mM sodium pyruvate, de la pénicilline à 100 U/mL, de la streptomycine à 100 µg/mL et de l'amphotéricine B à 0,25 µg/mL, ont été lavées à 70 % de confluence dans du DMEM sans sérum pendant 5 min.

Le milieu était ensuite remplacé par du DMEM sans sérum + Gluta-MAX supplémenté avec 1 % de Nutridoma-SP (*Roche*) et le même cocktail

d'antibiotiques/antimycotique que précédemment (*Gibco Invitrogen*) avant la transfection médiée par PEI avec des quantités équivalentes (10 µg) d'ADN des vecteurs d'expression IGH et de la chaîne légères correspondantes (κ ou λ).

Les Ac ont été alternativement produits par transfection transitoire de cellules HEK en suspension (HEK 293F) avec du PEI-Max (*Polysciences*) comme agent de transfection, et une quantité totale de 20 µg d'AND vectoriel comme décrit précédemment (Corti et al., 2011).

Un résumé de la stratégie de production des Ac monoclonaux recombinants humains est proposé en figure 25.

C) QUANTIFICATION DES AC MONOCLONAUX ET TESTS DE LEURS AUTOREACTIVITES

(1) PURIFICATION DES AC MONOCLONAUX

Au sein de notre unité, les Ac issus des surnageants de culture ont été purifiés soit à l'aide du kit Melon Gel Monoclonal IgG Purification (*Life technologies*) selon les recommandations du fabricant et élués à l'aide du VIVASPIN 20® 30 000 MWCO (Sigma-Aldrich).

Pour les Ac monoclonaux produit à Yale, ils ont été purifiés par le kit Protein G-Sepharose par liaison aux protéines G (*Sigma-Aldrich*) et élués avec du tampon glycine 0,1 M, pH 3 dans du tampon de stockage (1 M Tris-HCl, pH 8) selon les protocoles publiés antérieurement (Tiller et al., 2008).

(2) QUANTIFICATION DES AC MONOCLONAUX

Les Ac monoclonaux issus des surnageants de culture ont été quantifié par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Le coating des plaques ELISA était tout d'abord réalisé avec 50 μ L d'Ac anti-IgG humaines (*Jackson immunoresearch*) diluées à 5 μ g/mL dans du tampon carbonate/bicarbonate (TCB) (0.1 M pH 9.5 (Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂HPO₄), avec une incubation d'1h à 37°C. Après 3 lavages au PBSX1, les puits étaient saturés avec 100 μ L de PBS-BSA 1 % (*Euromedex*) pendant 45 min à 37°C.

Des dilutions d'IgG humaines (*Jackson immunoresearch*) de concentrations connues, servant de courbes étalons, étaient réalisées en tampon PBS-Tween20 0.1 %-gélatine 1 % (PBS-TG). Ces dilutions et les surnageants à tester étaient ensuite déposés en dupliqua dans les plaques ELISA à raison de 50 μ L/puits, et l'ensemble incubé 2h à 37°C. Après 4 lavages au PBS-Tween20 0.1% (PBS-T), 50 μ L d'IgG secondaire anti-IgG humaines couplée à la peroxydase (*Jackson immunoresearch*), diluée au 1/20 000e dans du PBS-T, étaient ajoutés et incubés 1h à 37°C.

Après 4 nouveaux lavages au PBS-T, les plaques étaient révélées par ajout de 50 μ L/puit d'orthophénylènediamine (OPD) (*Sigma*), qui est un des substrats de la peroxydase, et incubation 20 min à TA à l'obscurité. La réaction enzymatique était ensuite arrêtée par ajout de 50 μ L de solution de H₂SO₄-2N-Sulfite de Na 0,5 %. L'absorbance a été mesurée par lecture des densités optiques (DO) à 492 nm par le lecteur Multiskan FC version 1.00.96 (*Thermoscientific*) et les taux d'IgG totales des surnageants quantifiés par comparaison avec la courbe étalon. Les chaînes légères étaient semi-quantitativement mesurées avec la même courbe étalon à l'aide d'un Ac secondaire couplé à la peroxidase anti- κ ou anti- λ .

Les concentrations en IgG et IgM totales des échantillons ont été ensuite calculés à l'aide du logiciel SkanIt Software 3.1.0.4 RE for Multiskan FC, à partir des courbes étalons en phase linéaire, par régression logistique linéaire 4 paramètres. Un seuil de coefficient de détermination $R^2 \geq 0,98$ était retenu comme acceptable pour l'interprétation des données.

Pour les Ac monoclonaux produits à Yale, leur concentration a été déterminée par ELISA anti-IgG1 humains à l'aide d'IgG1 humaines monoclonales de référence selon les protocoles antérieurement publiés (Tiller et al., 2008; Wardemann et al., 2003). La pureté protéique et l'expression d'un Ac complet comprenant à la fois les chaînes lourdes et légères, ont été vérifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

(3) AUTOREACTIVITES ANTI-ADNDB, -THYROGLOBULINE ET -ACTINE PAR ELISA

Concernant les ELISA anti-ADNdb, le coating était réalisé avec 50 µL/puit de Calf thymus DNA (*Sigma*) dilué à 100 ng/mL dans du tampon HCl autoclavé pH 7,5 et incubés 1h à 37°C. Après 3 lavages au PBSX1, l'ADN était digéré par 50 µL/puits de S1 nucléase (*Promega*) à 0,001 U/µl durant 1h à 37°C. Après 3 lavages au PBSX1, les puits étaient saturés avec 100 µL de PBS-BSA 1 % (*Euromedex*) pendant 45 min à 37°C.

Cinquante microlitres de surnageant pur/puit étaient déposés en duplicata dans les plaques ELISA à raison de 50 µL/puits et l'ensemble incubé une nuit entière à 37°C.

Du sérum pur de patients atteints de LES avec anti-ADNdb+ connus et du milieu de culture seul étaient utilisés respectivement comme contrôle positif et négatif.

Les étapes suivantes de lavages, et de révélation étaient réalisées de la même façon que précédemment pour la détection des IgG totales. Du fait de l'indisponibilité de courbe étalon, les résultats étaient exprimés en titres (inverse de la dilution nécessaire pour atteindre une DO choisie).

Le même protocole a été utilisé pour les ELISA anti-thyroglobuline et anti-actine, avec le coating utilisant respectivement de la thyroglobuline à 50 µg/mL (*Sigma*) et de l'actine à 10 µg/mL (*Sigma*).

(4) TCD ET MAIPA

Les Ac monoclonaux des surnageants de culture non purifiés ont été testés pour leur réactivité envers les érythrocytes par TCD et envers les plaquettes par test MAIPA (monoclonal antibody immobilization of platelet antigens).

Ces tests ont été réalisés à l'Établissement Français du Sang de Strasbourg (EFS Strasbourg) par Isabelle Mendel (Coombs direct) et le Dr Arnaud Dupuis (MAIPA).

(5) REACTIVITE ANTI-NUCLEAIRE ET POLYREACTIVITE

Ces tests ont été réalisés à Yale par l'équipe du Pr Éric Meffre à partir des Ac monoclonaux purifiés issus des surnageants de culture.

(A) REACTIVITE ANTI-NUCLEAIRE

Elle a été évaluée en immunofluorescence indirecte. Brièvement, des plaques recouvertes de cellules HEp-2 (*Bion Enterprises Ltd.*) ont été incubées en chambre humide à TA avec les Ac monoclonaux recombinants à une concentration de 50–100 µg/mL. Une IgG de chèvre anti-humaine couplée au fluorochrome FITC (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.*) a été utilisée comme Ac secondaire de détection de la réactivité.

(B) POLYREACTIVITE

Elle a été évaluée par ELISA. Brièvement, trois différents Ac contrôles ont été utilisés dans tous les ELISAs : mGO53 (non réactif), eiJB40 (faiblement réactif) et ED38 (fortement réactif) (Meffre et al., 2004; Wardemann et al., 2003).

Les Ac étaient considérés comme polyréactifs lorsqu'ils reconnaissaient au moins deux Ag parmi les trois testés, incluant l'ADN double brin (ADNdb), l'insuline et le LPS (Wardemann et al., 2003).

Pour tous les ELISAs, une IgG de chèvre anti-humaine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP : horseradish peroxidase) (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.*) a été utilisée comme Ac secondaire et révélée par l'ajout du substrat chromogénique 3,3', 5,5'-tetraméthylbenzidine (*Bio-Rad Laboratories*).

Le seuil de réactivité était défini la densité optique (DO) minimale à 405 nm X la déviation standard du contrôle positif eiJB40 à une concentration de de 1 µg/mL.

Un Ac était considéré comme réactif si le résultat positif était confirmé dans au moins deux expérimentations différentes (Wardemann et al., 2003).

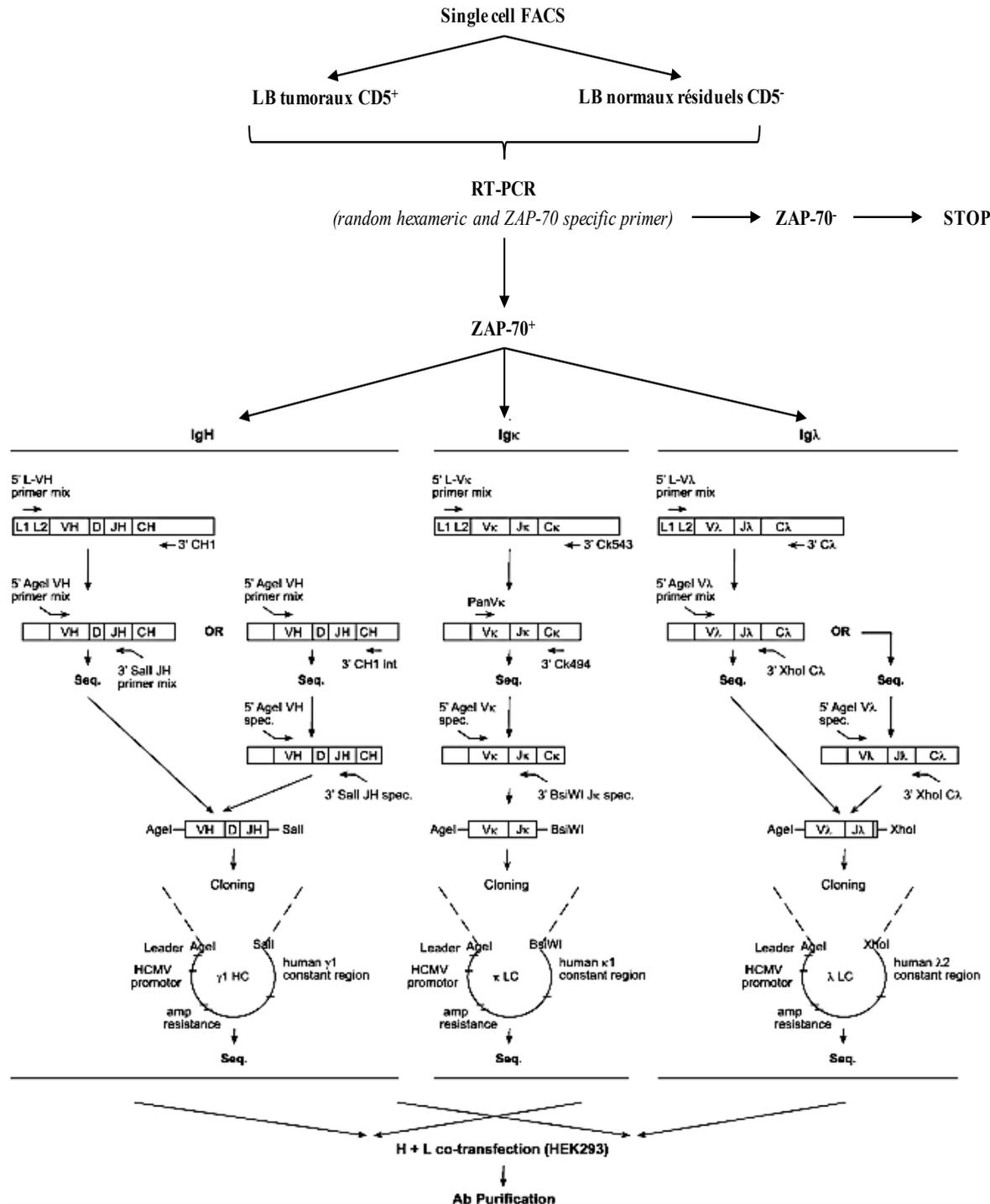


Figure 25. Stratégie de sélection, clonage et expression des Ac monoclonaux recombinants humains issus des LB ZAP-70⁺ triés en cellule unique (adapté de Tiller et al., 2008).

Le gène *Zap-70* et ceux de chaînes lourdes d'Ig (*IGHV*) et légères (*IGLVκ*) ont été amplifiés sur cellules uniques par PCR nichée à partir de ADNc généré par amplification utilisant des amorces aléatoires hexamériques (*Ig*) et spécifiques (*Zap-70*). La PCR1 utilisait des amorces sens spécifiques de la région non traduite 5' de l'ARNm (5'UTR) et des amorces anti-sens spécifiques des régions constantes respectives des *IGH*, *Igκ* et *Igλ*. La PCR2 utilisait des amorces sens spécifiques du cadre de lecture 1 et des amorces anti-sens spécifiques des gènes *J* (pour *IGHV* et *IGLVκ*) ou des régions constantes (pour *Igλ*). Les amorces de PCR2 contiennent des sites de restriction enzymatique permettant la ligation et le clonage dans des vecteurs d'expression eucaryotes contenant les régions des chaînes humaines *Igγ1*, *Igκ* et *Igλ*. La co-transfection de la chaîne lourde et de la chaîne légère correspondante dans les cellules HEK 293 permettait la production d'Ac monoclonaux à partir de ces cellules.

B. PARTIE MURINE DU PROJET

1. GENERATION DU MODELE MURIN KI ZAP-70

(N° ACCREDITATION #10771-2018011808141516)

L'ensemble des étapes de clonage et de sélection des fondateurs « KI *Zap-70* » a été réalisé par Anne-Marie Knapp, ingénieur d'étude niveau 1 dans notre équipe.

Le modèle consiste en une insertion ciblée de la séquence codante du gène murin *Zap-70* dans le locus ROSA26 par recombinaison homologue entre le vecteur de recombinaison CTV (CAG-STOP-EGFP-ROSA Targeting vector) (laboratoire du Dr Klaus Rajewsky (Xiao et al., 2007)), et le locus cible (ROSA26).

Ce locus a été choisi pour sa distribution ubiquitaire chez la souris, sans fonction associée (transcription d'un ARN non codant), et sa grande fréquence de recombinaison homologue. La technique globale est détaillée ci-dessous.

A) CLONAGE DE ZAP-70 DANS LE VECTEUR PLASMIDIQUE

(1) AMPLIFICATION ET CLONAGE DE ZAP-70

La séquence codante du gène murin *Zap-70* (1 850 kb, NM14888.1) a été amplifiée par RT-PCR à partir de LT spléniques d'une souris Balb/c après stimulation par anti-CD3 et anti-CD28, à l'aide d'une amorce spécifique de *Zap-70* (GCCACATGCAGCCTCGGCCACCTGTTC) (*Eurogentec*). Les cycles de PCR ont été optimisés afin de réduire le risque de mutations induites, non négligeable compte tenu de la taille du gène (1 850 kb) : 94°C durant 2 min, puis 18 cycles à 94°C 30 sec, 62°C 2 min et 72°C 3 min, suivi d'une élongation finale de 5 min à 72°C.

Les séquences des amorces utilisées pour la première PCR étaient les suivantes (Eurogentec) :

- Sens : ATGCCCGATCCCGCGGCGCACCTGCCATTC
- Anti-sens : GCCACATGCAGCCTCGGCCACCTGTTC

Le produit de PCR obtenu de la taille attendue de 1850 kb nommé PCR1.Zap-70, a été sous-cloné dans un plasmide par TA Cloning (*Invitrogen*) puis séquencé et analysé par BLAST afin de s'assurer de l'absence de mutation et de son homologie complète avec la séquence ADN codante consensus dans NCBI (référence 14888.1).

(2) AJOUT DES SITES DE RESTRICTION ASCI ENCADRANT LA SEQUENCE CODANTE DE ZAP-70

Un clone dépourvu de mutation a ensuite été ré-amplifié à l'aide d'amorces spécifiques comportant une séquence Kozak ainsi que des sites de restriction enzymatiques permettant la digestion ultérieure par l'enzyme *Ascl*, puis à nouveau cloné et séquencé afin de s'assurer de l'absence de mutations induites. Ces amplicons ont été nommés PCR2.Zap-70.

Cette seconde PCR utilisait les amorces suivantes (Eurogentec) :

Sens : ATTGGCGCGCCTCATACGCCACCATGCCCGATCCCGCGG

Anti-sens : ATTGGCGCGCCTCAGCCACATGCAGCCTCG

Les conditions de PCR étaient les suivantes : 94°C durant 2 min, puis 5 cycles à 94°C 30 sec, 52°C 2 min et 72°C 3 min, puis 13 cycles à 94°C 30 sec, 65°C 2 min, 72°C 3 min, suivi d'une élongation finale de 5 min à 72°C.

(3) VECTEUR DE SUREXPRESSON CTV-ZAP-70⁺

Le vecteur CTV (16 kb) (Xiao et al., 2007) permet d'insérer par recombinaison homologue dans le locus ROSA26 la séquence codante de *Zap-70*.

Celle-ci est précédée du promoteur synthétique CAG et d'une cassette *loxP* Neo-STOP. Une cassette IRES-EGFP flanquée de séquences *frt*, placées entre les sites de clonage pour *Zap-70* et le signal poly-A permet la détection des cellules dans lesquelles l'excision de la cassette Neo-STOP a été efficace, et constitue un rapporteur de la surexpression de ZAP-70 dans ces cellules (Figure 26).

La séquence Kozak placée entre le site *loxP* et le premier ATG de la séquence codante de *Zap-70* permettra une traduction augmentée de la protéine d'intérêt.

Brièvement, 10 µg du vecteur CTV ont été digérés par 30 U d'enzyme *Ascl* (*Biolabs*) dans un Vf de 50 µl, pendant 2h à 37°C en présence de tampon NEB4 1x. Après dépôt du produit de digestion sur gel d'agarose 1 % (*Sigma-Aldrich*) contenant 0,005 % d'intercalant d'ADN (*GelRed*, *Biotium*), le fragment de haut poids moléculaire, correspondant au vecteur digéré, a été purifié.

De la même manière, les amplicons PCR2.*Zap-70* ont été digérés avec *Ascl*, déposés sur gel d'agarose 1 % (*Sigma-Aldrich*) contenant 0,005 % d'intercalant d'ADN (*GelRed*, *Biotium*) et les fragments correspondants à la taille de PCR1.*Zap-70* ont été purifiés.

L'insert (amplicon PCR2.*Zap-70*) et le vecteur (CTV) digérés étaient ensuite ligués (*Invitrogen*) dans un rapport moléculaire de 1,5:1 et 3:1 à 4°C pendant toute une nuit.

Le vecteur final CTV-Zap-70⁺ était ensuite séquencé afin de vérifier la présence de l'insert.

B) INFECTION CELLULAIRE ET PRODUCTION DU MODELE KI ZAP-70

Ces étapes ont été réalisées par l'Institut Clinique de la Souris (ICS, IGBMC, Illkirch).

Brièvement, les cellules souches ES (issues d'embryons de souris C57BL/6N) ont été électroporées avec le vecteur CTV-*Zap-70*⁺.

Les cellules ayant inséré le transgène par recombinaison homologue au locus ROSA26, ont été sélectionnées positivement par ajout de néomycine dans le milieu de culture grâce au gène de résistance à cet antibiotique présent dans l'insert (cassette Néo-STOP).

La localisation de l'insertion a ensuite été vérifiée de Southern-Blot. Les cellules positives sélectionnées ont ensuite été transfectées dans des blastocystes de souris C57BL/6N, puis l'ensemble implanté dans une souris femelle pseudogestante.

Les chimères mâles issues de cette réimplantation d'embryons ont été croisées avec des femelles du même fond génétique C57BL/6N, et les premiers descendants ayant intégrés le transgène (souris fondatrices hétérozygotes KI *Zap-70*^{+/-}) ont été sélectionnés par une PCR de génotypage.

Trois males fondateurs ont été reçus dans notre animalerie afin de développer la lignée KI *Zap-70*.

C) PRODUCTION DU MODELE CONDITIONNEL

Les souris *Zap-70* KI ont été maintenues sur fond C57BL/6N par croisement avec des souris sauvages C57BL/6N. Les descendants *Zap-70*^{+/-} de ces souris ont été croisés entre eux afin de produire des souris homozygotes pour le transgène (*Zap-70*^{+/+}), ceci permettant d'augmenter l'efficacité de la production de souris porteuse du transgène *Zap-70* dans les croisements suivants avec la deuxième lignée transgénique (cf. ci-après)

Ainsi, afin de surexprimer de façon conditionnelle ZAP-70 dans les LB dès le stade proB, les souris *Zap-70*^{+/+} ont été secondairement croisées avec les souris de la lignée murine C57BL/6N *Mb1-Cre*^{+/-} (Hobeika et al., 2006), fournies par le Dr M. Reth (Allemagne).

En effet, en absence de croisement avec des souris transgéniques exprimant la Cre, les souris *Zap-70* KI n'ont pas d'expression de *Zap-70* car réprimée par la présence de la cassette STOP flanquée des sites *loxP*. Les souris *Mb1-Cre*^{+/-} possèdent le transgène codant pour la Cre qui est sous le contrôle du promoteur du gène *Mb1*, ce dernier codant pour la sous-unité Igα du BCR qui est exprimée dès le stade pro-B.

Ainsi, l'expression de la recombinaise Cre permet la délétion de la cassette NéoSTOP et ainsi l'expression du transgène *Zap-70*-IRES-eGFP, menant à la surexpression de ZAP-70 chez la souris, et une expression de la GFP spécifiquement et dès le stade proB (Figure 26).

L'ensemble des croisements a été effectué au sein de l'animalerie rattachée à l'UPR 3572 (FRC 1589 CNRS-IBMC, n° d'agrément : E67-482-2).

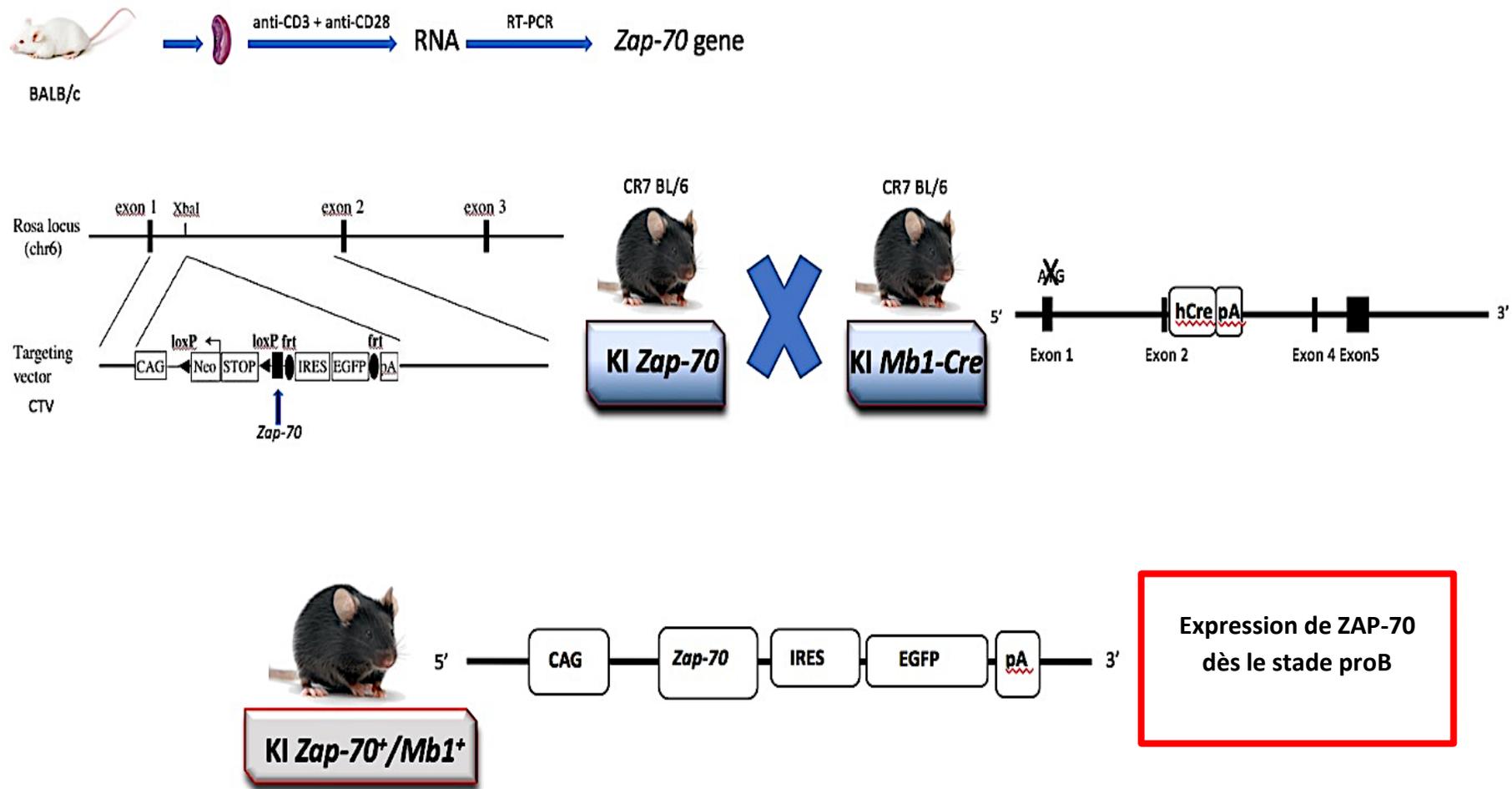


Figure 26. Représentation simplifiée du construit génétique et des croisements murins

Le transgène murin *Zap-70* a été inséré dans le locus ROSA26 par recombinaison homologue, et les souris KI *Zap-70* obtenues ont été croisées avec les souris *Mb1-Cre*^{+/-} permettant l'obtention de souris KI *Zap-70*^{+/+}/*Mb1-Cre*^{+/-} surexprimant de façon conditionnelle le transgène *Zap-70* dans les LB dès le stade proB

2. GENOTYPAGE DES SOURIS TRANSGENIQUES

A) EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE DE QUEUE DE SOURIS

L'ADN génomique était extrait à partir de fragments de queue de souris (5 mm) à l'aide du kit Extract-N-Amp™ Tissue PCR (*Sigma-Aldrich*).

Les biopsies de queues étaient placées dans des microtubes et incubées 10 min à TA dans un mélange composé de 50 µL de solution d'extraction (« extraction solution A ») et 12,5 µL de solution de préparation de tissu (« tissue preparation »).

L'ensemble était ensuite incubé à 95°C durant 3 min puis laissé 1-3h à TA. La digestion était ensuite stoppée par l'ajout de 100 µL de solution neutralisante (« neutralization solution B ») diluée au demi dans de l'eau stérile. L'ADN extrait était ensuite conservé à 4°C jusqu'aux génotypages.

B) PCR DE GENOTYPAGE

Les PCR de génotypage ont été réalisées en 2 temps : tout d'abord l'identification des souris *Zap-70^{+/-}* puis *Zap-70^{+/+}*, ces dernières étant celles utilisées pour les croisements avec la lignée *Mb1-Cre^{+/-}*, puis dans un second temps l'identification des souris double KI *Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{+/-}*.

Pour toute la suite, les souris exprimant ZAP-70 dans les LB (*Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{+/-}*) seront appelées KI ZAP-Mb1 et les souris ayant le transgène mais ne l'exprimant pas (*Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{-/-}*) seront celles utilisées comme contrôle et nommées KI ZAP. Les différentes PCR de génotypage ont été réalisées grâce au kit GoTaq® DNA Polymerase (*Promega*). Le tableau 12 résume les caractéristiques de l'amplification et les séquences nucléotidiques utilisées dans ces PCR.

Un mix, constitué par 5 μL de 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (1,5 mM MgCl_2)², 0,8 μL de dNTPs 10 mM, 2 μL de MgCl_2 25 mM (*Promega*), 0,8 μL de oligonucléotides 100 μM sens (Mqf1) spécifique de la cassette NEO et anti-sens (Er) spécifique du gène *Zap-70* (*Eurogentec*), 0,2 μL de GoTaq® DNA Polymerase (5 U/ μL), et 13,5 μL d'eau stérile, était déposé dans des barrettes à PCR (Sarstedt), auquel étaient ajoutés 2 μL d'ADN extrait, pour un Vf de 25,1 μL .

Les conditions de PCR étaient les suivantes : 94°C 4 min, puis 35 cycles à 94°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 90 sec, suivis d'une élongation finale à 72°C 7 min.

Après amplification, 18 μL de produit de PCR étaient déposés sur gel d'agarose 1 % (*Sigma-Aldrich*) contenant 0,005 % d'intercalant d'ADN (*GelRed*, *Biotium*). Le gel était ensuite révélé aux UV après migration à 130 V pendant environ 30 minutes. La taille attendue de l'amplicon était de 269 pb.

Cette PCR ne permettant pas la distinction entre les souris hétérozygotes ou homozygotes pour le transgène *Zap-70*, une deuxième PCR était réalisée à partir de l'ADN extrait des souris *Zap-70*⁺ de la première PCR afin d'identifier les souris homozygotes *Zap-70*^{+/+}.

Le même protocole de PCR était utilisé, mais avec des amorces sens (Xf) et anti-sens (Er2) hors transgène (*Eurogentec*), amplifiant ainsi normalement le locus ROSA26.

En cas de présence homozygote du transgène *Zap-70* dans le locus ROSA26, ce transgène étant de très grande taille (7 674 pb), la PCR ne pouvait pas être effective, résultant en une absence de bande visible après révélation aux UV (en cas d'hétérozygotie *Zap-70*, une bande de 244 pb était alors visible, correspondant à l'amplification de l'allèle avec le locus ROSA26 sans insert) (Figure 27).

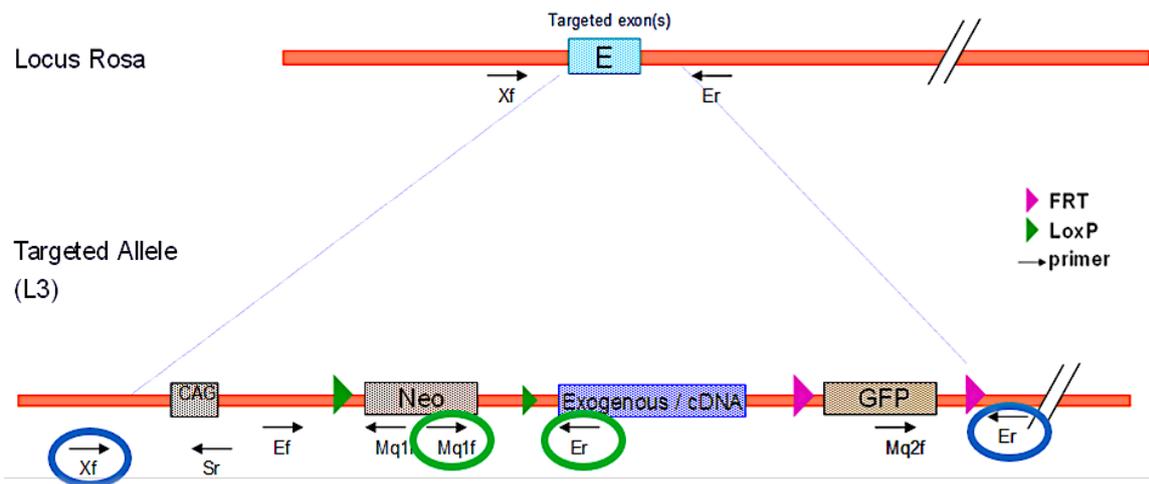


Figure 27. Amorces disponibles et utilisées (entourées) pour le génotypage de *Zap-70* (adapté de Rosa26 (IR00003210 / K624 ICS internal reference) mouse line genotyping protocol)
 PCR1 (en vert) : les amorces sens Mqf1 et anti-sens Er permettent l'identification de la présence du transgène *Zap-70* sans préjuger du caractère hétérozygote ou homozygote
 PCR2 (en rouge) : les amorces sens Xf et anti-sens Er2 permettant d'amplifier le locus ROSA26. En cas de présence homozygote du transgène *Zap-70* (7 674 pb), la PCR ne peut être effective résultant en l'absence de bande visible après amplification

(2) MB1-CRE

Afin d'identifier les souris KI *Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{+/-}*, un mix, constitué par 5 µL de 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (1,5 mM MgCl₂)², 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de oligonucléotides 10 µM sens et anti-sens spécifiques du gène *Mb1* (Eurogentec), 0,2 µL de GoTaq® DNA Polymerase (5 u/µL), et 16,3 µL d'eau stérile, était déposé par tube dans des barrettes à PCR (Starstedt), auquel étaient ajoutés 1 µL d'ADN extrait à partir de queue de souris (cf. précédemment), pour un Vf de 25 µL.

Les conditions de PCR étaient les suivantes : 94°C 5 min, puis 30 cycles à 94°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 60 sec, suivis d'une élongation finale à 72°C 10 min.

Après amplification, 18 µL de produit de PCR étaient déposés sur gel d'agarose à 1 % (Sigma-Aldrich) contenant 0,005 % d'intercalant d'ADN (GelRed, Biotium). La migration était effectuée à 130 V puis révélé aux ultraviolets pour identifier la bande attendue de 600 pb.

Tableau 12. Résumé des caractéristiques des PCR et amorces utilisées pour les génotypages murins

Transgènes	Typage / PCR	Programmes PCR				Séquences des oligonucléotides sens (S) et anti-sens (AS)	Taille du fragment attendu (pb)	
		94°C	Cycles		72°C			8°C
			Description	n				
Zap-70	PCR1 (Zap-70 ^{+/+})	4 min	94°C 30 sec 62°C 30 sec 72°C 90 sec	35	7 min	∞	Mq1f : S : 5'-GTGGTTTGCCAAACTCATC-3' (spécifique de la cassette NEO) Er : AS : 5'-TCCGTGTCCAGCAGGCGTTT-3' (spécifique de Zap-70)	269
	PCR2 (Zap-70 ^{+/+})		94°C 30 sec 65°C 30 sec 72°C 60 sec	30	8 min		XF : S : 5'-ATCCCTGGTTCGAGTATGTCTTGGAA-3' (hors transgène) Er2 : AS : 5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTCTGTCC-3' (hors transgène)	- (7674)
Mb1-Cre	PCR unique	5 min	94°C 30 sec 58°C 30 sec 72°C 1 min	30	10 min	∞	S : 5'-ACCCTCTGATGAAGTCAGGAAGAAC-3' AS : 5'-GCAGATGTCCTTCACTCTGATTCT_3'	500

3. VALIDATION DU MODELE CONDITIONNEL KI ZAP ET ANALYSE DES CELLULES LYMPHOÏDES B A L'ETAT BASAL

A) RECUEIL DES CELLULES LYMPHOÏDES

Les organes lymphoïdes primaires (MO : 2 fémurs) et secondaires (rate et ganglions (GG) inguinaux et axillaires), ainsi que le produit de lavage péritonéal au PBE (PBS, 0.5 % BSA (albumine sérique bovine) (Euromedex), 2 mM EDTA) étaient prélevés chez des souris KI ZAP-70 et KI ZAP âgées de 16-18 semaines.

Les organes étaient dilacérés et écrasés sur un tamis de 40 µm et récupérés dans du RPMI 1640 avec ultraglutamine (Lonza) puis centrifugés à 1 500 rpm pendant 5 minutes. Les culots médullaires, spléniques et péritonéaux étaient repris respectivement dans 500 µL, 1 000 µL et 500 µL de tampon de lyse (NH₄Cl 0,16 M, pH 7,6) afin de lyser les globules rouges, durant 2 minutes, à TA. Après un dernier lavage au RPMI, les différents types cellulaires étaient repris dans du PBE et comptés sur cellule de Neubauer

B) IMMUNOPHENOTYPAGE B A L'ETAT BASAL ET VISUALISATION DE L'EXPRESSION DE LA GFP PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Après lyse des GR et recomptage, les cellules totales de MO, rate, GG et péritonéales étaient reprises dans du PBE à 5.10^5 cellules/25 μ L. Les marquages membranaires des cellules étaient réalisés en plaques 96 puits (*Greiner*), chaque puits contenant 5.10^5 cellules, avec différentes combinaisons d'Ac monoclonaux anti-souris (anti-CD138, -B220, -CD19, -CD23, -CD93, -GL7, CD95, -IgG1, -IgG3, - IgD, -CD11b, -GR1, -CD3, -CD5, -CD43, -CD44, -IA-IE, -CD86, -CD69) couplés à un fluorochrome (phyco-érythrine (PE), PE-CF594 (PE-CF), Peridinin chlorophyll protein-Cyanine 5.5 (PerCP/Cy5.5), PE-Cy7, ou APC) (*BD Biosciences*), et d'anti-IgM biotinylée (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.*).

De la streptavidine couplée à l'Alexa Fluor700 était utilisée comme Ac secondaire.

Les différents Ac avaient été préalablement testés à différentes dilutions et la concentration optimale pour chaque Ac validée sur des échantillons tests dans les mêmes conditions.

Après 15 min d'incubation à 4°C à l'obscurité, la plaque était centrifugée pendant 5 min à 1500 rpm, puis le culot cellulaire lavé avec 150 μ L de PBE. Les cellules étaient ensuite reprises dans 150 μ L de PBE dans déposés en microtubes (*Micronics*) dans lesquels étaient ajoutés 25 μ L/tube de DAPI dilué au 1/2000^e dans du PBE, pour l'étude de la viabilité cellulaire. L'expression de la GFP et des différents marqueurs membranaires a été analysée sur le cytomètre en flux Gallios (*BD Bioscience*) et l'analyse des données faite grâce au logiciel Kaluza version 1.5a (*BD Bioscience*).

(1) EVALUATION DE L'APOPTOSE MEDULLAIRE

L'analyse de l'apoptose spontanée des sous-populations lymphocytaires B médullaires a été effectuée par marquages avec l'Ac monoclonal anti-souris anti-annexineV PE (*BD Bioscience*) et au DAPI, selon le même principe que les marquages membranaires, à la différence que l'ensemble de l'expérimentation (reprise des cellules, marquages avec les Ac couplés au fluorochromes et au DAPI, et lavages) a été réalisée dans du tampon spécifique (NaCl 140 mM, 5 mM CaCl₂, Hepes/NaOH 10 mM, pH 7,4) jusqu'au passage au cytomètre, et au maximum dans l'heure suivant le marquage pour éviter un excès de mort cellulaire induite par le tampon spécifique.

(2) VISUALISATION DE L'EXPRESSION DE ZAP-70 PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Après lyse des GR et recomptage, les splénocytes totaux étaient lavés à deux reprises dans du PBSX1 puis repris en tubes 12X75 mm (*BD Falcon*) dans ce même tampon à raison de $1 \cdot 10^6$ cell/mL puis le marquage de viabilité par Fixable Viability Dye eFluor 780 (*eBioscience*) était réalisé selon les recommandations du fabricant.

Les cellules étaient ensuite lavées 2 fois dans du PBE puis reprises dans ce même tampon à raison de $1 \cdot 10^6$ cell/50 μ L, puis marquées par les Ac monoclonaux anti-souris couplés aux fluorochromes suivants : anti-B220 PE-CF594, -CD3 R-Phycoerythrin Cyanin 7 (PC7) (*BD Bioscience*) et anti-IgM AF700 (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.*) et incubées 15 min à 4°C à l'obscurité.

Après un lavage au PBE, un Ac secondaire streptavidine-APC était ajouté aux cellules marquées et incubé 15 min à 4°C à l'obscurité, puis les cellules étaient à nouveau lavées dans du PBE.

Le marquage intracellulaire de ZAP-70 était réalisé avec l'Ac monoclonal anti-ZAP-70-PE (clone 1E7.2) (*BD Bioscience*) suite à une incubation préalable avec 2 mL de Lysing solution/10⁶ cellules (*BD Bioscience*) pour la fixation et la perméabilisation, selon les recommandations du fabricant.

La positivité pour ZAP-70 a été définie par rapport au marquage des LT par le contrôle isotypique (IgG1-PE murin) (*BD Bioscience*) (0,5 % de LT ZAP-70⁺) et le pourcentage de LB ZAP-70 a été comparé entre les souris ZAP-70 KI et KI ZAP. Une comparaison des médianes d'intensité de fluorescence (MIF) de ZAP-70 a aussi été faite entre ces mêmes souris. Le cytomètre et le logiciel d'analyse étaient les mêmes que pour l'immunophénotypage.

(3) QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE ZAP-70 PAR RT-QPCR

(A) TRI DES LB GFP⁺ PAR FACS

Après lyse des GR et recomptage, les splénocytes totaux étaient repris dans du PBE à 10.10⁶/mL, puis marqués en tubes (*BD Falcon*) avec un mélange d'Ac anti-B220 PE-CF594 (*BD Biosciences*) et d'anti-IgM (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.*) durant 15 min à 4°C à l'obscurité.

Après un lavage au PBE, un Ac secondaire streptavidine-APC était ajouté aux cellules marquées et incubé 15 min à 4°C à l'obscurité, puis les cellules étaient à nouveau lavées dans du PBE et reprises dans ce tampon à 5.10⁶ cellules/100 µL.

Le tri cellulaire était effectué au sein de la plateforme de cytométrie à l'IGBMC (Illkirch) sur un FACS Aria (*BD Biosciences*) en séparant les cellules B220⁺IgM⁺ selon leur degré d'intensité d'expression de la GFP (GFP^{high} ou GFP^{low}) pour les souris ZAP-70 KI, et en gardant les cellules B220⁺IgM⁺ triées des souris KI ZAP (qui sont GFP⁻) comme contrôle. Ces cellules triées étaient ensuite lavées au PBSX1, et congelées en culots secs de 1.10⁶ à 8.10⁶ cellules à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN.

(B) EXTRACTION D'ARN

L'extraction des ARN à partir des culots secs stockés à -80°C a été réalisée avec le RNeasy Mini kit (*Qiagen*) selon les recommandations du fabricant, en incluant l'étape d'incubation à la DNase I pour éliminer l'ADN génomique. La quantité et la pureté des ARN extraits ont été ensuite analysées à l'aide du NanoDrop2000c (*Thermo Scientific*).

(C) AMPLIFICATION PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Les ARN extraits étaient immédiatement utilisés pour la synthèse des ADNc correspondants, avec le kit High-Capacity ADNc Reverse Transcription (*Applied Biosystems*). Un volume de 10 µL de mix, contenant 2 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µL de 10X RT Random primer, 1 µL de Multicribe Rtase et 4,2 µL d'eau stérile, était déposé dans des barrettes à PCR (*Sarstedt*), auquel étaient ajoutés 10 µL d'ARN extrait (concentration ≤ 200 ng/µL), pour un Vf de 20 µL. Après amplification (25°C 10 min, 37°C 120 min et 85°C 5 min), l'ADNc était immédiatement utilisé pour la RT-qPCR en utilisant la technologie Taqman (*ThermoFischer*).

La réaction d'amplification était réalisée dans des plaques 96 puits (*Applied Biosystems*) où étaient déposés par puits : 6 µL de mix contenant 5 µL de Taqman Master mix (*Applied Biosystems*), 0,25 µL de sonde spécifique de *Zap-70* (réf. n°Hs 00896347_m1) ou des gènes de ménage *Hprt1* (réf. n°Mm01318743_m1) ou *Gapdh* (réf. n°NM_001289726.1) (*Applied Biosystems*), et 0,75 µL d'eau stérile, auquel étaient ajoutés 4 µL d'ADNc à 2,5 ng/µL, pour un Vf de 10 µL. Chaque échantillon était amplifié en triplicat dans l'appareil StepOnePlus (*Applied Biosystems*) selon le programme suivant : 50°C 2 min puis 40 cycles à 95°C 5 sec et 60°C 1 min. Les taux d'expression d'ARNm de ZAP-70 ont été calculés à l'aide du logiciel StepOnePlus V2.1 (*Applied Biosystems*) en utilisant la méthode comparative des seuils de cycle ($\Delta\Delta Ct$) et normalisée sur la moyenne des gènes de ménages *Hprt1* et *Gapdh*. Les expressions de ZAP-70 dans les LB GFP^{high} et GFP^{low} des souris ZAP-70 KI ont été comparées entre elles et à celle des LB des souris KI ZAP.

4. STIMULATIONS *IN VITRO*

A) TRI DES LB CD43- SPLENIQUES

Après lyse des GR et recomptage, les splénocytes totaux étaient triés à l'aide d'Ac anti-CD43 couplés à des microbilles magnétiques (CD43 (Ly-48) microbeads mouse) (*Miley Biotec*). Ceci permettait d'isoler les LB immatures (IgM⁺IgD⁻) et matures (IgM⁺IgD⁺) non activés qui sont CD43⁻ de l'ensemble des autres populations leucocytaires qui sont quant à elles CD43⁺.

Brièvement, après lyse des érythrocytes, les splénocytes totaux étaient incubés 15 min à 4°C avec les microbilles à raison de 10 µL/ 90 µL de PBE pour 10⁷ cellules. Après un lavage au PBE, les cellules étaient reprises dans 500 µL de PBE, déposées sur une colonne MACS Large Separation (LS) fixée à un aimant (*Miley Biotec*) et éluées dans du PBE selon les recommandations du fabricant.

Les cellules CD43⁺ marquées par l'anticorps (LT, monocytes, granulocytes, NK, LB1) étaient retenues dans la colonne grâce à l'aimant. Les cellules non marquées CD43⁻ (LB) éluées ont ensuite été lavées dans du PBE et recomptées sur cellule de Neubauer comme précédemment.

La pureté du tri était vérifiée immédiatement par cytométrie en flux selon le même principe que précédemment à l'aide d'un marquage avec les Ac anti-B220 PE-CF594 et anti-CD3 PC7 murins (*BD Pharmingen*) et du DAPI dilué au 1/2000^e. La pureté était considérée comme acceptable si obtention d'au moins 95 % de LB vivants (B220⁺CD3⁻DAPI⁻) sur l'ensemble des cellules analysées.

B) MILIEUX DE STIMULATION

Les LB CD43⁻ triés étaient repris à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/mL dans un milieu de culture composé de RPMI 1640 avec ultraglutamine (*Lonza*), de SVF décomplémenté 10 %, de β -mercapto-éthanol 50 μ M (*Gibco*), d'Hepès Buffer 10 mM (*Lonza*), de pyruvate de sodium 1 mM (*Lonza*), et de pénicilline/streptomycine (respectivement 100 U/mL et 100 μ g/mL) (*Lonza*). Les cellules étaient ensuite réparties dans des plaques 24 puits (*Falcon*) à une concentration finale/puits de $1 \cdot 10^6$ cellules/mL, puis incubées avec différentes combinaisons de stimuli : Ac anti-IgM (5 μ g/mL, Ac F(ab')₂ de chèvre anti-IgM murine, *Jackson Immunoresearch*) ; agoniste du CD40 (0,25 μ g/mL, *BD Pharmingen*) ; IL-4 (5 ng/mL, *Sigma*) ; IL-21 (10 ng/mL, *Invitrogen*) ; LPS (10 μ g/mL, produit par *Salmonella typhosa*, *Sigma*) ; agoniste du TLR9 CpG ADN (5 μ g/mL, ODN2395, *Invivogen*) ; ou du milieu de culture seul.

Pour l'étude de la prolifération cellulaire, de la Bromodésoxyuridine (BrdU) à 10 μ M (*BD Biosciences*) était ajoutée directement dans les puits d'intérêt en complément des différentes combinaisons de stimuli.

Les cellules étaient ensuite incubées à 37°C (CO₂ 5 %) pour une durée variable de 48h, 72h ou 96h selon les expériences.

C) ANALYSES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Après incubation, les surnageants des stimulations de 72h et de 96h étaient récupérés et conservés à -20°C jusqu'à analyse ELISA pour leurs compositions en Ig (cf. partie F.3.a).

Les culots cellulaires étaient lavés à deux reprises dans du PBE et repris dans ce même tampon à $1 \cdot 10^6$ cellules/100 μ L et déposés en plaques 96 puits (*Greiner*) pour les différents marquages membranaires et intracellulaires suivants.

(1) ANALYSE DES MARQUEURS D'ACTIVATION CELLULAIRE A 48H

Les marquages membranaires étaient réalisés avec différents mélanges d'Ac monoclonaux anti-souris (anti-B220, -CD44, -IA-IE, -CD86, -CD69) couplés à un fluorochrome (PE, PE-CF594, PE-Cy7 ou APC) (*BD Biosciences*). Le reste de la technique et l'analyse étaient identiques à celles décrites précédemment pour l'immunophénotypage (Cf. partie II.C.2).

(2) ANALYSE DE LA DIFFERENTIATION PLASMOCYTAIRE A 72H

Les culots cellulaires étaient lavés en plaque à deux reprises dans du PBSX1 puis incubés 30 min à 4°C à l'obscurité avec 100 µL de Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (*eBioscience*) dilué au 1/1000 dans du PBSX1. Après 2 lavages aux PBE, les cellules étaient marquées avec les Ac monoclonaux anti-souris couplés à un fluorochrome suivants : anti-B220 PE-CF594, -CD19 PE-Cy7, -CD138 APC (*BD Biosciences*) durant 15 min à 4°C à l'obscurité.

Les cellules étaient ensuite lavées au PBE puis le marquage intracellulaire avec 50 µL/puit d'Ac anti-IRF4 PE (*BD Biosciences*) était réalisé à l'aide du Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer set (*eBioscience*) selon les recommandations du fabricant. Les durées de fixation/perméabilisation et de marquage étaient chacun de 45 min à TA à l'obscurité.

(3) ANALYSE DES MARQUEURS DE PROLIFERATION CELLULAIRE A 90H

L'étude de la viabilité cellulaire et des marqueurs membranaires étaient les mêmes que décrit précédemment avec les fluorochromes suivants : anti-CD19 FITC et anti-B220 PE-CF594 (*BD Biosciences*).

Pour l'étude de la prolifération par BrdU, après un lavage au PBE, les cellules étaient fixées, perméabilisées, digérées à la DNase puis marquées par 50 μL d'Ac anti-BrdU dilué au 1/200^e, grâce au BrdU Flow Kit (*BD Biosciences*) selon les recommandations du fabricant.

Les analyses de l'expression des marqueurs membranaires, et des marqueurs intracellulaires IRF4 et BrdU ont été effectuées par cytométrie en flux de la même manière que pour l'immunophénotypage (Cf. partie II.C.2).

5. ETUDE DE LA SIGNALISATION DU BCR

A) ANALYSE DU FLUX CALCIQUE

Après tri des LB spléniques (Cf. partie II.D.1), les culots cellulaires étaient repris dans un milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, *Lonza*) à la concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

Cinquante microgrammes de sonde fluorescente Indo-1 (*Invitrogen*) étaient préalablement incubés durant 5 minutes à TA à l'obscurité avec du 25 μL de diméthylsulfoxyde (DMSO), 26 μL d'acide pluronic (*Invitrogen*) et 113 μL de SVF décomplémenté, puis 15 μL de ce mélange étaient ensuite incorporés aux culots cellulaires et incubés à 37°C durant 45 min. L'incubation était stoppée par ajout de milieu IMDM puis les cellules étaient reprises à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL dans le milieu IMDM.

Les cellules étaient préchauffées à 37 °C et analysées par cytomètre en flux (FACS Fortessa, *BD BioSciences*) durant 2 minutes pour mesurer la ligne de base (cellules non stimulées). Les cellules étaient ensuite stimulées par un Ac anti-IgM à 5 µg/mL (F(ab')² de chèvre anti-IgM de souris, *Jackson ImmunoResearch*).

La concentration relative de calcium libre intracellulaire a été mesurée par le ratio de fluorescence moyenne d'Indo-1 liée sur non liée (405/485 nm), sur les LB vivants ayant incorporé la sonde, à l'aide du logiciel Flow Jo version 7.6.5. La réponse calcique a été ensuite normalisée et exprimée par le ratio du pic maximum après stimulation sur la ligne de base (Grynkiewicz et al., 1985).

B) ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION DES PRINCIPALES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA SIGNALISATION DU BCR PAR WESTERN BLOT

Les LB triés spléniques étaient repris dans le milieu de culture détaillé précédemment (Cf. partie II.D.2) à 10⁷ cellules/mL, puis stimulés par Ac anti-IgM à 5 µg/mL (F(ab')² de chèvre anti-IgM de souris, *Jackson ImmunoResearch*) dans des microtubes 1,5 mL Eppendorf (*Sigma*), sur plaque chauffante à 37 °C pendant 1, 3, 5, 15 et 30 minutes. Une condition non stimulée (sans anticorps) a aussi été effectuée. La stimulation était stoppée par refroidissement à 4 °C, puis les cellules lavées à deux reprises dans du PBSX1.

Les LB étaient ensuite repris dans un tampon de lyse (TNE : Tris 50 mM pH 8, 1 % (v/v) NP-40 (Nonidet P40), EDTA 2 mM, pH 8) auquel était ajouté extemporanément 1 tablette de cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Roche*) et 1 % d'inhibiteurs de phosphatases (*Sigma-Aldrich*). Après 15 minutes d'incubation sur glace, les cellules étaient centrifugées 10 minutes à 14 000 rpm à 4°C et le surnageant (lysats protéiques) récupéré.

Les protéines étaient dosées par spectrophotométrie à 560 nm à l'aide du kit BCA (BSA 10 µg/mL et solutions A et B (50:1) (Pierce BCA Protein Assay Kit, *ThermoScientific*). Les protéines étaient ensuite diluées dans du bleu de dépôt 5X (Tris-HCl, 0,6 M, pH 6,8, glycérol 50 % (v/v), SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 170 mM,

Dithiothréitol (DTT) 50 mM, bleu de Bromophénol 0,01 g) et incubées 15 minutes à TA, puis 5 minutes à 105 °C.

Les échantillons et le marqueur de taille (PageRuler Prestained Protein Ladder, *ThermoScientific*) étaient déposés sur gel de polyacrylamide à 12 % (bis-Acrylamide 30 %, Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8 pour le gel de séparation, pH 6,8 pour le stacking), APS 10 %, TEMED 0,05 %) puis mis à migrer à 130 V pendant 1h 30 dans un tampon spécifique (Tris base 25 mM (*Sigma*), Glycine 192 mM (*Sigma*), SDS 0,1 %).

Les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane de polyfluorure de vinyldène (PVDF) à l'aide d'un dispositif Trans Blot Turbo Transfer System (*BioRad*) pendant 7 min à 1,3A/25V, suivi d'une étape de saturation durant 2h à TA (ou une nuit complète à 4°C) sous agitation constante dans une solution de blocage (lait en poudre 5 % ou BSA 2 % (*Euromedex*), Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM pH 8, NaCl 50 mM, Tween20 0,1 % (v/v)).

Après saturation, le tampon de blocage était remplacé par les solutions d'Ac primaires (*Cell signaling*) (Tableau 13) dilués dans le tampon de lait pendant ou la BSA 0,5 %, incubés une nuit à 4°C ou 2h à TA, sous agitation.

La membrane était ensuite lavée à 5 reprises pendant 5 minutes dans du tampon spécifique (Tris HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM pH 8, NaCl 50 mM), puis incubée durant 1h à TA avec un Ac secondaire monoclonal IgG de chèvre anti-souris couplé à l'HRP (Horseradish Peroxydase) (*GE Healthcare*) dilué au 1/10 000^e dans le tampon de lait (AKT, ERK et IκB) et un AC secondaire monoclonal IgG de lapin anti-souris couplé à l'HRP (*GE Healthcare*) dilué au 1/5 000^e dans le tampon de BSA 0,5 %. Après une nouvelle série de 5 lavages, la membrane était révélée à l'aide du kit ECL Plus (ECL Plus Western blotting Detection Reagents, *GE Healthcare*) puis exposée sur un film auto-radiographique développé en chambre noire.

Tableau 13. Ac primaires utilisés et dilutions respectives

Phospho-AKT	1/500 ^e dans le tampon de lait
Phospho-ERK	1/500 ^e dans le tampon de BSA 0,5 %
Phospho-IkB	1/2000 ^e dans le tampon de lait
Phospho-SYK	1/500 ^e dans le tampon de BSA 0,5 %
AKT	1/1000 ^e dans le tampon de lait
ERK	1/1000 ^e dans le tampon de lait
IkB	1/2000 ^e dans le tampon de lait
Actine-HRP	1/1000 ^e dans le tampon de lait

C) ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION DE ZAP-70 PAR IMMUNOPRECIPITATION

L'immunoprécipitation a été réalisée sur des LB spléniques de souris KI ZAP-Mb1 triés négativement (Cf. partie II.D.1) et stimulés par Ac anti-IgM (Cf. partie II.E.2).

Des LB spléniques triés de souris KI ZAP et des extraits protéiques de LB de souris ZAP-KI, auquel étaient ajoutées les billes, sans l'Ac anti-ZAP-70 immunoprécipitant, ont servis de contrôles négatifs. Les LT de souris KI ZAP triés magnétiquement (Pan T cell isolation kit, *Miley Biotec*) et stimulés par anti-CD3 (1 µg/mL) et anti-CD28 (5 µg/mL) (BD biosciences) durant 3 minutes ont servis de contrôle positif.

Les LB étaient repris dans un tampon de lyse (Tris HCl 50 mM pH 8, KCl 50 mM, NP-40 1 % (v/v), cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Roche*), inhibiteurs de phosphatases 1 % (*Sigma Aldrich*)) à la concentration de 10^7 cellules/mL. Après 30 min d'incubation sur glace, les cellules étaient centrifugées 10 minutes à 14 000 rpm à 4 °C et le surnageant récolté.

Les billes de sépharose (protein G Sepharose 4 fast flow, *GE Healthcare*) étaient lavées à trois reprises à l'aide d'une solution spécifique (Tris HCl 50 mM pH 8, KCl 50 mM, NP40 0,1 % (v/v), cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Roche*), 1 % d'inhibiteurs de phosphatases (*Sigma Aldrich*)) et diluées à 50 % dans cette solution.

Les lysats protéiques étaient préalablement incubés avec 0,2 µL de sérum de lapin et 50 µL de solution de billes, durant 30 minutes à 4 °C sous agitation faible, puis centrifugés à 3 000 rpm à 4°C pendant 1 min.

Le surnageant était prélevé et 4 µL d'anticorps de lapin anti-ZAP-70 murin au 1/50^e (*Cell signaling*) étaient ajoutés et incubés à 4°C durant toute une nuit. Cinquante microlitres de solution de billes étaient ensuite ajoutés et incubés durant 1 à 3h à 4°C, suivi de 5 lavages, puis du laemmlli 2X (*Biorad*) était ajouté à chaque échantillon.

La suite de la technique était identique au Western-Blot précédent (Cf. partie II.E.2) avec l'utilisation d'Ac anti-tyrosines phosphorylées (*Cell signaling*) dilués au 1/2000e dans un tampon de BSA, et d'Ac monoclonal IgG de chèvre anti-souris couplé à l'HRP dilué au 1/20 000e (*Amersham GE HealThcare*) comme Ac primaire et secondaire respectivement.

La membrane était ensuite strippée (restore Western blot stripping buffer, *Thermoscientific*) et révélée à l'aide d'un Ac anti-ZAP-70 (*Cell signaling*) dilué au 1/2000e dans un tampon de lait.

6. ETUDE DE LA PRODUCTION D'AC IN VIVO ET IN VITRO

A) RECUPERATION DU SERUM ET DES SURNAGEANT DE CULTURE

Les sérums éteint récupérés à partir de sang total prélevé sur veine mandibulaire après une double centrifugation à 5 000 rpm puis 8 000 rpm durant 10 min. Après incubation, les échantillons stimulés à 72h et 96h étaient centrifugés à 1500 rpm durant 5 min, puis les surnageant récupérés. Ces sérums et surnageants étaient conservés à -20°C jusqu'à analyse pour leurs compositions en Ig par ELISA.

B) IMMUNISATIONS PAR OVALBUMINE OU NP-LPS

Des souris âgées de 6 mois ont été immunisées par voie intra-péritonéale (IP) aux jours 0, 10 et 20 avec 100 µg d'ovalbumine (OVA) (*Sigma*), un Ag T-dépendant. La première injection d'OVA à J0 était injectée en présence de l'adjuvant complet de Freund (*Sigma*), la seconde à J10, en présence de l'adjuvant incomplet de Freund (*Sigma*) et la troisième à J20 dans du PBSX1 stérile (Figure 28. A).

D'autre souris âgées du même âge ont été immunisées par NP-LPS, un Ag T-indépendant, le qui associe l'haptène NP (4-hydroxy-3-nitrophenyl-acetyl) conjugué au LPS. De la même façon, ces souris ont reçu par voie IP 100 µg de NP-LPS (*Biosearch technologies*), dilués dans du PBSX1 stérile, aux jours 0, 10 et 20 (Figure 28. B).

Afin d'évaluer la prolifération cellulaire, de la BrdU (*Sigma*), était administrée par voie IP à J20 (1 mg en dose unique) et par voie orale, diluée dans de l'eau de boisson (0,8 mg/L), de J20 à J30.

Du sérum était récupéré à J0, J7, J10 et J30 pour analyses de leur composition en IgG et IgM totales, et spécifiques anti-Ovalbumine ou anti-NP

A J30, les souris étaient sacrifiées et les rates récupérées pour analyse par cytométrie en flux de différents marqueurs membranaires (phénotype et activation) et intracytoplasmiques (BrdU). Les techniques étaient les mêmes que celles décrites précédemment.

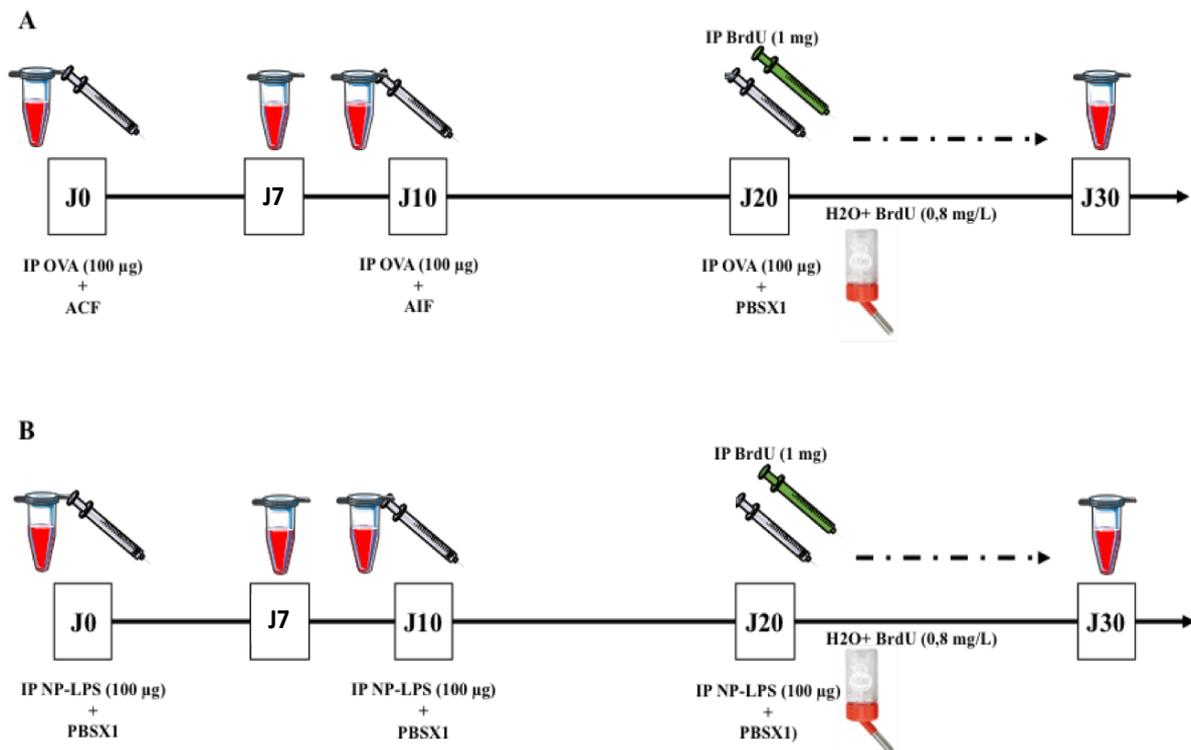


Figure 28. Résumé des schémas d'immunisations expérimentales à l'ovalbumine (A) ou au NP-LPS (B).

IP, injection intrapéritonéale; OVA, ovalbumine; ACF, adjuvant complet de Freund; AIF, adjuvant incomplet de Freund; PBS, phosphate buffered saline; BrdU, Bromodésoxyuridine; NP, 4-hydroxy-3-nitrophenyl-acetyl; LPS : lipopolysaccharide

C) DOSAGE DES IG PAR ELISA

(1) IGG ET IGM TOTALES

Le coating des plaques ELISA était tout d'abord réalisé avec 50 µL d'Ac anti-IgG ou anti-IgM murines (F(ab')₂ de chèvre anti-IgG ou anti-IgM de souris de souris (*Jackson immunoresearch*) diluées respectivement à 2,5 µg/mL et 5 µg/mL dans du tampon carbonate/bicarbonate (TCB) (0.1 M pH 9.5 (Na₂CO₃, NaHCO₃, NaN₃), avec une incubation d'1h à 37°C. Après 3 lavages au PBSX1, les puits étaient saturés avec 100 µL de PBS-BSA 1 % pendant 45 min à 37°C.

Des dilutions croissantes des échantillons à tester, et d'IgG (*Jackson immunoresearch*) ou d'IgM (*Sigma*) murines de concentrations connues, servant de courbes étalons, étaient réalisées en tampon PBS-Tween20 0.1 %-gélatine 1 % (PBS-TG). Ces dilutions étaient ensuite déposées en dupliqua dans les plaques ELISA à raison de 50 µL/puits et l'ensemble incubé 2 h à 37°C. Après 4 lavages au PBS-Tween20 0.1% (PBS-T), 50 µL d'Ac secondaire de chèvre anti-IgG ou anti-IgM murin couplé à la peroxydase (*Jackson immunoresearch*), dilué au 1/10 000e dans du PBS-T, étaient ajoutés et incubés 1h à 37°C.

Après 4 nouveaux lavages au PBS-T, les plaques étaient révélées par ajout de 50 µL/puit d'orthophénylènediamine (OPD) (*Sigma*), qui est un des substrats de la peroxydase, et incubation 20 min à TA à l'obscurité. La réaction enzymatique était ensuite arrêtée par ajout de 50 µL de solution de H₂SO₄-2N-Sulfite de Na 0,5 %. L'absorbance a été mesurée par lecture des densités optiques (DO) à 492 nm par le lecteur Multiskan FC version 1.00.96 (*Thermoscientific*).

Les concentrations en IgG et IgM totales des échantillons ont été ensuite calculés à l'aide du logiciel SkanIt Software 3.1.0.4 RE for Multiskan FC, à partir des courbes étalons en phase linéaire, par régression logistique linéaire 4 paramètres. Un seuil de coefficient de détermination R² ≥ 0,98 était retenu comme acceptable pour l'interprétation des données.

(2) IGG ET IGM SPECIFIQUES ANTI-OVA OU ANTI-NP

Les coatings étaient réalisés respectivement avec 50 µL d'OVA à 50 µg/mL (*Sigma*) ou de NP-BSA (ratio 1-9) à 5 µg/mL (*Biosearch technologies*), dilués dans du TCB, et incubés 1h30 à 37°C. Les étapes suivantes de saturation, dépôts des échantillons et de révélation étaient réalisées de la même façon que précédemment pour la détection des IgG et IgM totales.

Du fait de l'indisponibilité de courbe étalon, les résultats étaient exprimés en titres (inverse de la dilution nécessaire pour atteindre une DO choisie).

(3) AUTO-REACTIVITES IGG ET IGM

(A) ANTI-ADN

Le coating était réalisé avec 50 µL/puit de Calf thymus DNA (*Sigma*) dilué à 100 ng/mL dans du tampon HCl autoclavé pH 7,5 et incubés 1h à 37°C. Après 3 lavages au PBSX1, l'ADN était digéré par 50 µL/puits de S1 nucléase (*Promega*) à 0,001 U/µl durant 1h à 37°C. Après 3 lavages au PBSX1, les puits étaient saturés avec 100 µL de PBS-BSA 1 % (*Euromedex*) pendant 45 min à 37°C. Des dilutions croissantes des sérums des souris à tester étaient réalisées en tampon PBS-Tween20 0,1 %-gélatine 1 % (PBS-TG).

De la même manière, des dilutions de sérums de souris MRL^{lpr/lpr} âgées de 16 semaines et présentant une protéinurie significative (≥ 3 croix à la bandelette) (Fu et al., 2017) et de souris C57BL/6N âgées de 8 semaines étaient utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif. Ces dilutions étaient ensuite déposées en duplicata dans les plaques ELISA à raison de 50 µL/puits et l'ensemble incubé une nuit entière à 37°C. Les étapes suivantes de lavages, et de révélation étaient réalisées de la même façon que précédemment pour la détection des IgG et IgM totales (Cf. partie II.3.3.a) et les résultats exprimés en titres (Cf. partie II.E.3.b)).

(B) FACTEUR RHUMATOÏDE

Le coating était réalisé avec 50 µL/puit d'Ac anti-IgG murine (F(ab')₂ de chèvre anti-IgG, *Jackson immunoresearch*) dilué à 50 µg/mL dans du TCB et incubés 1h à 37°C. A l'exception de l'étape de digestion à la nucléase S1, l'ensemble des étapes suivantes et l'expression des résultats étaient réalisées de la même façon que pour la détection des IgM anti-ADNdb.

D) RECHERCHE D'AUTOACTIVITÉ(S) SUR PANEL ANTIGENIQUE

Des échantillons de sérum (10 µL) ont été envoyés sur carboglace pour test simultané des autoréactivités sur puce contenant un panel de 95 auto-Ag (Autoantigen Microarray Panel I, *UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas*).

Brièvement, les échantillons ont été préalablement traités par de la DNase I au 1/50e puis incubés avec les auto-Ag sur la puce.

La révélation a été effectuée par anti-IgG Cy3 et anti-IgM cy5, puis la lecture des densités optiques faite à l'aide du scanner GenePix® 4400A Microarray. Les images ont été analysées par le logiciel GenePix version 7.0.

Après soustraction du bruit de fond, l'intensité de fluorescence moyenne de chaque auto-Ag a été normalisée sur les contrôles internes (IgG or IgM).

E) ELISPOTS OVALBUMINE ET NP

Des plaques avec membrane en nitrocellulose (Milipore MAHA S4510, *Merck*) étaient réhydratées avec 15 μL /puits d'éthanol à 35 % puis immédiatement lavées à plusieurs reprises avec de l'eau stérile. Ces plaques étaient ensuite incubées une nuit entière à 37°C avec 70 μL /puits d'OVA (*Sigma*), ou de NP-BSA (*Biosearch technologies*) ou d'Ac anti-IgG ou IgM murines (F(ab')₂ de chèvre anti-IgG ou anti-IgM de souris, *Jackson immunoresearch*), diluées respectivement à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du tampon de coating (solution A (NaHCO₃ : 8,4 g/100 mL d'eau milliQ) et solution B (Na₂CO₃ : 10,6 g/100 mL d'eau milliQ) en proportion 2,5:1, l'ensemble dilué dans de l'eau MilliQ pour Vf = (solution A + solution B)²).

Après 3 lavages au PBSX1, les puits étaient ensuite saturés par 200 μL de PBS-BSA 1 % (Euromedex) durant 2h à 37°C, puis la solution de saturation remplacée par 100 μL de milieu de culture (RPMI 1640 avec ultraglutamine (*Lonza*) + SVF décomplémenté 10 % + β -mercapto-éthanol 50 μM (*Gibco*) + Hepès Buffer 10 mM (*Lonza*) + pyruvate de sodium 1 mM (*Lonza*) + pénicilline/streptomycine (respectivement 100 U/mL et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (*Lonza*)), et les plaques étaient à nouveau incubées 1h à 37°C.

Les splénocytes totaux issus des souris immunisées par OVA ou NP-LPS étaient repris, après lyse des GR, dans du milieu de culture à 5.10⁶ et 1.10⁶ cellules/mL, et 100 μL de ces différentes concentrations étaient ajoutés aux 100 μL de milieu de culture déjà présents dans les puits des plaques Milipore, puits incubés 14h à 37°C.

Les plaques étaient ensuite lavées 4 fois au TBS-0,25 % Tween20 (Tris buffered saline : 50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl), puis 3 fois au PBSX1 et 1 fois à l'eau désionisée, et 70 μL /puits d'Ac secondaire anti-IgG ou anti-IgM biotinylées (Biot SP conjugated Affinity pure Goat anti-mouse IgG (H+L) ou anti-mouse IgM (Fab'₂), *Jackson Immunoresearch*) dilués au 1/20 000^e dans du PBS-BSA 1 %, étaient ajoutés et l'ensemble incubé 2h à TA à l'obscurité.

Après 4 lavages au TBS-0,25 % Tween20 et 3 lavages au TBSX1, 70 µL de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (Strepta-AP, *Invitrogen*), diluée au 1/25 000^e dans du PBS-BSA 1 % (*Euromedex*), étaient ajoutés dans chaque puit, suivi d'une incubation de 30 min à 37°C.

Les plaques étaient ensuite à nouveau lavées comme à l'étape précédente, l'underdrain enlevé, puis révélées par l'ajout de 70 µL/puits de BCI/NBT (*Vector Laboratories*) préparé dans du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, selon les recommandations du fabricant, et incubées à l'obscurité à TA.

Dès la visualisation de points violets individualisables (entre 15-30 min selon les types d'Ig détectées), les plaques étaient alors lavées abondamment à l'eau courante puis laissées plusieurs heures dans un bain du même type d'eau. Les plaques étaient ensuite laissées à TA à l'obscurité jusqu'à séchage complet avant analyse. Cette dernière a été effectuée en à l'aide du logiciel UDWT Wavelet Detector qui permettait la détection et le comptage des différents points (ELISPOTs) dépassant un seuil d'intensité, basé sur le contrôle négatif correspondant pour chaque type d'Ig et de dilution testée.

7. RECHERCHE DE LYMPHOPROLIFERATION, DE CYTOPENIES ET DE NEPHROPATHIE

A) NUMERATIONS FORMULES SANGUINES (NFS)

Des NFS étaient réalisées toutes les 8 semaines chez les mêmes souris de M2 à M20, à partir de 200 µL de sang total prélevé sur veine mandibulaire sous anesthésie générale courte à l'isoflurane.

Ce sang était déposé dans des microtubes 1,5 mL Eppendorf (*Sigma*) contenant 60 µL de solution anticoagulante Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA)

à 2 % (30 µL/100 µL de sang total). L'ensemble était homogénéisé et acheminé le jour même pour analyse à l'IGBMC (Illkirch).

Les taux de leucocytes totaux, de plaquettes et d'hémoglobine étaient exprimés en valeurs absolues, et les sous fractions leucocytaires (lymphocytes totaux, polynucléaires, basophiles et éosinophiles), étaient exprimés en valeurs absolues et en pourcentages des leucocytes totaux par rapport aux valeurs de références pour ce type de souris.

B) PROTEINURIE

Chez ces même souris, une bandelette urinaire (Multistix®5, Bayer) était réalisée toutes les 8 semaines de M2 à M20 à la recherche de l'apparition d'une protéinurie selon les recommandations du fabricant. La cotation visuelle en croix était convertie en chiffres de la façon suivante : - : 0 ; traces : 1 ; + : 2 ; ++ : 3 ; +++ : 4 ; ++++ : 5. Une protéinurie ≥ 3 était retenue comme significative (par comparaison aux modèles murins lupiques où une protéinurie ≥ 3 est corrélée à une glomérulopathie lupique à l'anatomopathologie) (Fu et al., 2017).

C) ANATOMOPATHOLOGIES RENALES ET GANGLIONNAIRES

Des ganglions (axillaires et inguinaux) et la rates de souris âgées de 12, 14 et 20 mois ont été prélevés puis immédiatement plongés dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature, ThermoFischer Scientific) et traités par congélation rapide en isopentane refroidi à -80°C et stockés à -80°C jusqu'à analyse ultérieure.

Des coupes de 7 µM de ces organes ont été secondairement réalisées sur cryostat (Leica Biosystems), déposées sur lames puis fixées à l'acétone durant 20 min avant marquages à l'hématoxyline et à l'éosine afin de rechercher une éventuelle désorganisation architecturale et/ou des infiltrats lymphoïdes atypiques.

Brièvement, après réhydratation des lames/coupes au PBSX1, celles-ci étaient incubées dans du paraformaldéhyde (*Sigma*) 4 % durant 1h à TA, puis lavées dans un bain d'eau MilliQ, et incubées 3 min dans un bain d'hématoxyline filtrée, puis à nouveau lavées 3 fois 2 min dans de l'eau MilliQ, et incubées dans un bain d'éosine durant 1 min. Les lames étaient ensuite rincées dans l'eau MilliQ pour enlever le surplus d'éosine puis déshydratées par des bains d'éthanol de concentrations croissantes (95 % durant 1 min, puis pur durant 1 min) puis dans un bain final de toluène durant 10 min. Après séchage, les lamelles étaient fixées à l'aide du milieu de montage hydrophobe (Eukitt, *Sigma*) puis l'ensemble stocké à TA à l'obscurité jusqu'à analyse microscopique.

C. ANALYSES STATISTIQUES

Les variables quantitatives ont été décrites à l'aide de la moyenne et de l'erreur à la moyenne (SEM : standard error of the mean).

La significativité statistique des différences a été déterminée par le test de Mann-Whitney non paramétrique et non apparié de manière bilatérale, utilisant le logiciel GraphPad Prism® v.7.

Le seuil de signification statistique (p) avec intervalle de confiance à 95 % a été fixé à 0,05. Les différences significatives ont été indiquées de manière suivante : * pour $p \leq 0,05$, ** pour $p \leq 0,01$ et *** pour $p \leq 0,001$.

Les figures ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® v.7..

IV.RESULTATS

A. PARTIE HUMAINE DU PROJET

1. ETUDE DU REPERTOIRE DU BCR DES LB NON TUMORAUX ZAP-70⁺

Le but était d'apporter des premiers éléments de réponse aux deux questions suivantes :

- Les LB non tumoraux (CD5⁻) ZAP-70⁺ présentent-ils une stéréotypie de leur BCR comme cela est observé dans 20 % des LB LLC ?
- Les LB non tumoraux (CD5⁻) ZAP-70⁺ présentent -ils une filiation moléculaire avec le clone tumoral correspondant ?

Le cas échéant, ceci pourrait laisser suggérer que ces LB CD5⁻ZAP-70⁺ pourrait être des cellules précurseurs des LB LLC.

Pour tenter de répondre à ces questions, la stratégie a consisté en l'amplification des régions variables des chaînes lourdes et légères du BCR des LB CD5⁻ZAP-70⁺ et du clone tumoral correspondant pour chaque patient, puis à leur séquençage selon les techniques détaillées précédemment.

A) A PARTIR DE POOLS LYMPHOCYTAIRES B

Cette partie détaille les différentes approches et techniques initiales tentées successivement pour l'amplification des régions géniques d'intérêt. Hélas, aucune de ces approches n'a permis de réels résultats concluants. Ainsi, la technique utilisée et les résultats interprétables seront détaillés à part dans la partie suivante (B).

(1) TESTS INITIAUX

L'approche initiale a consisté au tri en tubes par cytométrie en flux des LB CD5⁻ZAP-70⁺ et CD5⁺ZAP-70⁺ selon la stratégie détaillée en figure 28. L'expression membranaire de CD5 pouvant être un continuum dans la LLC, seules les cellules respectivement CD5⁻ ou CD5^{High} ont été sélectionnées, de même que celles situées aux extrémités opposées du seuil correspondant au contrôle isotypique de ZAP-70, de sorte à limiter le risque de contamination du pool de LB non tumoraux par d'éventuels LB tumoraux CD5^{Low} et/ou ZAP-70^{Low}, et inversement (Figure 29).

Les LB CD5⁻ étaient, de manière attendue dans la LLC, très minoritaires en nombre comparativement aux LB tumoraux CD5⁺, mais individualisables et $> 10^4$ après tri pour chaque patient.

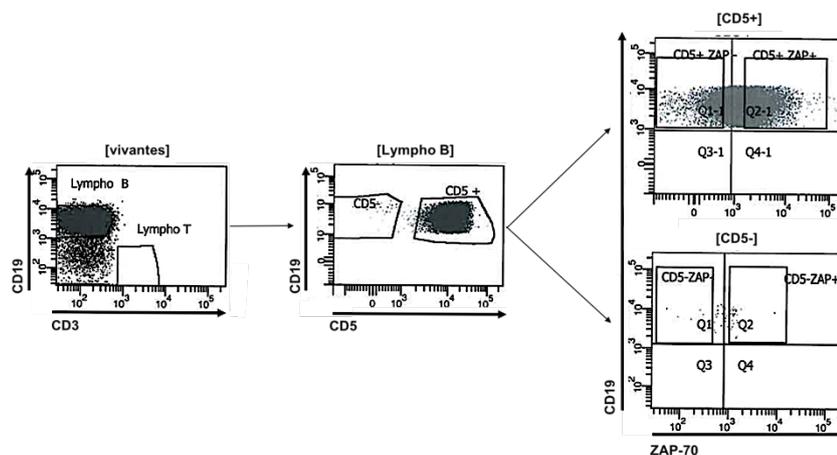


Figure 29. Stratégie initiale de tri par cytométrie en flux des LB ZAP-70⁺ pour l'étude du répertoire du BCR à partir de PBMC congelés de patients atteints de LLC (tri en pools cellulaires en tubes) LB non tumoraux : CD19⁺CD5⁻ZAP-70⁺ ; LB tumoraux : CD19⁺CD5⁺ZAP-70⁺

Malheureusement, malgré l'utilisation du kit spécifique pour cellules fixées et perméabilisées (RNeasy Mini, Qiagen) et des amorces spécifiques pour cellules fixées (Küppers et al., 1993), il n'a pas été possible d'amplifier de façon fiable et reproductible ces séquences géniques, la quasi-totalité des expériences résultant en une absence totale ou partielle de bandes après migration électrophorétique.

L'hypothèse d'un manque de sensibilité de la PCR en rapport avec le faible nombre de LB post-tri (notamment pour les LB non tumoraux) a été révoquée par de nombreux tests montrant aussi une absence totale d'amplification de ces séquences géniques sur différentes quantités de PBMC contrôles (jusqu'à 10^6) avec les mêmes conditions de fixation/perméabilisation.

L'amplification en parallèle de la β -actine sur les LB triés et les PBMC tests était par contre possible plaidant contre l'hypothèse d'une dégradation de l'ARN.

Enfin, l'amplification en parallèle des séquences sur les mêmes quantités de PBMC congelées dans les mêmes conditions mais non fixées/perméabilisées était par contre possible. (Figure 30).



Figure 30. Exemple d'amplification par RT-PCR des IGHV et IGLV κ et de la β -actine sur différentes quantités de PBMC fixées/perméabilisées ou non.

L'absence d'amplification sélective sur les cellules fixées/perméabilisées même à plus forte quantité et l'amplification conservée de la β -actine plaide pour un défaut de sensibilité de la PCR sur cellules fixées/perméabilisées.

pb : paires de bases

Au total, ceci suggérait fortement un **manque de sensibilité de la PCR sur cellules fixées/perméabilisées, très probablement en rapport avec la liaison du formaldéhyde aux acides nucléiques et ce, malgré l'utilisation de kit et d'amorces spécifiques.**

(2) MODIFICATIONS DE L'EXTRACTION D'ARN ET DES CONDITIONS DE PCR

Afin de tenter d'augmenter la sensibilité de la PCR, la TaqHF initiale a été modifiée pour de la HotStarTaq DNAPolymerase (*Qiagen*), permettant d'augmenter le nombre de cycle jusqu'à 100 totaux (50 pour la PCR1 et 50 pour la PCR2). Les résultats des différentes expérimentations étaient semblables avec une absence d'amplification des séquences IGHV et IGLV κ uniquement sur les cellules fixées/perméabilisées (résultats non montrés).

Le kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (*Ambion*) a ensuite été essayé en remplacement du RNeasy Mini kit (*Qiagen*) sur la base d'une publication de l'époque semblant indiquer un meilleur rendement d'extraction d'ARN sur cellules fixées/perméabilisées (Hrvatin et al., 2014). Malgré des résultats initiaux encourageants, le grand volume d'élution des ARN rendait nécessaire sa concentration par méthode SpeedVac avec comme conséquence la dégradation fréquente des ARN, notamment issus des cellules fixées/perméabilisées et un manque de reproductibilité de la technique (Figure 31).

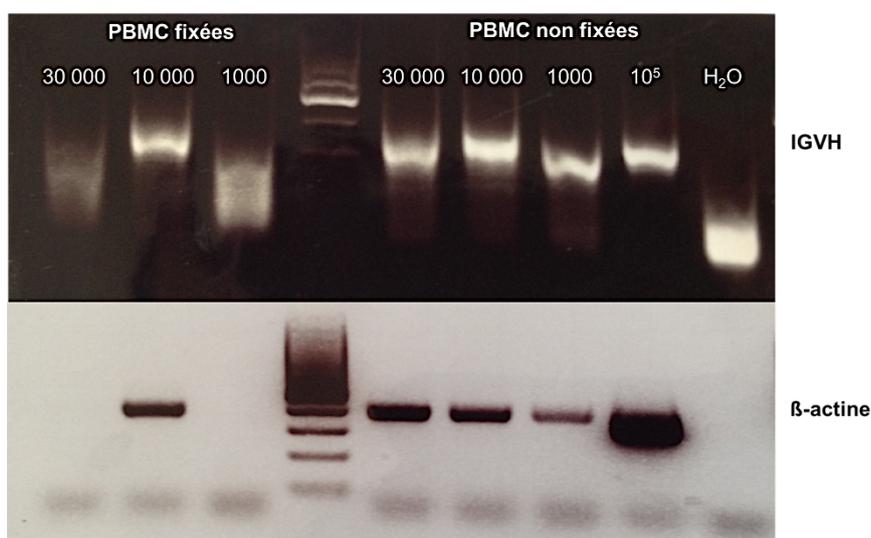


Figure 31. Exemple d'amplification par RT-PCR des IGHV et de la β -actine sur différentes quantités de PBMC fixées/perméabilisées ou non suite à l'extraction d'ARN par le kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (Ambion)

Il existait fréquemment une dégradation de l'ARN des cellules fixées/perméabilisées rendant non reproductible la technique.

Au final, devant les difficultés techniques majeures pour amplifier de façon fiable et reproductibles les séquences d'intérêt à partir des LB fixés/perméabilisés, liée d'une part à la fixation insuffisamment réversible du formaldéhyde sur les acides nucléiques et d'autre part à la dégradation probable de l'ARN avec le second kit d'extraction, nous avons décidé de modifier 2 axes techniques :

1. Diminuer la quantité de formaldéhyde en définissant une quantité minimale suffisante pour garder un marquage intracellulaire de ZAP-70 discriminant
2. Augmenter la sensibilité des PCR1 et 2 en utilisant, en lieu et place du protocole d'amplification et des amorces de Küppers et al, les amorces et le protocole publiés par Tillier et al, définis pour l'amplification des IGHV, IGLV κ et IGLV λ sur cellule unique (Tiller et al., 2008). Ces amorces, bien que non testées sur cellules fixées/perméabilisées, présentaient l'avantage d'être efficaces pour des quantités minimales d'acides nucléiques

(3) DIMINUTION DE LA QUANTITE DE FORMALDEHYDE

Pour cette mise au point, nous avons utilisé le kit PerFix-nc (*Beckman Coulter*), dont les quantités de réactifs sont optimisés pour la fixation/perméabilisation de $2,5 \cdot 10^5$ à $2 \cdot 10^6$ PBMC avec 2,5 μ L de formaldéhyde et 150 μ L de perméabilisant (procline).

Différentes quantités de formaldéhyde (2,5 μ L, 1 μ L et 0,5 μ L) avec la même quantité de procline (150 μ L) ont été testées en parallèle pour la fixation/perméabilisation de 10^6 PBMC issues de sujets sains contrôles de L'EFS de Strasbourg, afin de définir la quantité minimale suffisante de formaldéhyde pour le marquage intracellulaire de ZAP-70 dans les LT de ces cellules.

Une première étape a été de vérifier si les différents Ac monoclonaux couplés aux fluorochromes que nous utilisions étaient bien fonctionnels avec ce kit de fixation/perméabilisation et permettaient la discrimination des LB et des LT. Ainsi, pour toutes les quantités de formaldéhyde incluant 0,5 μ L/ 10^6 PBMC, il était bien observé 2

pics de fluorescence avec les Ac anti-CD3 APC, -CD19 PC7, et -CD5 ECD correspondant aux populations positives ou négatives, et un pic homogène ZAP-70⁺ correspondant aux LT. De plus, les MIF de ces différents fluorochromes restaient comparables selon les quantités de formaldéhyde utilisées (Figure 32.A).

La deuxième étape a consisté à vérifier le pouvoir discriminant du marquage intracellulaire de ZAP-70 pour la distinction des LB tumoraux ZAP-70⁺ et des LB non tumoraux, avec seulement 0,5 µL de formaldéhyde/10⁶ PBMC. Ainsi, il a été observé que plus de 96 % les LT (CD3⁺), utilisés comme contrôle positif, étaient ZAP-70⁺, en se basant sur le seuil du contrôle isotypique pour chaque expérience. De même, les LB tumoraux (CD19⁺CD5⁺) et non tumoraux (CD19⁺CD5⁻) étaient bien respectivement ZAP-70⁺ et ZAP-70⁻ (Figure 32.B). Les différences expériences étaient reproductibles.

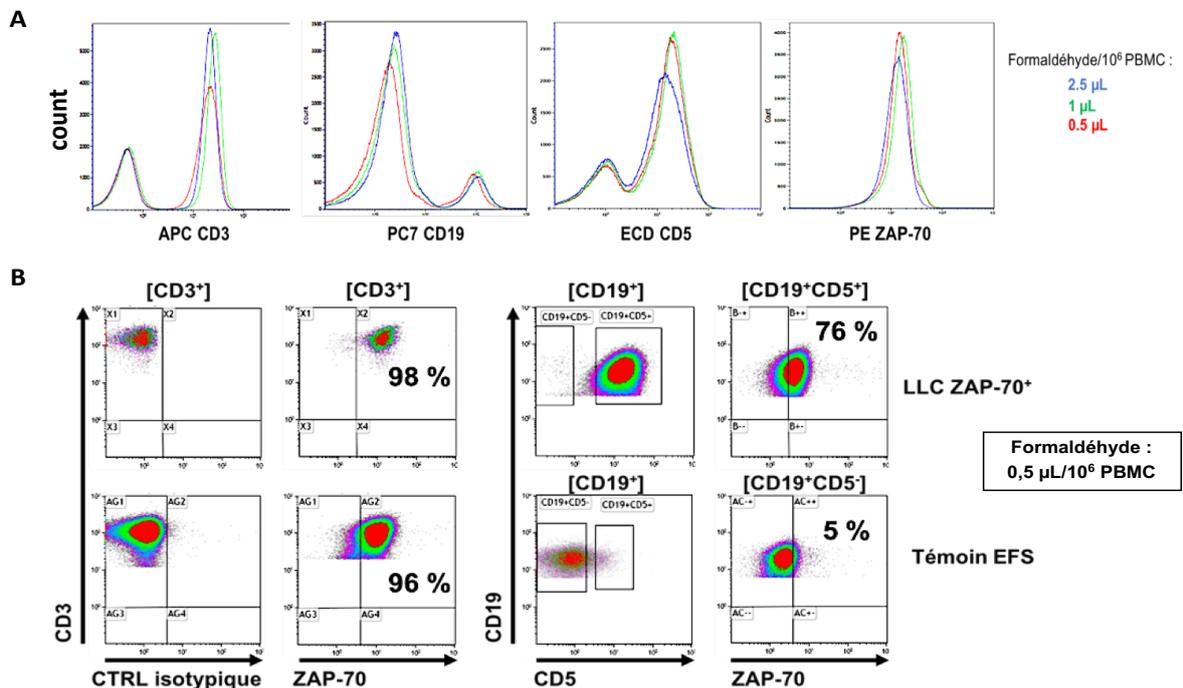


Figure 32. Tests visant à diminuer la quantité de formaldéhyde pour le marquage de ZAP-70 sur 10⁶ PBMC avec le kit PerFix-nc (Beckman Coulter).

A) MIF des différents Ac couplés aux fluorochromes selon les quantités de formaldéhyde
 B) Pourcentages de LT et LB ZAP-70 avec l'utilisation de 0,5 µL de formaldéhyde pour 10⁶ PBMC

Au total, il était donc possible, avec ce kit, de diviser par 4 la quantité de formaldéhyde (0,5 µL) tout en gardant un marquage pertinent et reproductible de ZAP-70. La quantité de perméabilisant (procline) n'a pas été modifiée (150 µL/10⁶ PBMC).

(4) FIXATION/PERMEABILISATION MODIFIEE ET AMORCES SUR CELLULE UNIQUE

Ainsi, la dernière étape a été de combiner le marquage de ZAP-70 avec le kit PerFix-nc modifié (0,5 µL de formaldéhyde pour 10⁶ PBMC contre 2,5 µL recommandations fabricant) et le protocole d'amplification sur cellules uniques avec les amorces spécifiques correspondantes (Tiller et al., 2008). Les techniques d'extraction d'ARN (kit FFPE, Qiagen) et de synthèse d'ADNc n'ont par contre pas été modifiées.

Malheureusement, malgré de nombreuses tentatives et de nouvelles diverses adaptations du protocole (protocole d'amplification, variations des quantités d'ADNc et/ou de produits de PCR1...), la technique manquait toujours de sensibilité et de reproductibilité, l'obtention des bandes d'intérêt de 275 pb n'étant pas toujours reproductible d'une expérience à l'autre (Figure 33.A). Ceci pouvait laisser suggérer une imputabilité persistante de la fixation du formaldéhyde.

De plus, le séquençage de quelques séquences tests IGHV, obtenues à partir de LB tumoraux et non tumoraux de 3 patients, a révélé la présence de clones au sein des LB CD5-ZAP-70⁺, clones qui étaient distincts du clone malin correspondant pour chaque patient. Il existait aussi de probables contaminations inter-échantillons et ce malgré les précautions prises lors du tri par cytométrie en flux et lors des expérimentations (Figure 33.B).

Au total, le manque de sensibilité et de reproductibilité des différentes techniques d'amplification testées et les contaminations probables entre les échantillons rendaient ces résultats préliminaires non interprétables.

Il a donc été décidé de changer complètement d'approche. Le principal frein technique étant une très probable inhibition totale ou partielle des PCR1/2 en rapport avec la liaison persistante du formaldéhyde sur les acides nucléiques, une solution était de **ne pas réaliser de marquage intracellulaire de ZAP-70 pour le tri des LB, et d'analyser le répertoire du BCR après tri sur cellules uniques et identification des LB ZAP-70⁺ par RT-PCR.**

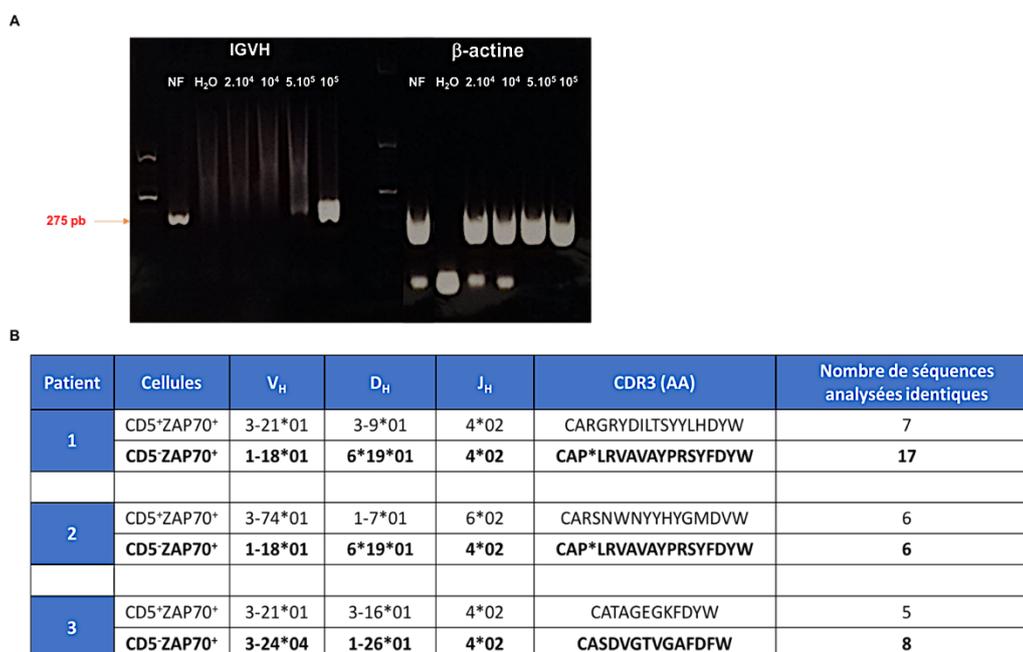


Figure 33. Résultats des PCR2 et du séquençage des IGHV sur pool lymphocytaires B, en utilisant le kit de fixation/perméabilisation PerFix-nc modifié et les amorces de Tiller et al.

A) Amplicons d'IGHV et de β -actine correspondante selon différentes quantités de LB triés et fixés/perméabilisés. Des LB non fixés/non perméabilisés (NF) ont été utilisés comme contrôle positif. L'amplification correcte de la β -actine et des LB NF illustrent respectivement l'intégrité de l'ADNc et le manque de sensibilité de la PCR2 IGHV sélectivement sur les cellules fixées/perméabilisées.

B) Nombre et détail des séquences des IGHV analysées du clone malin et de LB CD5⁺ZAP-70⁺ issus de 3 patients, montrant la présence : i) de codon STOP au sein des CDR3, ii) de clones au sein des LB CD5⁺ZAP-70⁺, iii) du même clone CD5⁺ZAP-70⁺ entre les patients 1 et 2 (contamination probable).

B) ANALYSES SUR LB TRIÉS EN CELLULE UNIQUE

Les étapes sont détaillées dans la partie matériels et méthode (cf. D.2) et comportent 3 étapes principales :

1. Tri des LB par cytométrie en flux à partir de PBMC décongelés permettant de sélectionner les LB non tumoraux (CD19⁺IgM⁻IgD⁻CD5⁻) et les LB tumoraux (CD19⁺CD5^{High}) (Figure 34). Le choix de sélectionner uniquement les LB IgM⁻IgD⁻ permettait, pour les LB non tumoraux, de ne garder que LB switchés correspondant aux cellules potentiellement à l'origine de la production des IgG autoréactives responsables des CAI. Ces cellules ont été triées en cellules uniques en plaque 96 puits puis immédiatement congelées à -80°C jusqu'à analyse

2. Dépistage des LB ZAP-70⁺ : réalisé directement sur cellule unique à l'aide d'une PCR spécifique adaptée aux cellules unique, développée et mise au point au sein de notre unité (thèse de Dana Perthus, manuscrit en préparation) (Cf. tableau 10).

3. Amplification des gènes IGHV, IGLV κ et IGLV λ : uniquement sur les cellules d'intérêts, correspondant aux LB ZAP-70⁺, à l'aide des amorces et du protocole de Tiller et al (Tiller et al., 2008).

Après vérification de l'obtention d'amplicons de tailles attendues par migration électrophorétique sur gel d'agarose, les amplicons ont ensuite été purifiés puis séquencés.

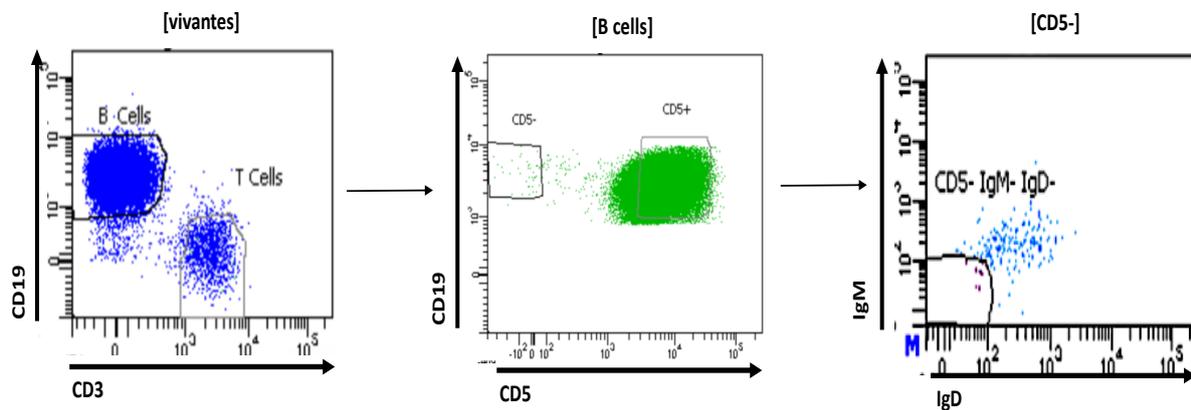


Figure 34. Stratégie finale de tri en cellule unique par cytométrie en flux des LB ZAP-70⁺ pour l'étude du répertoire du BCR

LB non tumoraux : CD19⁺IgD⁻CD5⁻; LB tumoraux : CD19⁺ IgD⁻CD5⁺

Le dépistage des LB ZAP-70⁺ était secondairement effectuée par RT-PCR sur cellule unique

Ainsi, à partir de 7 patients atteints de LLC ZAP-70⁺, les séquences du BCR de 24 LB non tumoraux ZAP-70⁺ au total ont pu être analysées. Parmi celles-ci, l'analyse à la fois de la chaîne lourde et de la chaîne légère correspondante a pu être obtenue pour 18 cellules, et l'analyse de la chaîne lourde ou légère seule pour 1 et 5 cellules respectivement.

L'analyse à la fois de la chaîne lourde et de la chaîne légère correspondante du clone malin (CD5⁺ZAP-70⁺) a pu être obtenue pour les 7 patients. Ainsi, les séquences des LB non tumoraux ont pu être comparées à celles du clone malin correspondant pour chaque patient. Les résultats détaillés sont proposés en figure 35.

Concernant les LB tumoraux (CD5⁺ZAP-70⁺), l'analyse des séquences montrait le **caractère non muté de l'IGHV pour les 7 patients**, avec une homologie > 98 % comparativement aux séquences germinales. Parmi les 7 clones étudiés, 6 présentaient une homologie de 100 %, et un seul de 98,3 %. Ceci **était en accord avec le fait connu et publié que l'expression de ZAP-70⁺ dans les LB LLC est associée au statut non muté des IGHV (Crespo et al., 2003)**.

D'autre part, il semblerait que la **CDR3 des LB LLC soit plus longue et globalement plus enrichie en AA chargés**, que celle des LB non tumoraux correspondant et ce, pour chaque patient analysé. Ceci est **cohérent avec l'hypothèse que les LB LLC sont issus de LB autoréactifs qui ont subi une édition de récepteur** (García-Muñoz et al., 2012), incluant le remplacement du segment VH, expliquant la CD3 plus longue et enrichie en AA chargés (Zhang et al., 2004).

Concernant les LB non tumoraux ZAP-70⁺, il n'existait pas de contaminations, ni inter-échantillons ni par des cellules du clone malin. En effet, les segments de gènes utilisés ainsi que les séquences des CDR3 étaient différents entre les différentes cellules analysées et distincts de ceux du clone malin correspondant.

D'autre part, cette **diversité de segments de gènes et de CDR3 confirmait le caractère polyclonal de ces LB non tumoraux ZAP-70⁺, et l'absence de lien moléculaire évident avec le clone tumoral** correspondant pour chaque patient.

Bien que le faible nombre d'échantillons analysés ne permette pas de comparaisons statistiques pertinentes, les résultats suggéraient une **absence de stéréotypie du BCR des LB non tumoraux**.

En effet, il existait clairement des variations entre les différentes IGHV concernant : i) les segments de gènes VDJ utilisés ; ii) le cadre de lecture pour HCDR3 ; iii) la longueur en AA de HCDR3 et iv) l'enchaînement en AA de HCDR3 et leurs charges positives ou négatives (Figure 35.A). La famille V-3 étant celle comptant le plus de gènes, il était attendu qu'elle soit la plus représentée. Ceci était effectivement le cas

pour IGHV (13/20, 65 %), mais pas pour les chaînes légères (5/25, 20 %) ou la famille V-1 était majoritaire (12/25, 48 %) principalement représentée par le sous-groupe 1-39 (6/12, 50 %) (Figure 35.B).

D'autre part, les **IGHV des LB non tumoraux étaient principalement mutés**, 14/19 (73,7 %) présentant une homologie < 98 % comparativement à la séquence germinale. Le degré d'homologie restait toutefois élevé pour tous les IGHV, le plus bas étant de 92,3 % (cellule 4.D). Concernant les IGLV κ/λ , ils étaient mutés ou non en proportions globalement comparables (non mutés : 13/23, soit 56,3 %).

La région codant pour la CDR3 des chaînes lourdes comportant d'importants phénomènes de N addition, cette région a été exclue pour l'analyse du degré d'homologie et du ratio R/S des CDRs des IGHV. Ainsi, l'analyse détaillée des mutations s'est focalisée sur celles au sein des CDRs. Concernant les IGHV, parmi les 19 séquences analysables, 13 présentaient des mutations au sein des CDR1-2, dont 8 (61,5 %) avec des **mutations principalement de type non silencieuses (R/S > 2,925, n = 1) ou uniquement de type non silencieuse (R \geq 3 avec S = 0, n = 7)**. De même pour les CDR1-3 des IGLV κ/λ , parmi les 23 séquences analysables, 15 présentaient des mutations au sein des CDR1-2, dont 8 (53,3 %) avec des mutations principalement ou uniquement de type non silencieuse (n = 5 et n = 3 respectivement).

Au total, l'analyse du répertoire du BCR des LB non tumoraux ZAP-70⁺ (CD19⁺IgM⁻IgD⁻) sur cellules uniques, bien que limitée en nombre d'échantillons analysés a permis de confirmer le caractère polyclonal des LB et de suggérer les points suivants :

- **Absence de stéréotypie du BCR**
- **Absence de lien moléculaire évident avec le clone tumoral correspondant**
- **Caractère principalement muté des IGHV**
- **Mutations des CDRs principalement ou exclusivement non silencieuses, suggérant une pression de sélection antigénique**

A

CD5+ZAP+ (clone malin)																			
Patient	Cellule	IGHV										IGVK/IGVL							
		VH	D		JH	CDR3 (AA)				FR	CDR1-2	Homologie (CDR3 exclue)	κ/λ	Vκ/λ	Jκ/λ	CDR3 (AA)	FR	CDR1-3	Homologie
			Gène	RF		Séquence	Longueur	+	-										
1	CM	3-15*01	3-9*01	1	4*02	SGLLRFDWLLQGYFDY	18	1	2	0/0	0/0	100%	λ	1-44*01	1*01	AAWDDSLNALYV	0/0	0/0	100%
2	CM	3-23*04	3-9*01	2	6*02	AKGPRYDILTVGHYYGMDV	20	3	2	1/1	3/0	98,3%	κ	2-28*01	1*01	MQALQTTWT	3/1	1/0	98,3%
3	CM	3-48*02	6-19*01	1	4*02	ARVERYSWGAGYFDY	16	2	2	0/0	0/0	100%	κ	1-39*01	1*01	QQSYSTPRT	0/0	0/0	100%
4	CM	2-26*01	3-3*01	1	6*03	ARIRARFLEWLAEWELRYPYYMDV	27	4	4	0/0	0/0	100%	κ	3-20*01	1*01	QQYSSSRKT	0/0	0/0	100%
5	CM	1-69*01	2-2*01	3	6*02	ARDGDIVVPAAVFVGVDIYYGMDV	26	1	4	0/0	0/0	100%	κ	1-39*01	3*01	QQSYSTLFA	0/0	0/0	100%
6	CM	4-39*01	3-16*01	3	6*02	ARGGVGLWSYGYGMDV	19	1	1	0/0	0/0	100%	κ	3-20*01	1*01	QQYSSSRKT	0/0	0/0	100%
7	CM	3-30*04	3-9*01	1	6*02	ARVHGLRYFDWLSPYGMDV	24	3	2	0/0	0/0	100%	κ	1-33*01	3*01	QQYDNLQVPT	0/0	0/0	100%
CD5-ZAP+																			
Patient	Cellule	IGHV										IGVK/IGVL							
		VH	D		JH	CDR3 (AA)				FR	CDR1-2	Homologie (CDR3 exclue)	κ/λ	Vκ/λ	Jκ/λ	CDR3 (AA)	FR	CDR1-3	Homologie
			Gène	RF		Séquence	Longueur	+	-										
1	A	3-33*01	5-12*01	3	6*03	ATLDGQRGYYMDV	14	1	1	1/2	3/0	97,9%	κ	1-39*01	1*01	QQSFSTPTWT	1/0	4/1	97,9%
	B	3-15*01	3-9*01	1	4*02	SGLLRFDWLLQGYFDY	18	1	2	0/0	0/0	100%	κ	1-5*03	1*01	QQYNSYWT	2/0	1/0	98,9%
	C					/							κ	4-1*01	3*01	QQYSTPFT	0/0	0/1	99,7%
2	A	3-48*02	3-22*01	2	4*02	ARETYDSDYYLPAGADF	20	1	4	1/2	5/2	97,6%	κ	2-28*01	1*01	MQALQTTWT	3/1	1/0	98,3%
3	A	4-39*01	3-16*01	3	6*04	ARGGVGLWSYGYGMDV	19	1	1	1/0	0/0	99,6%	λ	1-47*01	3*02	AAWDDSLSGPV	0/0	0/0	100%
	A	3-30*3	1-26*01	3	6*03	AKDLSGSEPYQYFMDV	19	1	3	3/0	0/0	98,6%	κ	1-5*03	5*01	QQYNSYPT	1/2	2/0	98,2%
	B	4-34*01	1-26*01	3	4*02	ARERWSSGYFDY	12	2	2	4/2	4/0	96,5%	λ	1-47*01	2*01	ATWDDSLRGV	0/3	6/0	96,9%
	C	3-33*01	5-12*01	3	6*03	ATLDGQRGYYMDV	14	1	2	0/2	4/0	97,9%	κ	1-39*01	3*01	QQSYSTLFA	1/0	0/0	99,6%
	D	1-69*06	2-2*01	3	6*02	AREGVALGYHTLDV	15	1	2	12/2	5/2	92,3%	κ	4-1*01	1*01	QQYSTPPT	4/1	1/0	98%
	E	3-23*04	1-26*01	1	4*02	ASDVGTVGATYFDF	14	0	2	3/0	3/0	97,9%	κ	3-15*01	1*01	HQYNKWPTQ	6/5	6/0	94%
	F	4-34*01	6-19*01	1	4*02	ARSLYSYSGWPLY	14	1	0	12/1	0/0	95,0%	κ	4-1*01	1*01	QQYSTPPT	0/0	0/0	100%
	G	4-40*02	2-2*01	3	6*03	ASQVPAAYYYMDV	15	0	0	1/2	0/0	98,7%	κ	2-28*01	2*03	MQALQTPYS	0/0	0/1	99,5%
5	A	3-53*02	2-2*01	1	6*02	AGDPGLPNGMDV	12	0	2	4/4	7/1	94,3%	κ	3-20*01	1*01	QQFGDPPWT	6/1	5/1	95,5%
	A	3-30*3	1-26*01	1	4*02	AKVPRVGASTVPLYFDY	18	2	1	5/9	2/3	93,4%	λ	2-14*01	1*01	SSYSSSTWV	7/0	2/1	96,6%
	B	3-23*04	1-26*01	1	4*02	ASDVGTVGATYFDF	14	0	2	3/0	3/0	97,9%	κ	1-5*03	4*01	QHYKTYSLT	1/2	4/1	97,2%
	C	3-23*04	3-3*01	1	4*02	AKEILEWLLVY	12	1	3	3/1	3/0	97,6%	κ	3-20*01	2*01	QQYSSPPLYT	1/0	0/0	99,7%
	D	4-61*01	3-10*01	2	5*02	ARGSTWFDV	9	1	1	1/4	1/0	97,9%	κ	1-39*01	1*01	QQSYNTPRT	1/0	0/0	98,2%
	E	3-48*01	2-15*01	2	6*02	ARAGVLSYYGIDV	14	1	1	3/1	4/0	97,2%	κ	2-28*01	1*01	MQALQTPRT	1/0	0/0	99%
	G					/							κ	3-11*01	1*01	QQRSNWPPWT	0/0	0/0	100%
	A	4-34*01	3-9*01	2	4*02	ARGPERVILTYGYPFA	17	2	1	1/0	0/0	99,6%							
	B	3-48*02	3-22*01	2	4*02	ARETYDSDYYLPAGADF	20	1	3	2/4	5/2	95,4%	λ	3-1*01	1*01	QAWDNSTYV	7/4	3/1	94,7%
	C					/							κ	1-39*01	4*01	QQSYSTLLT	9/1	0/0	95,9%
	D					/							κ	1-39*01	1*01	QQSYNTPRT	29/3	3/0	86%
	E					/							κ	1-39*01	4*01	QQGVDTPLT	15/6	8/3	87%

B

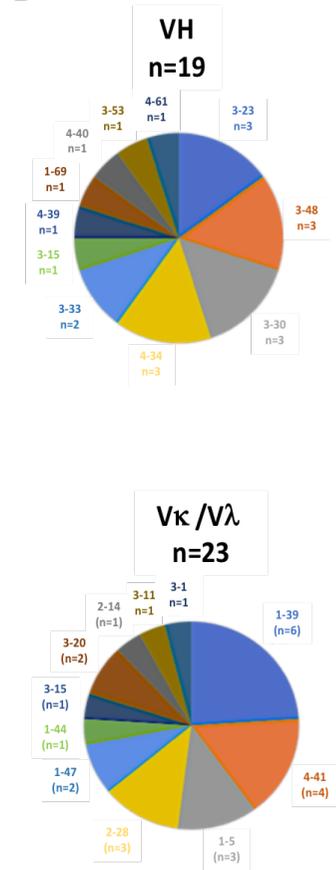


Figure 35. Répertoire des LB CD5⁺ZAP-70⁺ et du clone malin correspondant à partir de tri en cellule unique de 7 LB de patients atteints de LLC avec CAI.

A) Résumé des segments V(D)J utilisés, du cadre de lecture du gène D, de la séquence en AA des CDR3, de la longueur de la HCDR3, des AA chargés positivement (+) et négativement (-) et du degré d'homologie avec la séquence germinale, et du ratio des mutations remplaçantes (R) / silencieuses (S)

B) Répartition des VH et Vκ/Vλ utilisés

RF : reading frame ; FR : framework region ; CDR : complementary domain region

2. AUTOREACTIVITES DES LB NON TUMORAUX ZAP-70⁺

Le but était d'apporter des premiers éléments de réponse aux deux questions suivantes :

- Est-ce que les LB non tumoraux (CD5⁻) ZAP-70⁺ sont enrichis en cellules auto-réactives ?
- Est-ce que les LB non tumoraux (CD5⁻) ZAP-70⁺ sont à l'origine de la production des auto-Ac polyclonaux responsables des CAI dans la LLC ?

Pour cela, la stratégie a consisté en la production d'Ac monoclonaux à partir des séquences du BCR exprimé par les LB CD5⁻ZAP-70⁺, et de tester leur réactivité(s) envers différents auto-antigènes.

A) PRODUCTION D'AC MONOCLONAUX A PARTIR DES LB CD5⁻ ZAP-70⁺

Pour cela, des LB non tumoraux ZAP-70⁺ (CD19⁺IgD⁻CD5⁻) ont été triés en cellule unique de la même façon que pour l'étude du répertoire sur cellule unique à partir de 6 patients atteints de LLC et présentant une CAI (AHAI et/ou PTI).

Les produits de PCR2 purifiés des IGHV et IGVK ou IGVL de ces LB ont été ensuite digérés et insérés dans des vecteurs d'expression humains, puis transfectés dans des cellules HEK293 et mis en culture 6 jours comme détaillé pour la production des IgG complètes monoclonales correspondantes (Cf. partie 3, I.E).

La production de ces Ac a été longue et difficile, nécessitant de nombreuses mises au point, notamment pour augmenter la sensibilité et la reproductibilité de la RT-PCR ZAP-70.

Un total 20 Ac monoclonaux issus de LB non tumoraux ZAP-70⁺ ont été produits à ce jour, dont 7 Ac entièrement dans notre unité, et 13 par l'équipe d'Éric Meffre à Yale à partir du stade de la transfection cellulaire (produits de PCR2 clonés et séquencés envoyés pour production).

B) TESTS DES AUTOREACTIVITES A PARTIR DES SURNAGEANTS

(1) QUANTIFICATION DES AC OBTENUS

L'absence initiale de méthode de purification fiable disponible dans notre laboratoire, les premiers tests d'auto-réactivité ont eu lieu à partir des surnageants.

Ceci concernait les Ac monoclonaux entièrement produits au sein de notre unité, soit $n = 9$: 7 Ac issus de LB CD5⁺ZAP-70⁺ provenant de 3 patients avec LLC compliquée de CAI (2 avec syndrome d'Evans et 1 avec AHAI) et 2 Ac issus de LB CD5⁻ZAP-70⁻ provenant d'un patient avec LLC compliquée d'un syndrome d'Evans.

La concentration en IgG totale monoclonale de chaque surnageant a été déterminée par ELISA sans purification préalable. La présence des chaînes légères a aussi été vérifiée par ELISA de façon semi-quantitative (résultats non montrés).

Les concentrations en IgG totale variaient de 0,9 à 24 µg/mL de milieu de culture (15 mL/échantillon). Un échantillon (cellule 6.6) présentait une concentration inférieure à celle du milieu de transfection seul, utilisé comme contrôle négatif, et a donc été retenu comme un échec de la transfection (Tableau 14).

Tableau 14. Concentrations mesurées par ELISA des Ac monoclonaux (IgG) non purifiés dans les surnageants de transfection.

Patient	Cellule	IgG dans surnageant (µg/mL)
4	7	0,9
6	2	3,8
	6	0,1
	7	3,2
	35	2,1
	36	6,5
	41 (ZAP-70 ⁻)	24
	49 (ZAP-70 ⁻)	5
7	21	0,7
Milieu de transfection seul		0,2

(2) AUTOREACTIVITES ANTI-ERYTHROCYTES ET ANTI-PLAQUETTES

Les 6 surnageants contenant les Ac monoclonaux issus des LB CD5⁻ZAP-70⁺ et les 2 contenant les Ac issus des LB CD5⁻ZAP-70⁻ détaillés précédemment ont été testés pour leur réactivité envers les érythrocytes par TCD à l'anti-globuline et envers les plaquettes par test MAIPA à l'EFS de Strasbourg.

Aucun des surnageants testés n'a montré de réactivité, ni anti-érythrocytaire ni antiplaquettaire avec les tests effectués (résultats non montrés).

(3) REACTIVITES ANTI-ADN, ANTI-THYROGLOBULINE ET ANTI-ACTINE

La recherche d'une autoréactivité plus globale de ces mêmes Ac monoclonaux a ensuite été testée par ELISA envers des auto-Ag communs tels que l'ADNdb, la thyroglobuline et l'actine. Pour ces tests, du sérum de patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES), connu pour contenir des Ac autoréactifs envers ces 3 Ag, du surnageant pur de milieu de transfection seul, ont été utilisés respectivement comme contrôle positif et négatif.

Aucun des 6 surnageants contenant les Ac monoclonaux issus des LB CD5⁻ZAP-70⁺ n'a montré de réactivité anti-ADNdb, anti-thyroglobuline ou bien anti-actine (dilués ou utilisés purs), bien qu'une certaine réactivité faible et non significative ait été détectée pour certains d'entre eux (résultats non montrés).

Dans l'hypothèse que ces Ac monoclonaux soient trop dilués dans le surnageant pour avoir une réactivité significative en comparaison du contrôle positif ou que leurs affinités soient faibles, la faible réactivité de ces Ac monoclonaux (surnageants utilisés non dilués) a aussi été comparée à celles des 2 surnageants (non dilués) issus de la transfection des LB CD5⁻ZAP-70⁻ (Figure 36).

Bien que certains surnageants contenant les Ac monoclonaux issus des LB ZAP-70⁺ montraient une certaine autoréactivité, notamment envers la thyroglobuline, cette réactivité était faible comparativement au contrôle positif (sérum de LES) et globalement identique à celles des surnageants des LB ZAP-70⁻, et même peu différente de celle du contrôle négatif représenté par le milieu de transfection seul, correspondant à une réactivité non spécifique et très probablement non pertinente d'un point de vue clinique.

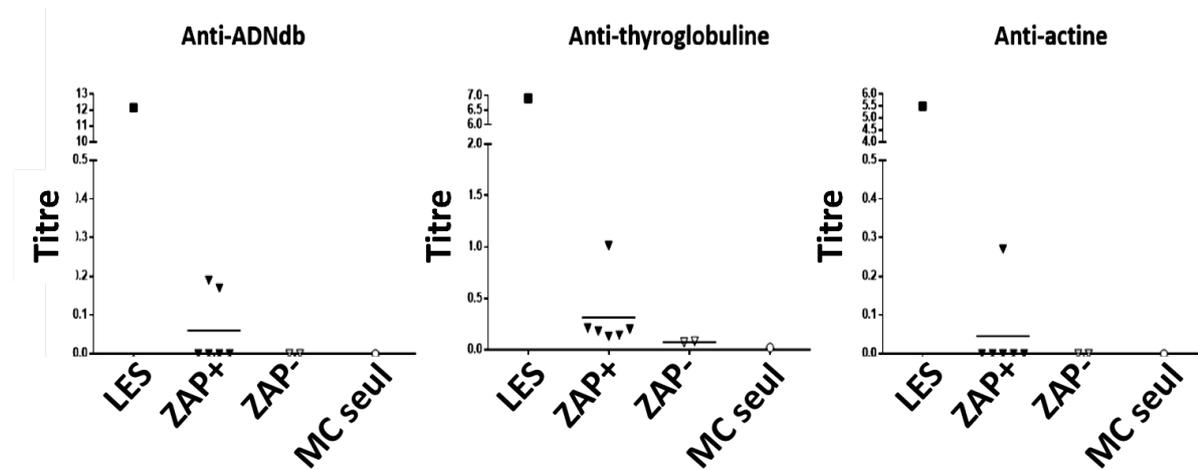


Figure 36. Réactivités anti-ADNdb, anti-thyroglobuline et anti-actine en ELISA des surnageants contenant les Ac monoclonaux issus des LB CD5-ZAP-70⁺ de patients atteints de LLC avec CAI. Ces surnageants ont été comparés à ceux issus de LB CD5-ZAP-70⁻ provenant des mêmes patients, à du milieu de culture (transfection) seul (MC) et à du sérum de patient atteint de lupus érythémateux systémique (LES) comme contrôle négatif et positif respectivement. Les réactivités ont été exprimées en titres (inverse de la dilution nécessaire pour atteindre une DO choisie).

Au total, nous avons entièrement produits, au sein de notre laboratoire, **9 Ac monoclonaux issus de LB non tumoraux CD5⁻ provenant de patients atteints de LLC avec CAI, dont 7 issus de LB CD5-ZAP-70⁺ et 2 de LB CD5-ZAP-70⁻.**

Bien que limités par le très faible effectif, **aucun de ces Ac monoclonaux n'a montré d'autoréactivité significative envers les érythrocytes, les plaquettes, l'ADNdb, la thyroglobuline ou bien encore l'actine.** Ceci était potentiellement dû d'une part, à l'utilisation initiale des Ac monoclonaux non purifiés dans les surnageants de culture, et donc non concentrés et d'autre part, au nombre limité d'Ac monoclonaux produits, seul une fraction limitée des LB CD5-ZAP-70⁺ pouvant être auto réactive dans la LLC.

C) ESSAI DE PURIFICATION DES AC A PARTIR DES SURNAGEANTS

Concernant la purification, nous avons utilisé le kit Melon Gel Monoclonal IgG Purification (*Thermo Scientific*) qui est adapté pour la purification d'Ac monoclonaux issus de surnageants de cultures, avec un rendement et une pureté comparables voire meilleures que les kits utilisant les protéines G ou A, d'après le fabricant.

Les différents tests montraient effectivement un excellent rendement avec, bien que déjà faibles avant purification, des concentrations avant et après purification restant comparables. Le résultat des 2 échantillons tests est proposé en dans le tableau 15.

Concernant la méthode de concentration, nous avons utilisé les concentrateurs à centrifuger VIVASPIN 20® 30 000 MWCO (*Sigma-Aldrich*), adapté au poids moléculaire des Ac monoclonaux produits de 150 kDa (MCWO devant être inférieur à 50 % du poids moléculaire de la molécule filtrée).

Cette technique augmentait effectivement la concentration en Ac. Toutefois, après les trois lavages finaux de la colonne au PBSX1 recommandés par le protocole fabricant, il existait une diminution très importante de la concentration de ces Ac dans le volume d'élution final. Les valeurs mesurées étant à la limite du seuil de sensibilité du Nano drop, les concentrations ont été vérifiées par ELISA, confirmant la perte importante des IgG lors des lavages sur colonnes (concentration avant lavages/concentration après lavages < 20 pour l'ensemble des échantillons testés) (exemples en tableau 15).

Tableau 15. Exemples représentatifs des différents tests concernant les taux en Ac monoclonaux dans les surnageants de transfection avant et après purification et concentration sur colonnes
ND : non détectable

Patient (cellule)	Avant purification	Après purification	Après concentration Mais avant lavages au PBSX1	Après lavages aux PBSX1	
				Nanodrop	ELISA
2(7)	3,2 µg/mL	2,8 µg/mL	9,7 µg/mL	ND	0,2 µg/mL
2(41)	25 µg/mL	24 µg/mL	82 µg/mL	3 µg/mL	4 µg/mL

Ainsi, malgré des taux faibles d'Ac monoclonaux dans les surnageants de transfection, la purification et la concentration de ces Ac étaient efficaces. Toutefois, la majeure partie de ces Ac était perdue (fixation sur la membrane des colonnes ?) lors des lavages au PBSX1, nécessaires au protocole. Ces pertes n'auraient probablement pas eu de grand impact en cas de concentrations initiales de l'ordre du mg/L mais étant à la base dans des concentrations entre 20 et 100 plus faibles, ceci résultait en la perte quasi totale du peu de quantité de protéine disponible.

Ainsi, une possibilité aurait été d'essayer de concentrer les Ac monoclonaux sur des colonnes plus petites et avec des membranes hypo-adsorbants.

Toutefois, compte tenu de l'absence de nouveaux échantillons tests disponibles, des difficultés techniques et du temps nécessaires pour la production de nouveaux Ac monoclonaux, nous avons décidé de nous rapprocher de l'équipe du Pr Éric Meffre à Yale, à qui est à l'origine de la technique utilisée pour la production de ces Ac.

Il a été ainsi convenu, aux vues de toutes ces difficultés et limitations, que la production des Ac monoclonaux s'effectuerait désormais dans leur laboratoire (Immunobiology lab., Yale University School of Medicine, New Haven, USA) à partir du stade de la transfection cellulaire. L'ensemble des techniques préalables, jusqu'au clonage des produits de PCR2 inclus, continuant à être effectué au sein de notre unité. **De plus, la même équipe disposant des techniques et de l'expérience des autoréactivités sur Ac monoclonaux et de l'ensemble des contrôles nécessaires (Tiller et al., 2008; Wardemann et al., 2003), la suite des tests visant à étudier la réactivités des Ac monoclonaux issus des LB CD5-ZAP-70⁺ a aussi été réalisé par cette équipe.**

D) TESTS DES AUTOREACTIVITES A PARTIR DES AC MONOCLONAUX PURIFIES ET CONCENTRES

Les séquences clonées complètes de 26 BCR issus de LB CD5-ZAP-70⁺ provenant de 7 patients différents atteints de LLC avec CAI ont été envoyés pour production des Ac monoclonaux correspondants.

Parmi ceux-ci, 17 Ac ont été produits et leurs autoréactivités testées, 2 transfections ont échoué et 7 sont toujours en cours de production.

Les concentrations des 17 Ac obtenus dans les surnageants de transfection variaient de 14 à 37 µg/mL, et de 96 à 597 µg/mL après purification sur billes marquées aux protéines G (*Sigma- Aldrich*) (Figure 37.A).

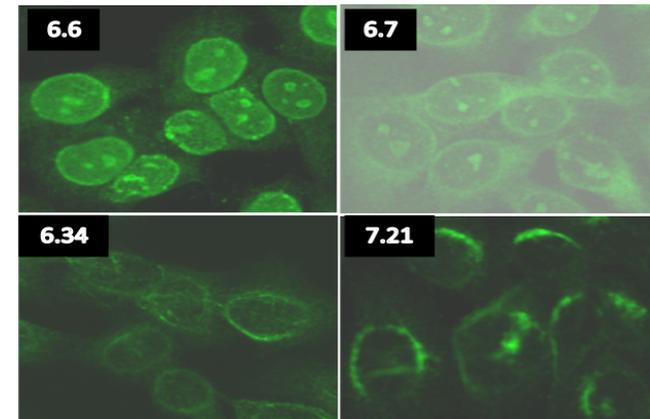
La réactivité anti-nucléaire a été évaluée par immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2 afin de distinguer directement les Ac reconnaissant les Ag nucléaires et pouvant être pathologiques et étant associés à des maladies auto-immunes telles que le LES, et les Ac reconnaissant des Ag cytosoliques dont l'association avec des pathologies auto-immunes est plus discutée (Tiller et al., 2008; Wardemann et al., 2003). Avec cette technique, **1/13 Ac présentait une réactivité antinucléaire isolée, 1/13 une réactivité antinucléaire et cytoplasmique, et 2/13 présentaient une réactivité cytosolique** (de type réticulum endoplasmique et du cytosquelette respectivement) (4 Ac sont en cours de test à ce jour) (Figure 37.B).

La polyréactivité de ces Ac monoclonaux a été évaluée par ELISA envers les auto-Ag suivants : ADNdb, insuline et LPS. Un Ac était considéré comme polyréactif s'il reconnaissait au moins deux Ag parmi les trois testés (Tiller et al., 2008; Wardemann et al., 2003). Ainsi, avec cette technique, **4/17 Ac étaient considérés comme polyréactifs** (Figure 37.C).

A

Patient	N°Cellule	[IgG] purifiées	AAN Hep-2	Polyréactivité
		($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
1	1	115	-	-
3	40	131	-	-
4	28	597	-	-
	8	278	-	-
	63	227	-	-
	III K	?	<i>En cours</i>	-
	II L	?	<i>En cours</i>	-
6	2	172	-	-
	6	233	Nucléaire	-
	7	96	Nucléaire et cytoplasmique	-
	31	321	-	+
	34	410	Cytosquelette	+
	35	435	-	-
7	7	230	-	-
	21	223	Réticulum endoplasmique	-
8	K	?	<i>En cours</i>	+
9	L	?	<i>En cours</i>	+

B



C

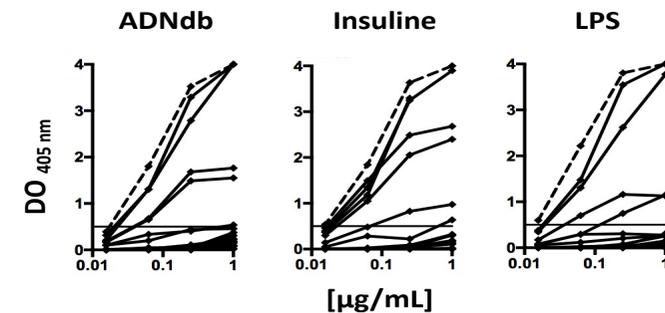


Figure 37. Autoréactivités des Ac monoclonaux purifiés et concentrés issus des LB CD5⁺ZAP-70⁺ provenant de patients avec LLC avec CAI.

A) Résumé des résultats des différents clones (cellule) testés concernant la concentration des Ac monoclonaux avant et après purification, l'aspect du marquage sur cellules Hep-2 et leur éventuelle polyréactivité (reconnaissance d'au moins 2 auto-Ag parmi : ADNdb, insuline et LPS)

B) Marquage sur cellules HEP-2 des 4 clones positifs

C) DO à 405 nm des 2 clones polyréactifs envers l'ADNdb, l'insuline et le LPS

HEp-2 : human epithelial type-2 ; DO : densité optique ; ADNdb : ADN double brin ; LPS : lipopolysaccharide

3. CONCLUSIONS DE LA PARTIE HUMAINE

L'analyse du répertoire du BCR des LB non tumoraux ZAP-70⁺ a permis de confirmer le caractère polyclonal de ces LB et de suggérer les points suivants :

- **Absence de stéréotypie du BCR**
- **Absence de lien moléculaire évident avec le clone tumoral correspondant**
- **Caractère peu muté des IGHV**
- **Mutations des CDRs principalement ou exclusivement non silencieuses, suggérant une pression de sélection antigénique**

La recherche d'autoréactivité(s) de ces LB non tumoraux ZAP-70⁺ a montré pour le moment que **15,4 % présentaient une réactivité antinucléaire et 23,5 % une polyréactivité (anti-ADNdb, anti-insuline, anti-LPS).**

Ces résultats concernent toutefois un nombre limité de cellules et sont donc à prendre avec précaution.

D'autres Ac monoclonaux sont en cours de production. Les résultats finaux seront comparés avec la prévalence d'autoréactivité antinucléaire et de polyréactivité des LB de patients sains disponible dans la littérature selon les mêmes techniques.

B. PARTIE MURINE DU PROJET

1. GENERATION DU MODELE KI ZAP-70

Pour ce projet, un modèle murin transgénique a été généré, de type KI conditionnel, permettant la surexpression de ZAP-70 spécifiquement dans les LB dès le stade proB (Cf. partie 3, II.A et figure 26).

Afin d'identifier tout d'abord les souris porteuses du transgène *Zap-70*, une première PCR de génotypage est réalisée sur ADN génomique extrait à partir de fragments de queue. Cette PCR1 utilisant des amorces sens et anti-sens spécifiques de la cassette NEO et du transgène *Zap-70* respectivement, la présence d'une bande de taille attendue de 269 pb correspond à un échantillon *Zap*^{+/-} et l'absence bande visible à un échantillon *Zap-70*^{-/-} (wild type) (Figure 38, gauche).

Cette PCR ne permettant pas de distinguer une hétérozygotie d'une homozygotie pour *Zap-70*, une deuxième PCR (PCR2) est réalisée, en utilisant des amorces hors transgène, permettant l'amplification de l'ensemble du locus ROSA26. En cas de présence homozygote du transgène, celui étant de très grande taille (7 674 pb), la PCR est non productive résultant en l'absence de bande visible après révélation aux UV. En cas d'hétérozygotie, un allèle du locus ROSA26 est amplifié, résultant en la présence d'une bande attendue de 244 pb (Figure 38, milieu).

Il n'est pas possible de faire directement la PCR2 sur ces souris car la présence d'une bande de 244 pb ne permettrait pas de différencier une hétérozygotie pour *Zap-70* d'une absence totale de présence du transgène.

Une PCR de génotypage *Mb1* est ensuite réalisée afin de rechercher une bande d'intérêt attendue de 600 pb correspondant aux souris porteuses du transgène *Mb1-Cre* (Figure 38, droite).

Par regroupement de résultats, ceci permet au final de distinguer les souris d'intérêt KI *Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{+/-}* qui ont été nommées par commodité KI ZAP-Mb1, et les souris KI *Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{-/-}*, porteuses du transgène *Zap-70* dans le locus ROSA, mais qui ne surexpriment donc pas ZAP-70 du fait de l'absence de la recombinaison Cre. Ces dernières ont été nommées KI ZAP (*Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{-/-}*) et servent de contrôles tout au long des expériences.

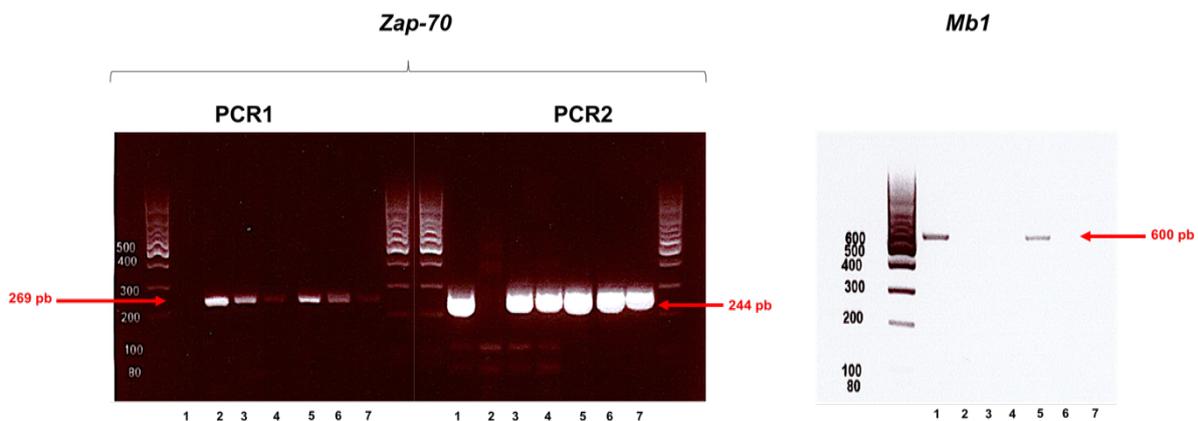


Figure 38. Exemples de génotypages *Zap-70* et *Mb1* sur différentes souris (n = 7)

Gauche) PCR1 : bandes de 269 pb correspondant aux souris *Zap-70^{+/-}* ou *Zap-70^{+/+}*. L'absence de bande correspond aux souris wild type.

Milieu) PCR2 : bandes de 244 pb correspondant à l'amplification du locus ROSA26, donc aux souris hétérozygote pour *Zap-70* ou wild type. L'absence de bande correspond à l'échec de l'amplification du locus ROSA26, donc à la présence homozygote de *Zap-70*.

Droite) PCR Mb1 : bandes de 600 pb correspondant aux souris *Mb1-Cre^{+/-}*

- Souris hétérozygotes pour *Zap-70* : n°3-7
- Souris homozygotes pour *Zap-70* : n°2
- Souris KI ZAP-Mb1 (*Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{+/-}*) : n°5
- Souris KI ZAP (*Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{-/-}*) : n°3, 4, 6 et 7
- Souris KI Mb1-Cre (*Zap-70^{-/-} / Mb1-Cre^{-/-}*) : n°1

Ceci nécessitant la réalisation de nombreux croisements et génotypages avec un rendement final de souris double positives pour *Zap-70* et *Mb1* faible, nous avons optimisé la procédure en procédant par étapes :

1) Génération d'une lignée homozygote *Zap-70^{+/+}* :

a) Croisements entre les fondateurs KI *Zap-70^{+/-}* (n = 3) et la lignée wild type de même fond génétique C57BL/6N puis identification, parmi les descendants, des hétérozygotes *Zap-70^{+/-}* par PCR1

b) Croisements des hétérozygotes entre eux puis distinction, parmi leurs descendants, des hétérozygotes ou homozygotes par la PCR1 suivie de la PCR2

Puis croisement uniquement des homozygotes *Zap-70^{+/+}* avec la lignée KI *Mb1-Cre^{+/-}* afin d'obtenir 100 % de souris d'intérêt parmi leurs descendants, ceux-ci étant forcément porteur du transgène *Zap-70* et étant soit de type KI ZAP-Mb1 (*Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{+/-}*) ou KI ZAP (*Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{-/-}*) suite à leur distinction par la PCR Mb1

Les souris KI ZAP utilisées pour les expériences provenaient de la même portée que leurs congénères KI ZAP-Mb1.

Afin d'évaluer un quelconque effet délétère de l'expression de la Cre, des souris de même fond génétique C57BL/6N possédant uniquement le transgène de la recombinaison Cre (*Mb1-Cre^{+/-}*) ont également été analysées. Aucune différence n'a été observée entre les souris *Mb1-Cre^{+/-}* et les souris KI ZAP (*Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{-/-}*) (résultats non montrés).

2. VALIDATION DU MODELE KI ZAP-MB1

A) VISUALISATION DE L'EXPRESSION GLOBALE DE LA GFP PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Dans le vecteur CTV, la séquence codante de *Zap-70* est suivie d'une cassette IRES-eGFP servant de rapporteur. Les cellules dans lesquelles l'excision de la cassette STOP a été effective suite à l'action de la Cre expriment simultanément et en quantité équivalente les transcrits puis les protéines ZAP-70 et GFP.

Afin de valider l'expression conditionnelle de ZAP-70 dans les LB dès le stade proB, la fluorescence de la protéine rapporteuse GFP a été mesurée par cytométrie en flux dans les progéniteurs médullaires précoces CD43⁺B220⁻, les proB (CD43⁺B220^{Low}CD19⁺IgM⁻), les préB, (CD43⁻B220^{Low}CD19⁺IgM⁻), les LB périphériques spléniques et ganglionnaires B220⁺IgM⁺ et dans les LT spléniques (CD3⁺B220⁻) (Figure 39).

Il existait 2 profils d'expression de la GFP dans les LB : Low et High, pour toutes les souris et ce, dans tous les organes. Ces LB seront dénommés pour toute la suite LyGFP^{Low} et LyGFP^{High}.

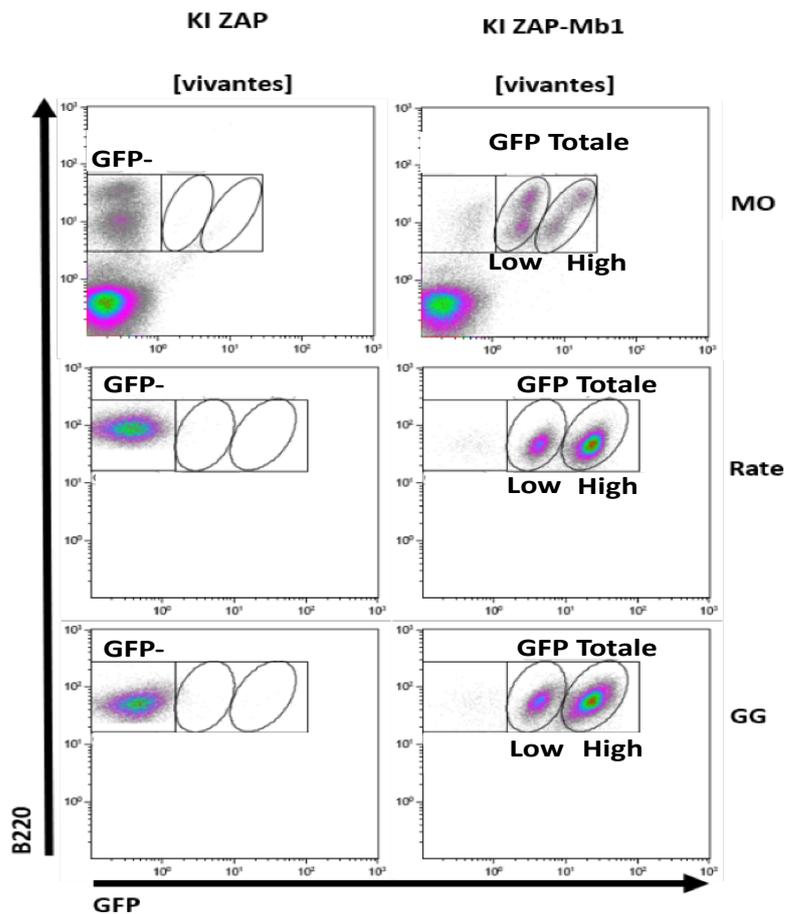


Figure 39. Identification des progéniteurs médullaires et visualisation de l'expression de la GFP dans les différents organes lymphoïdes par cytométrie en flux

Partie gauche : cellules B220⁺ médullaires, spléniques et ganglionnaires ; Partie droite : méthode d'identification des proB, préB, immatures et matures (recirculating), indépendamment de l'expression de la GFP.

Ces résultats sont représentatifs de l'ensemble des souris analysées. (%) : proportion des cellules parmi celles sélectionnées (crochets)

L'expression de la GFP Totale (Low et high) était observée dans plus de 95 % des LB dès le stade proB dans les souris KI ZAP-Mb1 et dans moins de 1 % des LB correspondant dans les souris KI ZAP ($p < 0,001$). Les progéniteurs précoces CD43⁺B220⁻ ainsi que les LT étaient bien GFP⁻ dans les deux groupes (Tableau 16).

Tableau 16. Comparaison des pourcentages de cellules exprimant la GFP dans les différents organes lymphoïdes des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 par cytométrie en flux

MO : moelle osseuse ; LB : lymphocytes B ; GG : ganglions ; LT : lymphocytes T
ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

Organes	Marquages	Cellules GFP ⁺ (% ± écart type)		p
		KI ZAP (n=7)	KI ZAP-Mb1 (n=9)	
MO	CD43 ⁺ B220 ⁻	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	ns
	ProB CD43 ⁺ B220 ^{Low} IgM ⁻	0,4 ± 0,3	95,4 ± 1,9	< 0,001
	PréB CD43 ⁺ B220 ^{Low} IgM ⁻	0,1 ± 0,1	98,9 ± 0,5	< 0,001
LB Rate	B220 ⁺	0,5 ± 0,3	96,7 ± 1,1	< 0,001
LB GG	B220 ⁺	0,6 ± 0,3	95,6 ± 1,4	< 0,001
LT Rate	CD3 ⁺	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	ns

Ainsi, la GFP, protéine rapporteuse de ZAP-70, était exprimée de manière spécifique dans la lignée B et ce dès le stade proB.

B) ANALYSE DES DIFFERENTS PROFILS D'EXPRESSION DE LA GFP

Deux profils d'expression de la GFP par les LB (LyGFP^{Low} et LyGFP^{High}) étaient observés pour toutes les souris et ce, dans tous les organes analysés (MO, rate et GG).

La proportion de LyGFP^{Low} et LyGFP^{High} variait selon les souris, certaines présentant principalement des LyGFP^{Low}, d'autres majoritairement des LyGFP^{High}, et certaines avec un profil intermédiaire (LyGFP^{Low} ≈ LyGFP^{High}) (Figure 40.A).

Ces proportions variaient même entre souris de la même fratrie plaidant contre un effet fondateur. Ceci n'était pas non plus associé au sexe ni à l'âge des souris (Figure 41.A). De plus, la proportion de LyGFP^{Low} ou LyGFP^{High} était conservée pour chaque souris entre le compartiment médullaire et la périphérie (rate), plaidant contre l'hypothèse d'une sélection positive ou négative majeure de ces cellules selon leur profil d'expression de GFP (Figure 41.B).

Une autre lignée transgénique KI Trib1 avait été antérieurement développée dans notre laboratoire et validée (AL/02/15/09/11, Simoni et al., 2018). Cette lignée avait été créée en utilisant exactement la même construction génique que notre modèle (vecteur CTV, promoteur synthétique CAG, cassette *loxP* Neo-STOP, cassette IRES-EGFP flanquée de séquences *loxP*) à l'exception de la séquence codante (*Trib1* au lieu de *Zap-70*). Ces souris avaient aussi été croisées avec la lignée *Mb1-Cre^{+/-}* afin de surexprimer *Trib1* de manière conditionnelle spécifiquement dans les LB dès le stade proB. Bien qu'observé dans une moindre mesure que dans notre modèle, il existait aussi différents profils d'expression selon les souris (Figure 40.B), notamment en périphérie.

Là encore, ceci était observé au sein de la même fratrie et était indépendamment du sexe ou de l'âge. Ces données plaident pour un différentiel d'expression en lien avec le construit génique et non en lien avec le transgène.

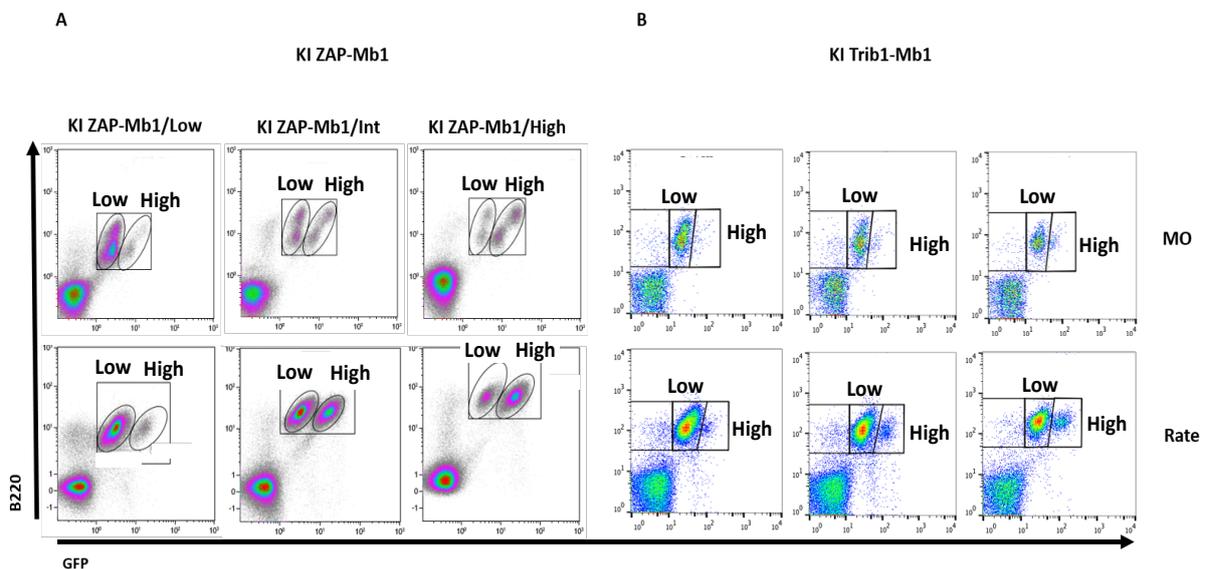


Figure 40. Exemples des différents profils d'expression de la GFP par les LB selon les souris dans le modèle murin KI ZAP-Mb1 (A) et KI Trib1-Mb1 (B) utilisant la même construction génique. Dans les 2 modèles, il existait clairement 2 populations distinctes de LB GFP⁺ : les LyGFP^{Low} et les LyGFP^{High}. Dans notre modèle (KI ZAP-Mb1), ceci permettait même d'identifier 3 groupes de souris : celles avec un profil principalement LyGFP^{Low}, d'autres majoritairement LyGFP^{High} et d'autres avec un profil Intermédiaire. Les profils d'expression dans les ganglions étaient identiques à ceux de la MO et de la rate et non représentés ici.

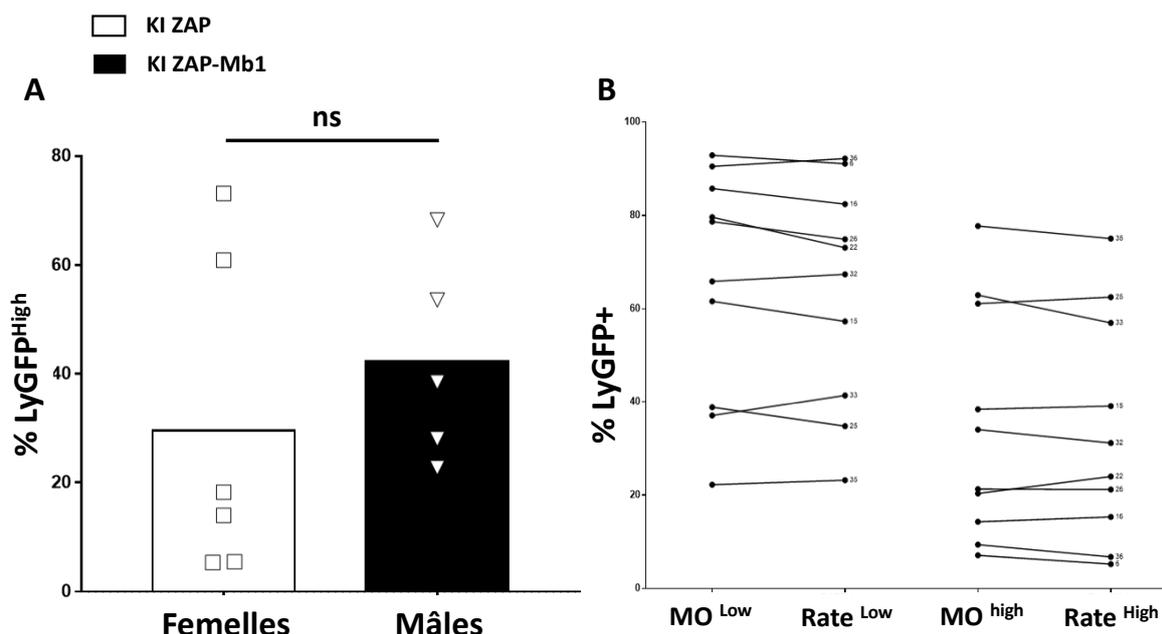


Figure 41. Proportion de LyGFP^{High} selon le sexe (A) et proportion de LyGFP^{Low} et de LyGFP^{High} médullaires et spléniques pour chaque souris (B) (n° de souris correspondant à chaque ligne).

Au total : la GFP était exprimée par les LB selon 2 profils : LyGFP^{Low} et LyGFP^{High}, en proportions variables selon les souris, mais de manière conservée entre la moelle osseuse et la périphérie. Ceci est très probablement en lien avec la nature du construit génique.

C) VISUALISATION DE L'EXPRESSION DE ZAP-70

Afin de confirmer et de préciser les données précédentes, nous avons essayé de visualiser directement l'expression de la protéine ZAP-70 par cytométrie en flux.

Ceci nécessitait la fixation et la perméabilisation des cellules puis un marquage intracellulaire spécifique anti-ZAP-70. La positivité pour ZAP-70 était définie par le contrôle isotypique sur les LT (0,5 % de LT ZAP-70). Avec cette méthode, plus de 90 % des LT étaient bien ZAP-70⁺ (contrôle positif) et la proportion moyenne de LB ZAP-70⁺ était bien significativement plus importante dans les souris KI ZAP-Mb1 comparativement aux souris KI ZAP ($p < 0,001$) (Figure 42).

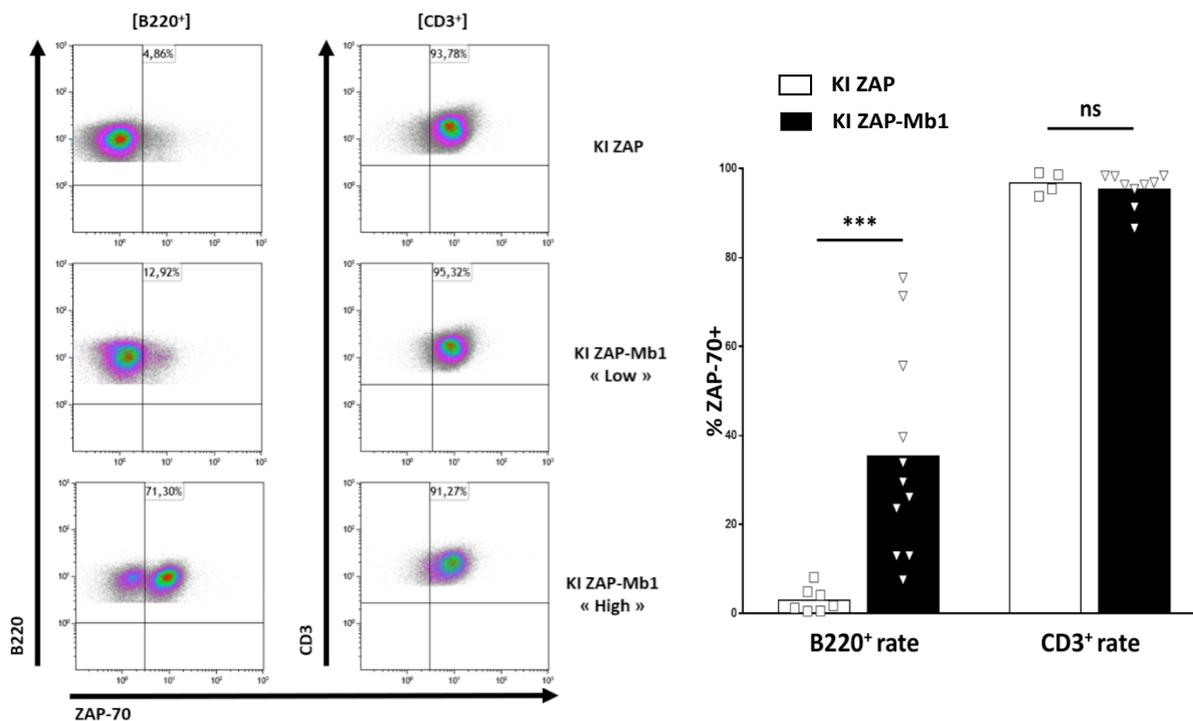


Figure 42. Profils d'expression de ZAP-70 par cytométrie en flux.

*ns : non significative ; ** : $p < 0,001$ (test de Mann-Whitney)

Toutefois, il existait une différence importante entre la proportion de LB GFP⁺ et de LB ZAP-70⁺ pour chaque souris KI ZAP-Mb1. En effet, la quasi-totalité des LB étaient GFP⁺ chez toutes les souris (Cf. tableau 15) mais au maximum 76 % de ces LB étaient aussi ZAP-70⁺. Différents autres kits de fixation/perméabilisation ont été testés, avec globalement les mêmes résultats (non montrés).

La GFP et ZAP-70 étant théoriquement exprimées de façon égale avec notre construit génique en termes de transcrits et de protéine, l'hypothèse principale expliquant cette différence était un manque de sensibilité de la détection de ZAP-70 par cytométrie en flux avec ces différentes techniques, celles-ci ne détectant probablement que les LB exprimant fortement ZAP-70 (ZAP-70 « High ») correspondant aux LyGFP^{High} dont la fluorescence est quant à elle spontanée. Un argument renforçant cette hypothèse était qu'il existait une corrélation positive entre l'intensité d'expression de la GFP par les LB et la proportion de LB ZAP-70⁺ pour une même souris, autrement dit plus les LB expriment fortement la GFP, plus ils expriment aussi ZAP-70 (Figure 43.A).

De plus, une analyse fine des profils de cytométrie montrait que les LB des souris KI ZAP-Mb1 considérés comme ZAP-70⁻, car en deca du seuil du contrôle isotypique, exprimaient toutefois des MIF pour ZAP-70 significativement supérieures à ceux des LB des souris KI ZAP, bien que faibles. Ces LB ont été dénommés KI ZAP-Mb1 « Low » (Figure 43.B).

Afin de confirmer ces données de façon plus robuste au niveau nucléaire, les LB spléniques des souris KI ZAP et les LyGFP^{Low} et LyGFP^{High} des souris KI ZAP-Mb1 ont été triées par cytométrie en flux. Les ARN totaux ont ensuite été extraits puis les transcrits de *Zap-70* ont été amplifiés dans chaque groupe par RT-qPCR et les valeurs comparées entre elles après normalisation sur les gènes de ménage HPRT1 et GAPDH. Là encore, il existait une surexpression significative de *Zap-70* à la fois dans les LyGFP^{High} mais aussi dans les LyGFP^{Low} comparativement aux LB KI ZAP (Figure 43.C).

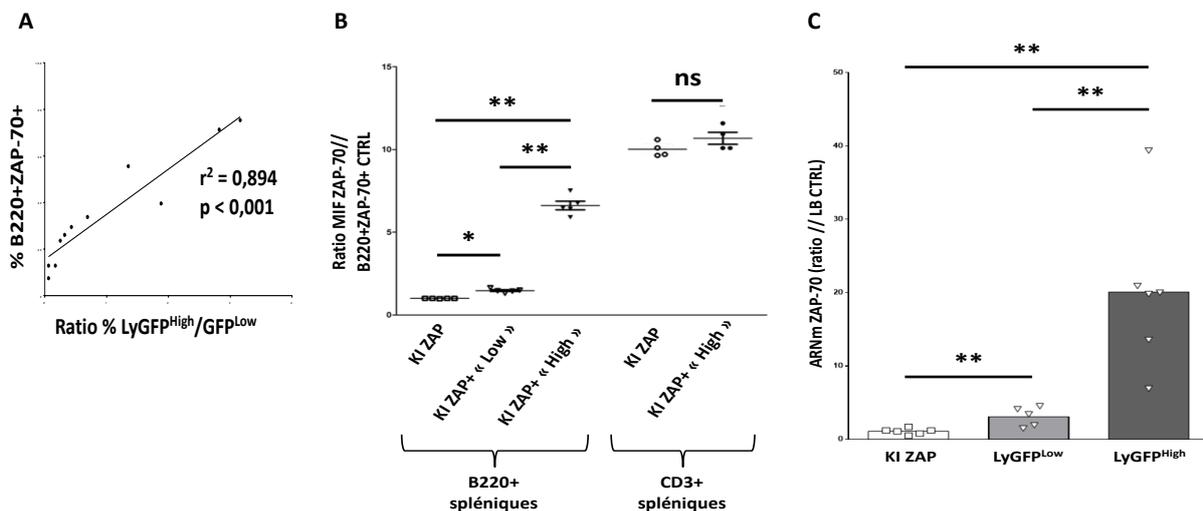


Figure 43. Comparaisons des expressions de GFP et de ZAP-70 selon différentes techniques.

- A) Corrélation entre le niveau d'expression de la GFP par les LB et le pourcentage de LB ZAP-70⁺
 B) MIF de ZAP-70 des LB KI ZAP-Mb1 considérés comme ZAP-70⁻ par rapport au contrôle isotypique, des LB KI ZAP-Mb1 ZAP-70⁺ et des LT, normalisés sur la moyenne des MIF des LB KI ZAP
 C) Ratio des niveaux d'expression des transcrits de *Zap-70* des LyGFP^{Low} et LyGFP^{High} par rapport à l'expression dans les LB ZAP KI (gènes de ménage : HPRT1 et GAPDH)
 Corrélation : test de Spearman ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (test de Mann-Whitney)

Au total : notre modèle est valide :

- **Expression de GFP corrélée à celle de ZAP-70**
- **Expression spécifique dans les LB dès le stade proB**
- **Surexpression au niveau des transcrits et protéique par rapport aux CTRL**
- **Avec 2 intensités d'expression de ZAP-70/GFP (LyGFP^{Low} et LyGFP^{High}), en proportions variables selon les souris très probablement imputable à la construction génique**

3. IMMUNOPHENOTYPAGE DES ORGANES LYMPHOÏDES A L'ETAT BASAL

Les organes lymphoïdes primaires (MO) et secondaires (rate et GG) ont été prélevés chez des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 âges de 4 mois, et des lavages péritonéaux au PBE ont été réalisés dans le même temps.

Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux après marquage avec différentes combinaisons d'anticorps, afin de déterminer les proportions des différentes sous-populations lymphocytaires B. Un récapitulatif est proposé en fin de chapitre dans le tableau 16.

Compte-tenu de la corrélation entre l'expression de la GFP et de celle de ZAP-70, de la complexité et du manque de sensibilité du marquage intracellulaire de ZAP-70 comme détaillé précédemment, l'ensemble des analyses phénotypiques ont été réalisées en utilisant la GFP comme rapporteur de l'expression de ZAP-70.

D'autre part, étant donné les 2 profils d'expression observés de la GFP (et donc de ZAP-70) ces analyses ont été faites en comparant les LB des souris contrôles (KI ZAP) à la totalité des LB des souris KI ZAP-Mb1 exprimant la GFP (Total GFP) mais aussi aux sous-groupes LyGFP^{Low} et LyGFP^{High} afin d'identifier de potentielles différences phénotypiques en lien avec une faible ou forte expression de ZAP-70. Le nombre de cellules dans la MO et les ganglions étant variable selon la technique de prélèvement, les valeurs absolues seront uniquement précisées pour les rates.

A) SPLENOCYTES ET LB SPLENIQUES TOTAUX

Il n'existait pas de différences, en termes de nombre de splénocytes totaux et de cellules B220⁺, entre les souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 (Figure 44.A).

De plus, le niveau d'expression de la GFP (pourcentage LyGFP^{High} par rapport aux LyGFP Totale) n'était pas corrélé aux nombres de splénocytes totaux ou de cellules B220⁺ (Figure 44.B et C).

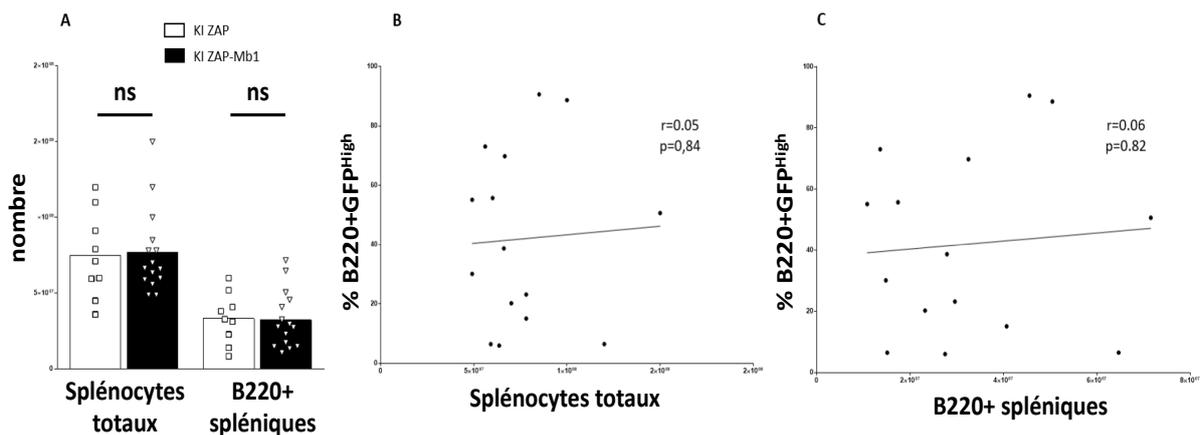


Figure 44. Nombre de splénocytes totaux et de B220⁺ spléniques et corrélation avec la proportion de LyGFP^{High}

Corrélation : test de Spearman ; ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

B) ORGANES LYMPHOÏDES PRIMAIRES : MOELLE OSSEUSE

(1) IMMUNOPHENOTYPAGE

Les proB, préB, immatures, matures/recirculating ainsi que les plasmablastes et les plasmocytes ont été identifiées selon les fenêtres de marquages membranaires détaillées en Figure 45 (A et C). Il n'existait aucune différence significative dans la répartition des proB, préB, immatures et matures/recirculating entre les souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1, ni entre les LyGFP^{Low} et LyGFP^{High} (Figure 45.C). De même, il n'existait pas de différences significatives entre les 2 groupes de souris concernant les proportions de plasmablastes ($p = 0,1$) et de plasmocytes ($p = 0,09$) (Figure 45.D).

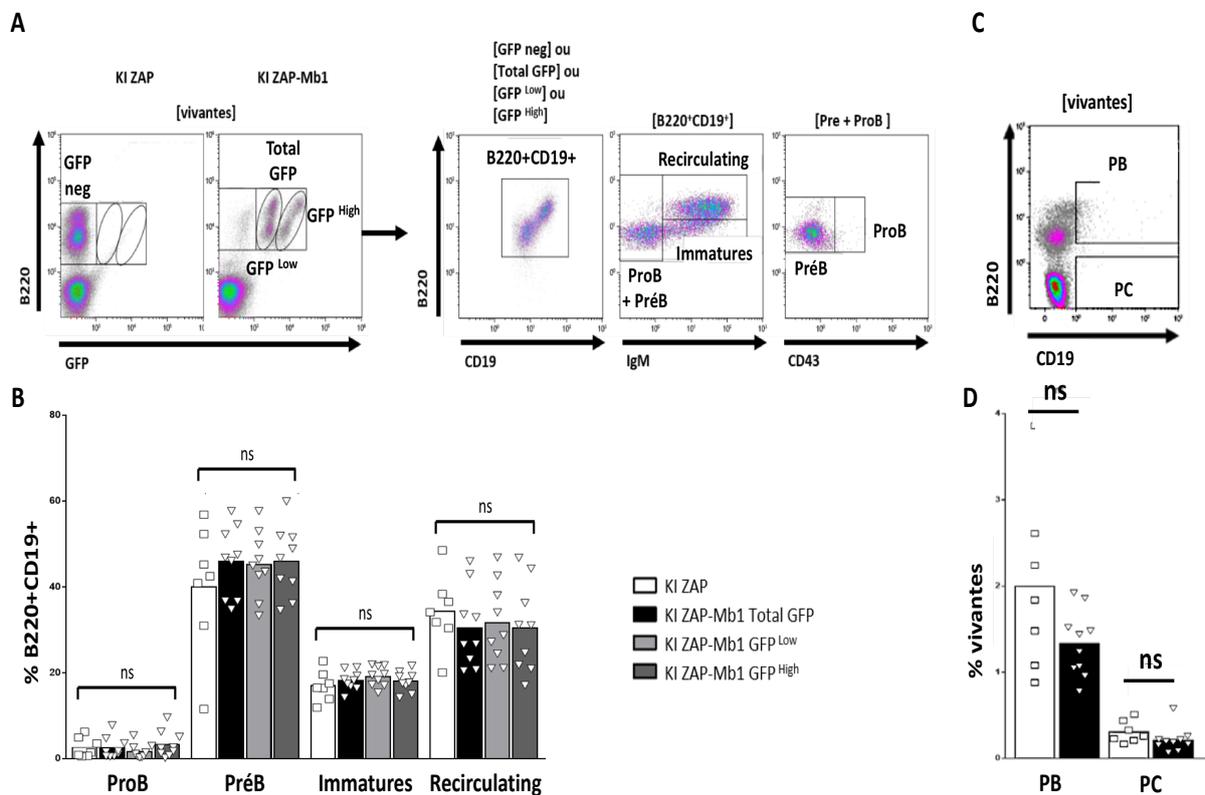


Figure 45. Immunophénotypage médullaire par cytométrie en flux.

A et C) Stratégies de fenêtrage des différentes sous-populations B

B et D) Comparaison de la répartition des différentes sous-populations B entre les souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 selon l'expression de la GFP dans ces dernières

ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

ZAP-70 étant impliqué dans la signalisation du pré-BCR chez la souris, nous avons recherché si l'expression précoce de ZAP-70 et/ou son niveau d'expression conférait une altération de la sélection des progéniteurs médullaires.

Cette sélection se faisant en partie par l'apoptose des progéniteurs non sélectionnés (Goodnow et al., 2005; Lu and Osmond, 2000), celle-ci a été évaluée sur ces cellules par le marquage annexineV couplé au marqueur de nécrose cellulaire DRAQ7, permettant de définir 5 sous-groupes cellulaires : i) vivantes : annexineV⁻DRAQ7⁻; ii) apoptose précoce : annexineV⁺DRAQ7⁻; iii) apoptose tardive : annexineV⁺DRAQ7^{Low}; iv) nécrose précoce : annexineV⁻DRAQ7^{Low} et v) nécrose globale : annexineV⁺DRAQ7^{High} (Figure 46. A et B, partie de droite).

La nécrose cellulaire s'accompagnant d'une perméabilisation de la membrane cellulaire entraînant une diminution voire une abolition du signal de la fluorescence de la GFP, il n'était pas possible de comparer les LB KI ZAP (GFP⁻) et les LB KI ZAP-Mb1 (GFP⁺).

Ainsi, afin d'avoir des populations homogènes et comparables, seule l'analyse de l'apoptose précoce a été retenue, en comparant la totalité des B220⁺CD19⁺ entre les 2 groupes de souris (Figure 46.C), puis en comparant les LyGFP^{Low} au LyGFP^{High} (Figure 46.D).

Premièrement, il n'était pas observé de différences d'apoptose spontanée précoce entre les sous-populations correspondantes des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 (proB, préB, immatures et matures/recirculating) (Figure 46.C).

Au sein des souris KI ZAP, les préB et les immatures étaient significativement enrichies en cellules apoptotiques comparativement aux proB. Ceci était attendu car correspondant aux étapes de la sélection positive et négative médullaire (Goodnow et al., 2005; Lu and Osmond, 2000).

Par contre, ces différences d'apoptose entre les différentes sous-populations étaient réduites dans les souris KI ZAP-Mb1 (Figure 46.C).

D'autre part, les LyGFP^{High} comportaient significativement moins de cellules en apoptose au sein des proB, préB et immatures. Ceci était notamment plus marqué pour les proB, la différence diminuant progressivement au fil de la maturation de ces cellules pour atteindre des taux d'apoptose comparables entre les LyGFP^{Low} et LyGFP^{High} au stade mature/recirculant (Figure 46.D).

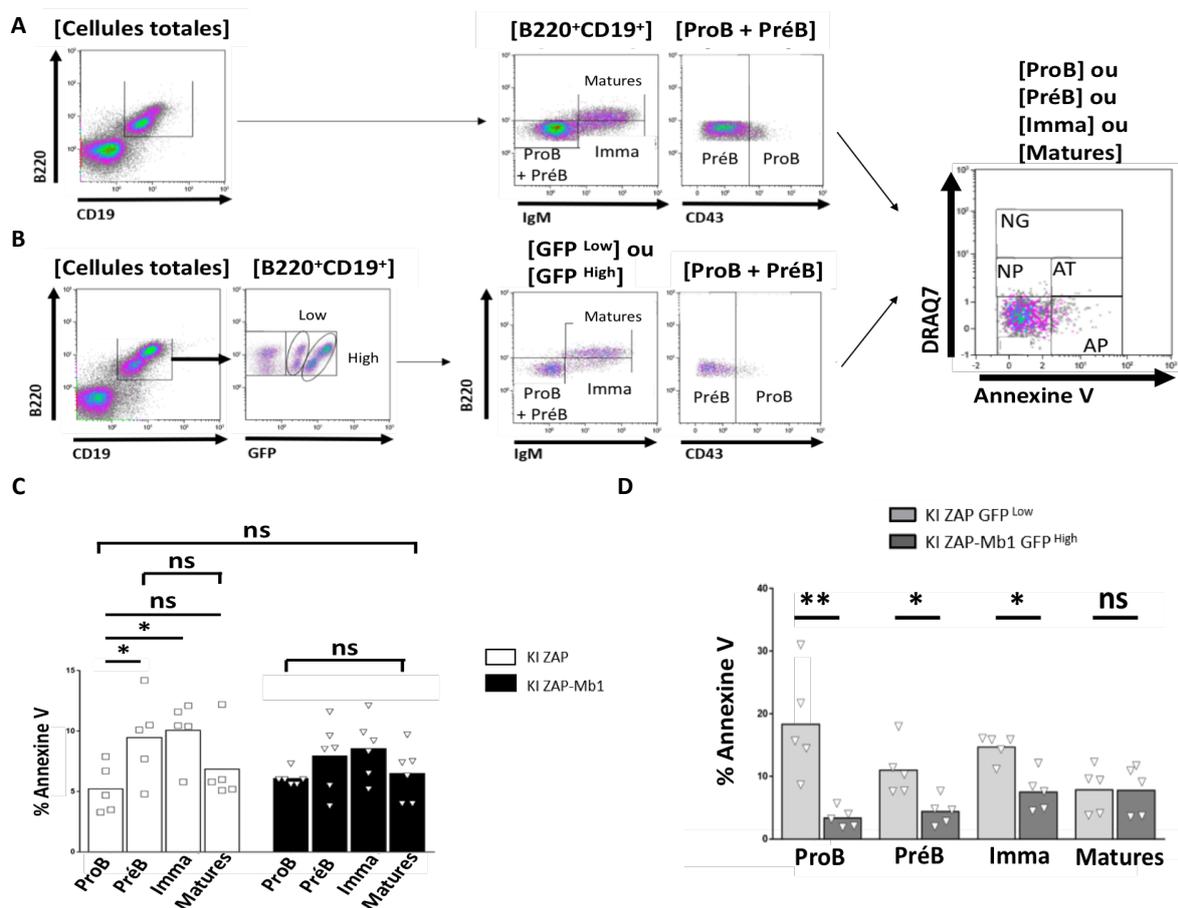


Figure 46. Évaluation de l'apoptose précoce spontanée médullaire par cytométrie en flux

A et C) Stratégie de fenêtrage des différentes sous-populations B pour analyse de l'apoptose sur les B220⁺CD19⁺ totaux

B et D) Stratégie de fenêtrage des différentes sous-populations B pour analyse de l'apoptose sur les LyGFP^{Low} et les LyGFP^{High}

Imma : immatures ; * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

C) ORGANES LYMPHOÏDES SECONDAIRES : RATE ET GANGLIONS

Les différentes populations lymphocytaires B suivantes ont été analysées : ZM (sauf pour les GGs où cette population est virtuellement absente), folliculaires, transitionnels 1-3, immatures, matures naïfs, mature switchés et LB des centres germinatifs. Les stratégies de fenêtrage de ces populations sont détaillées dans la figure 47.

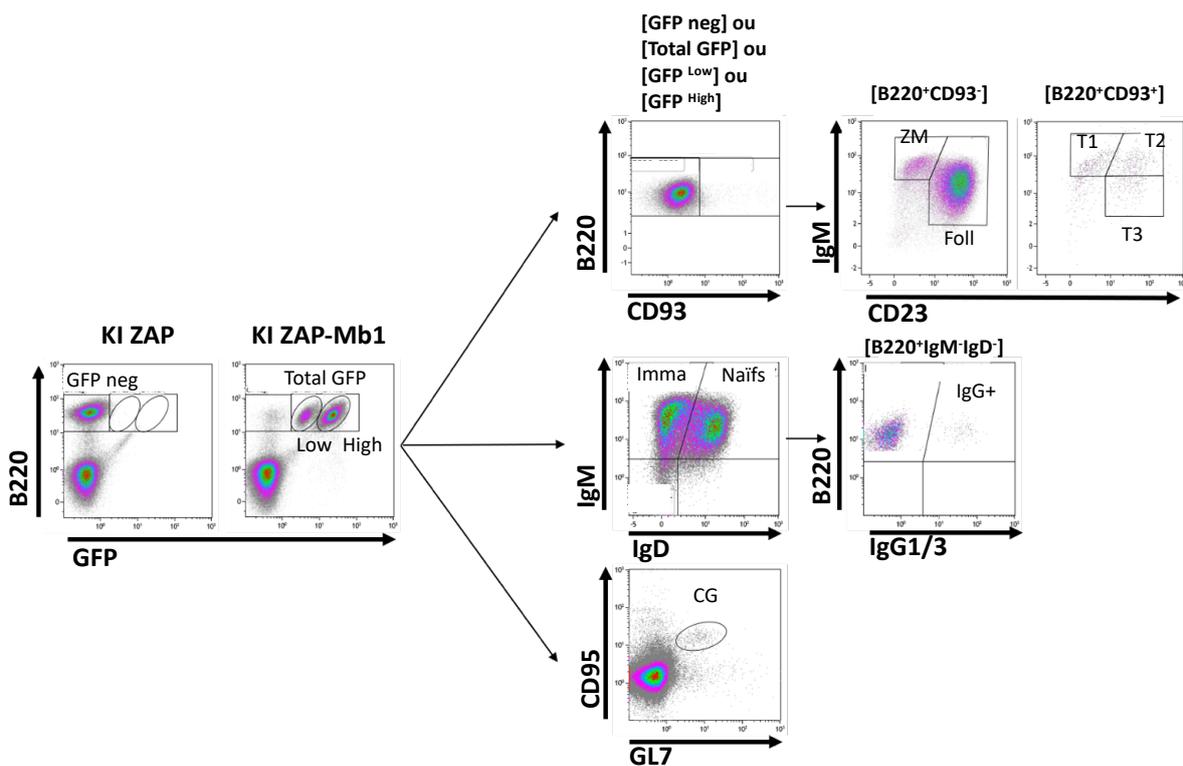


Figure 47. Stratégie de fenêtrage par cytométrie en flux des différentes sous-populations B spléniques et ganglionnaires

ZM : zone marginale ; Foll : folliculaires ; Imma : immatures ; T1/T2/T3 : transitionnels 1/2/3 ; naïfs : matures naïfs ; IgG+ : matures avec ommutation isotypique IgG+ ; CG : centre germinatif

Concernant les LB de la ZM, folliculaires et transitionnels 1-3, il n'existait pas de différences de répartition de ces populations entre les KI ZAP et KI ZAP-Mb1 GFP Totale, que cela soit en termes de pourcentages ou de valeurs absolues (Figure 48.A).

Toutefois, l'étude des sous-groupes de GFP montrait que **les LyGFP^{High} avaient un enrichissement significatif en LB de la ZM**, comparativement aux LyGFP^{Low} et aux KI ZAP, **l'inverse étant observé pour les LB de type folliculaire**, mais ceci n'était pas significatif en regard des KI ZAP (Figure 48.A, droite).

Le souris KI ZAP-Mb1 présentaient un enrichissement en LB immatures (IgM⁺IgD⁻), une réduction des fractions matures naïves (IgM⁺IgD⁺) et des matures switchées (IgM⁻IgD⁻IgG⁺). Ceci était significatif en termes de pourcentages de populations et en valeurs absolues, à l'exception des LB immatures où seule une tendance était observée ($p = 0,07$) (Figure 48.B). Il n'existait pas de différences entre les LyGFP^{Low} et les LyGFP^{High} (Figure 48.B, gauche)

Les LB des centres germinatifs étaient significativement réduits dans les souris KI ZAP-Mb1, à la fois en termes de pourcentages et de valeurs absolues (Figure 48.C). Il n'existait pas de différence entre les LyGFP^{Low} et les LyGFP^{High} (Figure 48.C, gauche).

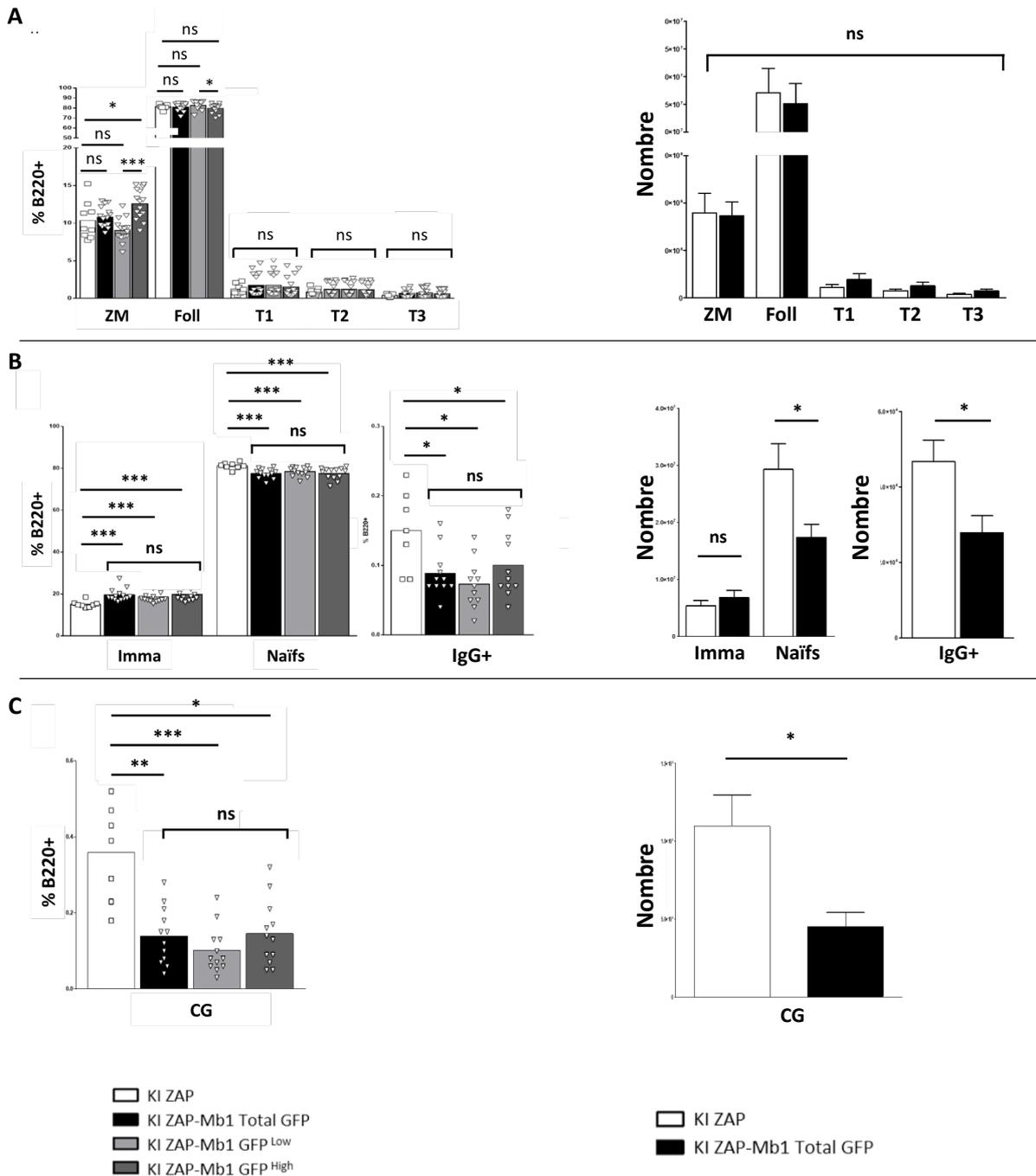


Figure 48. Immunophénotypage B splénique par cytométrie en flux des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1

ZM : zone marginale ; Foll : folliculaires ; T1-3 : transitionnels 1 à 3 ; Imma : immatures ; CG : centres germinatifs ; ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (test de Mann-Whitney)

(2) GANGLIONS

A l'inverse de la rate, il n'était observé aucune différence significative entre les souris KI ZAP et les souris KI ZAP-Mb1 pour les proportions des différentes sous-populations B étudiées : folliculaires, transitionnels 1-3, immatures, matures naïfs, mature switchés et LB des centres germinatifs (Figure 49.A).

Il n'existait pas non plus de différences entre les LyGFP^{Low} ou LyGFP^{High} à l'exception d'une diminution de la proportion de LB des centres germinatifs au sein des LyGFP^{Low} comparativement aux LyGFP^{High} (p=0,01) (Figure 49.B)

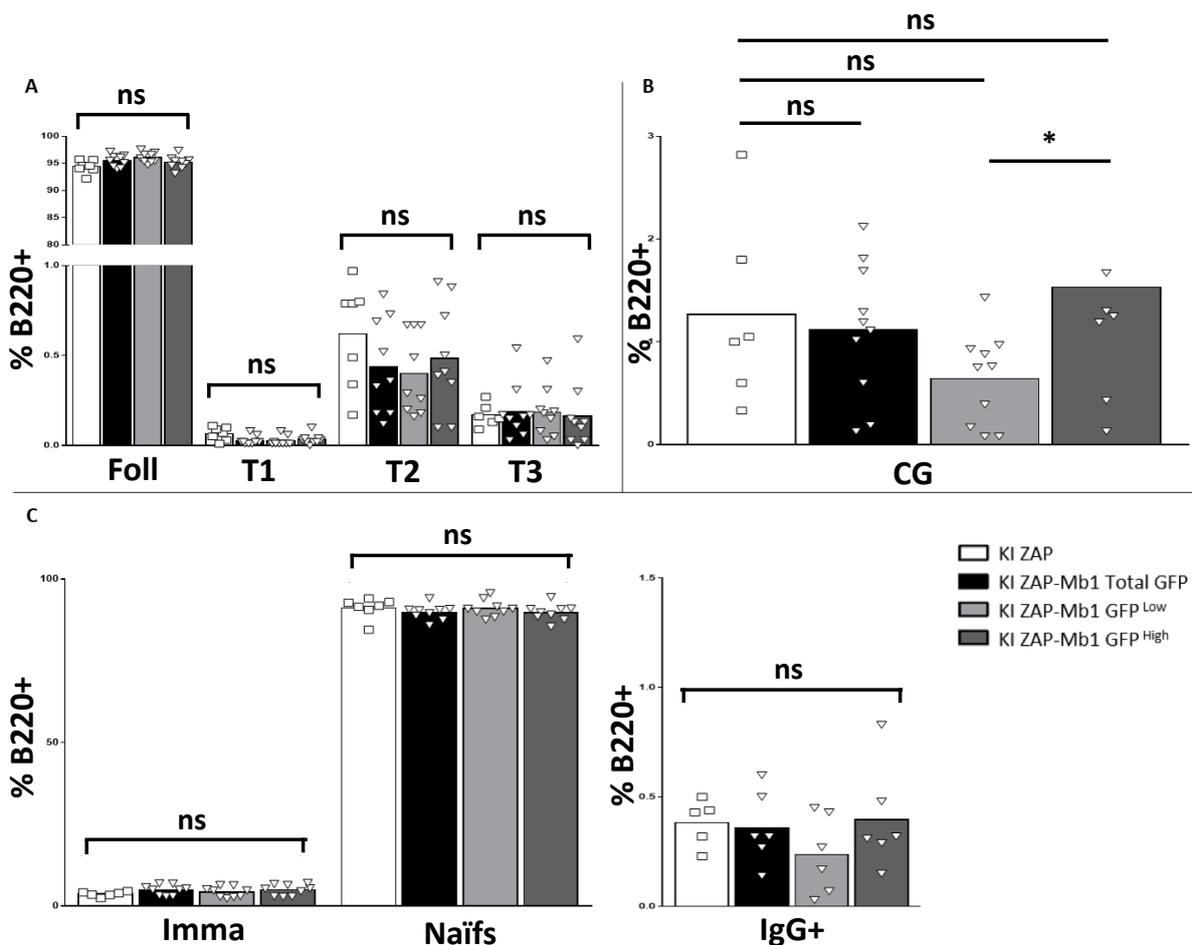


Figure 49. Immunophénotypage B ganglionnaire par cytométrie en flux des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1

Foll : folliculaires ; T1-3 : transitionnels 1 à 3 ; Imma : immatures ; CG : centres germinatifs ; ns : non significatif ; * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 (test de Mann-Whitney)

D) LAVAGES PERITONEAUX

Ils ont permis l'étude des sous-populations B1a, B1b et B2, dont le péritoine est le principal réservoir de ces cellules chez la souris. La stratégie de fenêtrage de ces populations est détaillée en figure 50.A.

Comparativement aux souris KI ZAP, les souris KI ZAP-Mb1 présentait une **réduction significative de la proportion de B1a**, une tendance à la réduction pour les B1b, et au contraire une **augmentation significative des B2**. Il n'existait pas de différences entre les LyGFP^{Low} et les LyGFP^{High} (Figure 50.B)

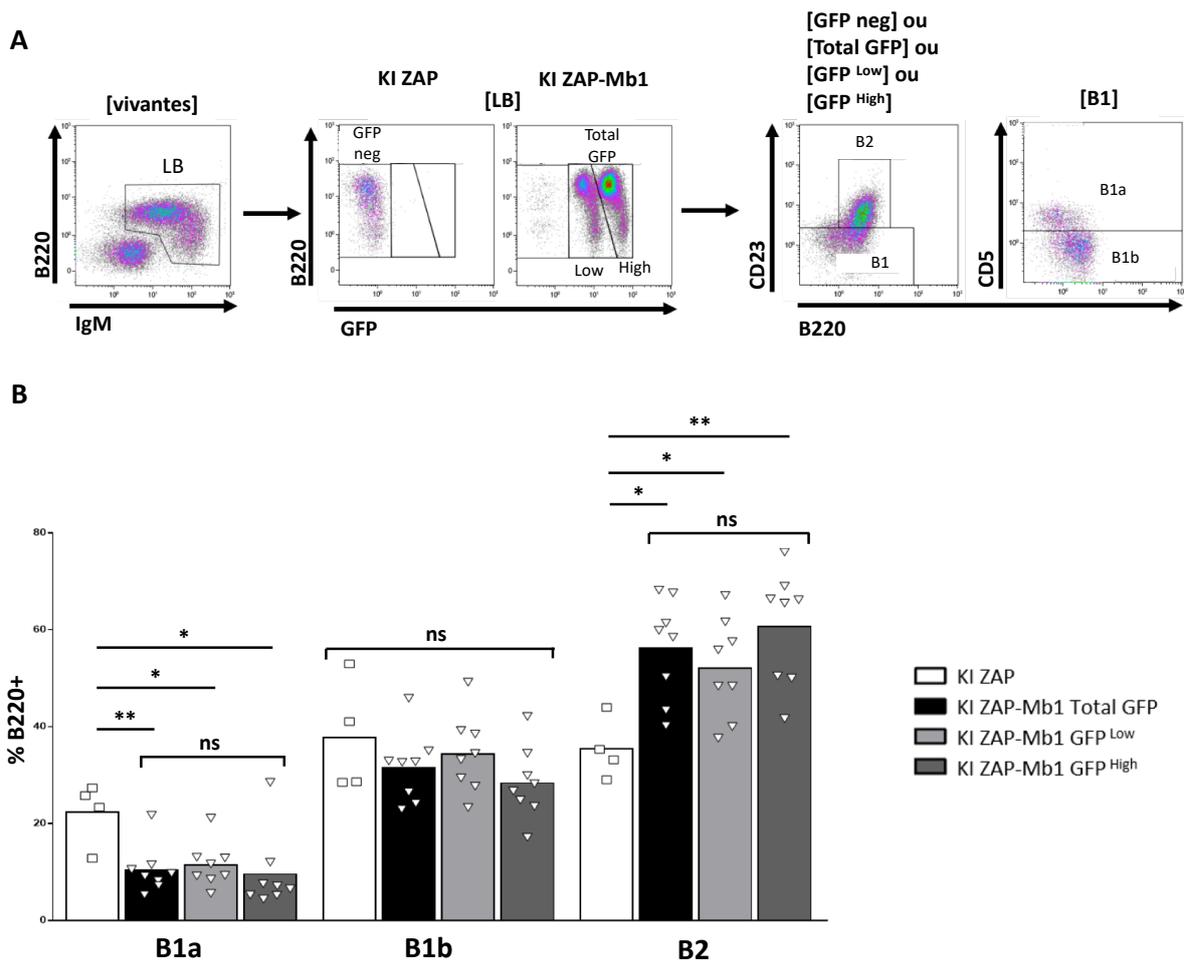


Figure 50. Immunophénotypage péritonéal par cytométrie en flux.

A) Stratégie de fenêtrage des différentes sous-populations B

B) Comparaison de la répartition des différentes sous-populations B entre les souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 selon l'expression de la GFP dans ces dernières

LB : lymphocytes B ; ns : non significatif ; * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 (test de Mann-Whitney)

Au total, l'expression de ZAP-70 dans les LB induits les phénomènes suivants :

- **Enrichissement en LB immatures**
- **Réduction des LB matures naïfs, matures switchés et des LB des centres germinatifs**
- **Réduction des LB1a et enrichissement en LB2 péritonéaux**
- **Réduction de l'apoptose des progéniteurs médullaires (LyGFP^{High})**
- **Enrichissement en LB de la ZM aux dépends des LB folliculaires (LyGFP^{High})**

E) ANALYSE SELON L'INTENSITE D'EXPRESSION GLOBALE DE LA GFP

Au total, au sein des souris KI ZAP-Mb1, le niveau d'expression de ZAP-70 semble avoir un effet phénotypique.

En effet, il existe des **différences significatives** entre les **LyGFP^{Low}** et les **LyGFP^{High}**, notamment une **réduction de l'apoptose des progéniteurs médullaires et un enrichissement en LB de la ZM dans les LyGFP^{High}**, différences perdues statistiquement lorsque l'on regarde les LyGFP Totale.

Les deux populations co-existants au sein de chaque souris en proportion variables, il était aussi important d'analyser l'impact phénotypique de l'intensité d'expression de ZAP-70 sur l'ensemble des LB. Pour cela, une analyse complémentaire de l'ensemble du phénotypage précédent a été effectuée en séparant les souris KI ZAP-Mb1 selon leur proportion de LB exprimant fortement la GFP et donc ZAP-70.

Ainsi, nous avons distingué au sein des souris KI ZAP-Mb1, les souris ZAP^{Low} (LyGFP^{High} ≤ 50 % des LB Total GFP) nommées **SoZAP^{Low}** et les souris ZAP^{High} (LyGFP^{High} > 50 % des LB Total GFP), nommées **SoZAP^{High}**.

Le tableau 17 récapitule les différentes sous-populations lymphocytaires B par organe et selon le profil d'expression de ZAP.

Ainsi, **l'enrichissement en LB immatures (IgM⁺IgD⁻) et la réduction de la fraction matures naïves (IgM⁺IgD⁺)** étaient observées à la fois dans les SoZAP^{Low} et SoZAP^{High}, mais plus **de façon plus marquée dans les SoZAP^{Low}**, notamment pour les matures naïves.

A l'inverse, les SoZAP^{High} présentaient une réduction significativement plus importante à la fois des LB matures switchés et des LB des centres germinatifs comparativement aux SoZAP^{Low} et aux KI ZAP.

De même, **seules les SoZAP^{High} présentaient une altération phénotypique significative des B péritonéaux** avec baisse des B1a et augmentation des B2.

Les souris KI ZAP, KI ZAP-Mb1, SoZAP^{Low} et SoZAP^{High} étaient par contre comparables pour le nombre de splénocytes, de LB totaux, et dans la répartition des LB en ZM, folliculaires ou transitionnels. De même, il n'a pas été observé de différences dans les phénotypes ganglionnaires et médullaires entre ces groupes.

Tableau 17. Synthèse de l'analyse par cytométrie en flux des différentes populations lymphocytaires B selon les organes dans les différents groupes de souris : KI ZAP, KI ZAP-Mb1 et au sein de ces dernières les sous-groupes SoZAP^{Low} et SoZAP^{High}

LB : lymphocytes B ; ZM : zone marginale ; Foll : folliculaires ; T1/T2/T3 : transitionnels 1-3 ; CG : centres germinatifs ; GGs : ganglions ; PB : plasmablastes ; PC : plasmocytes ; ns : non significatif (> 0,05) (test de Mann-Whitney)

MO	KI ZAP n = 7	KI ZAP-Mb1 n = 9	p	KI ZAP-Mb1 ZAP High n = 3	p	KI ZAP-Mb1 ZAP Low n = 6	p	p High vs Low
ProB	2,6 % ± 2,5 %	2,5 % ± 2,5 %	ns	2,5 % ± 0,4 %	ns	2,5 % ± 3,1 %	ns	ns
PréB	40,1 % ± 15,3 %	45,9 % ± 7,5 %	ns	45,5 % ± 10,9 %	ns	46,1 % ± 8,1 %	ns	ns
Immatures	17 % ± 3 %	18,2 % ± 2,3 %	ns	17,3 % ± 0,8 %	ns	18,6 % ± 2,2 %	ns	ns
Matures	34,2 % ± 9,3 %	30,4 % ± 9,1 %	ns	32,2 % ± 15,7 %	ns	29,52 % ± 9,1 %	ns	ns
PB	2,1 % ± 1 %	1,3 % ± 0,4 %	ns	1 % ± 0,3 %	ns	1,5 % ± 0,4 %	ns	ns
PC	0,3 % ± 0,1 %	0,2 % ± 0,1 %	ns (0,09)	0,1 % ± 0,07 %	ns (0,08)	0,2 % ± 0,1 %	ns	ns

Rate	KI ZAP n = 9	KI ZAP-Mb1 n = 15	p	KI ZAP-Mb1 ZAP High n = 7	p	KI ZAP-Mb1 ZAP Low n = 8	p	p High vs Low
Splénocytes totaux	74,6.10 ⁶ ± 29,7.10 ⁶	76,7.10 ⁶ ± 26,1.10 ⁶	ns	80,9.10 ⁶ ± 19,4.10 ⁶	ns	72,9.10 ⁶ ± 10,3.10 ⁶	ns	ns
LB totaux	42,4 % ± 9,4 % 33,4.10 ⁶ ± 17,9.10 ⁶	39,6 % ± 10,1 % 32,4.10 ⁶ ± 16,9.10 ⁶	ns	39,4 % ± 14,5 % 34,6.10 ⁶ ± 17.10 ⁶	ns	39,8 % ± 9 % 30,4.10 ⁶ ± 9.10 ⁶	ns	ns
ZM	10,4 % ± 2,5 % 3,6.10 ⁶ ± 2,7.10 ⁶	10,8 % ± 1,4 % 3,4.10 ⁶ ± 2,2.10 ⁶	ns	11 % ± 1,6 % 3,9.10 ⁶ ± 2,1.10 ⁶	ns	10,6 % ± 1,3 % 3,1.10 ⁶ ± 1,2.10 ⁶	ns	ns
Foll	81,5 % ± 2,4 % 27.10 ⁶ ± 14,2.10 ⁶	81 % ± 3,8 % 24,3.10 ⁶ ± 12,7.10 ⁶	ns	80,7 % ± 3,8 % 26,7.10 ⁶ ± 13,1.10 ⁶	ns	81,2 % ± 4,5 % 23,7.10 ⁶ ± 6,1.10 ⁶	ns	ns
T1	1,2 % ± 0,5 % 0,44.10 ⁶ ± 0,36.10 ⁶	1,7 % ± 1,4 % 0,7.10 ⁶ ± 0,9.10 ⁶	ns	2 % ± 1,1 % 0,9.10 ⁶ ± 0,7.10 ⁶	ns	1,4 % ± 1,3 % 0,6.10 ⁶ ± 0,6.10 ⁶	ns	ns
T2	0,8 % ± 0,3 % 0,29.10 ⁶ ± 0,21.10 ⁶	1,2 % ± 0,8 % 0,46.10 ⁶ ± 0,49.10 ⁶	ns	1,3 % ± 0,9 % 0,61.10 ⁶ ± 0,5.10 ⁶	ns	1,1 % ± 0,7 % 0,42.10 ⁶ ± 0,3.10 ⁶	ns	ns
T3	0,4 % ± 0,2 % 0,14.10 ⁶ ± 0,13.10 ⁶	0,7 % ± 0,4 % 0,27.10 ⁶ ± 0,27.10 ⁶	ns	0,7 % ± 0,5 % 0,33.10 ⁶ ± 0,28.10 ⁶	ns	0,6 % ± 0,4 % 0,26.10 ⁶ ± 0,17.10 ⁶	ns	ns
Immatures	15,1 % ± 1,7 % 5,1.10 ⁶ ± 3.10 ⁶	19,5 % ± 3 % 6,1.10 ⁶ ± 3,6.10 ⁶	< 0,001 ns	18,3 % ± 0,9 % 4,9.10 ⁶ ± 3.10 ⁶	0,004 ns	20,6 % ± 3,6 % 7,2.10 ⁶ ± 5,3.10 ⁶	0,002 ns	ns 0,03
Matures naïfs	81,2 % ± 1,6 % 29,3.10 ⁶ ± 13,6.10 ⁶	77,6 % ± 2,3 % 19,2.10 ⁶ ± 9,8.10 ⁶	< 0,001 0,05	78,8 % ± 1,2 % 22.10 ⁶ ± 13,5.10 ⁶	0,01 ns	74,6 % ± 4,6 % 16,7.10 ⁶ ± 4,2.10 ⁶	0,0006 0,02	ns ns
Matures switchés	0,15 % ± 0,06 % (n=7) 4,7.10 ⁴ ± 1,5.10 ⁴	0,09 % ± 0,04 % (n=12) 2,8.10 ⁴ ± 1,5.10 ⁴	0,02 0,04	0,07 % ± 0,005 % 2,2.10 ⁴ ± 1,4.10 ⁴	0,006 0,007	0,11 % ± 0,03 % 3,4.10 ⁴ ± 1,7.10 ⁴	ns ns	ns ns
CG	0,36 % ± 0,13 % (n=7) 11.10 ⁴ ± 5,4.10 ⁴	0,15 % ± 0,08 % (n=12) 4,5.10 ⁴ ± 3,4.10 ⁴	0,003 0,02	0,12 % ± 0,06 % 3,6.10 ⁴ ± 2,5.10 ⁴	0,003 0,02	0,17 % ± 0,08 % 5,5.10 ⁴ ± 4,4.10 ⁴	0,003 ns	0,04 ns

GGs	KI ZAP n = 7	KI ZAP-Mb1 n = 10	p	KI ZAP-Mb1 ZAP High n = 4	p	KI ZAP-Mb1 ZAP Low n = 6	p	p High vs Low
Foll	94,4 % ± 1,1 %	95,1 % ± 1,5 %	ns	95,2 % ± 1,6 %	ns	95,7 % ± 1,1 %	ns	ns
T1	0,06 % ± 0,04 %	0,04 % ± 0,04 %	ns	0,03 % ± 0,01 %	ns	0,03 % ± 0,03 %	ns	ns
T2	0,6 % ± 0,3 %	0,6 % ± 0,5 %	ns	0,4 % ± 0,4 %	ns	0,5 % ± 0,3 %	ns	ns
T3	0,2 % ± 0,07 %	0,3 % ± 0,3 %	ns	0,2 % ± 0,3 %	ns	0,2 % ± 0,08 %	ns	ns
Immatures	3,7 % ± 0,5 %	4,9 % ± 1,6 %	ns	4,6 % ± 2,3 %	ns	5,2 % ± 1,5 %	ns	ns
Matures naïfs	91,2 % ± 3,2 %	89,4 % ± 2,5 %	ns	91,1 % ± 2,7 %	ns	88,8 % ± 2,3 %	ns	ns
Matures switchés	0,39 % ± 0,12 % (n=6)	0,36 % ± 0,16 % (n=6)	ns	0,24 % ± 0,09 %	ns	0,47 % ± 0,07 %	ns	ns
GC	1,3 % ± 0,9 % (n=6)	1,1 % ± 0,7 % (n=10)	ns	1,3 % ± 0,8 %	ns	1 % ± 0,6 %	ns	ns

Péritoine	KI ZAP n = 4	KI ZAP-Mb1 n = 8	p	KI ZAP-Mb1 ZAP High n = 5	p	KI ZAP-Mb1 ZAP Low n = 3	p	p High vs Low
B1a	22,3 % ± 2 %	10,4 % ± 2,1 %	0,008	8,8 % ± 2,9 %	0,02	13 % ± 0,7 %	ns	ns
B1b	37,8 % ± 7,2 %	31,6 % ± 7,9 %	ns	32,8 % ± 8,9 %	ns	29,5 % ± 7 %	ns	ns
B2	35,4 % ± 7,5 %	56,2 % ± 9 %	0,02	56,6 % ± 10,9 %	0,03	55,4 % ± 6,5 %	ns	ns

Pour toute la suite des analyses, afin d'étudier l'impact du niveau d'expression de ZAP-70 *in vivo* dans l'ensemble des LB, nous avons comparé aux souris contrôles KI ZAP, l'ensemble des souris KI ZAP-Mb1 (SoZAP^{Low} et SoZAP^{High} incluses), mais aussi indépendamment les SoZAP^{Low} et les SoZAP^{High}.

4. PRODUCTION D'AC, AUTO-IMMUNITE ET LYMPHOPROLIFERATION A L'ETAT BASAL

Afin d'étudier les potentielles conséquences phénotypiques de la surexpression de ZAP-70 dans les LB *in vivo*, nous avons laissé vieillir naturellement au sein de notre animalerie des souris KI ZAP-MB1 et contrôles KI ZAP. Les souris ont été sacrifiées à des âges différents (M12, M14, M16, M18 et maximum M20).

Durant toute la durée d'observation, il n'a pas été constaté d'altération particulière du comportement ou de l'état de santé global des souris KI ZAP-Mb1 comparativement aux souris KI ZAP.

A) TAUX DES IMMUNOGLOBULINES SERIQUES

Dans le but d'évaluer si la surexpression de ZAP-70 dans les LB induit une modification de la production des anticorps à l'état basal, nous avons dosé les immunoglobulines (IgM et IgG totales) dans le sérum de ces souris par ELISA, à 4 mois (jeune adulte), puis à M14 (adulte mature).

(1) IGG TOTALES

Comparativement aux souris KI ZAP, il existait une réduction significative des IgG totales sériques dans l'ensemble des souris KI ZAP-Mb1 à principalement à M4 et dans une moindre mesure à M14.

Cette réduction était globalement homogène dans les SoZAP^{Low} et les SoZAP^{High} à M4 alors que seules les SoZAP^{High} présentaient une hypo-IgG significative à M14 (Figure 51.A).

(2) IGM TOTALES

A l'inverse des IgG totales, les taux d'IgM totales sériques étaient comparables à M4 entre les souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1, mais aussi entre les SoZAP^{Low} et les SoZAP^{High}.

Par contre, à M14, il était observé une réduction significative des taux des IgM sériques dans les souris KI ZAP-Mb1 qui là encore, était le reflet des SoZAP^{High} car seules ces dernières présentaient une hypo-IgM significative comparativement aux KI ZAP (Figure 51.B).

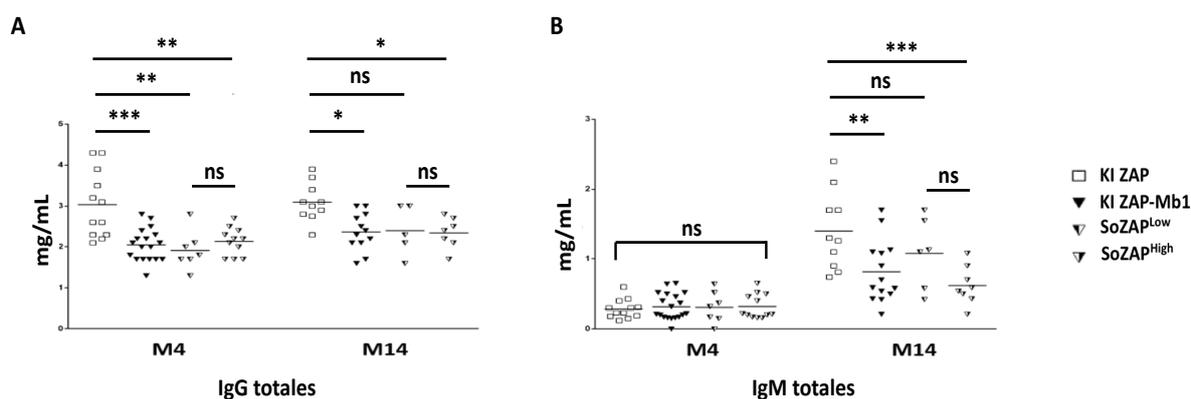


Figure 51. Taux d'IgG (A) et d'IgM (B) totales sériques par ELISA des souris KI ZAP, de l'ensemble des souris KI ZAP-Mb1 et des sous-groupes SoZAP^{Low} et SoZAP^{High} selon l'âge.

B) AUTO-IMMUNITE SPONTANEE

Étant donné que l'expression de ZAP-70 est associée à une hypersignalisation du BCR dans les LB LLC et que, de manière générale dans les LB, il est démontré qu'un défaut de régulation négative du BCR est corrélé à la survenue de manifestations auto-immunes (Nitschke, 2009; Pritchard and Smith, 2003; Schickel et al., 2012), il était intéressant d'étudier si la surexpression précoce de ZAP-70 dans des LB non tumoraux chez notre modèle murin KI ZAP-Mb1 pourrait favoriser une rupture de tolérance à l'état basal.

(1) ACTIVITE FACTEUR RHUMATOÏDE ET ANTI-ADN

Ainsi, une première expérience a été de rechercher la présence d'auto-Ac anti-ADNdb ou avec activité facteur rhumatoïde dans le sérum des souris KI ZAP-Mb1 adultes âgées de 6 mois. Du sérum d'une souris MRL^{lpr/lpr} âgée de 16 semaines et présentant une protéinurie significative (≥ 3 croix à la bandelette) (Fu et al., 2017) a été utilisé comme contrôle positif.

Compte tenu des résultats précédents objectivant une réduction des IgG et des IgM totales sériques dans les souris KI ZAP-Mb1, notamment dans les SoZAP^{High}, nous avons normalisé pour chaque souris le titre d'Ac anti-ADNdb obtenu sur le taux d'Ig sérique totale correspondante.

Ainsi, il n'existait pas de différences entre les différents groupes de souris concernant les IgG anti-ADNdb (Figure 52.A), mais il était observé la présence de taux significativement plus importants d'IgM anti-ADNdb dans les souris KI ZAP-Mb1 comparativement aux souris KI ZAP. En regard du profil d'expression de ZAP-70, cette différence avec les souris contrôles était due uniquement aux SoZAP^{High} (Figure 52. B).

Concernant le facteur rhumatoïde, il n'existait par contre aucune différence entre les souris KI ZAP, KI ZAP-Mb1 et les sous-groupes SoZAP^{Low} et SoZAP^{High} (Figure 52.C)

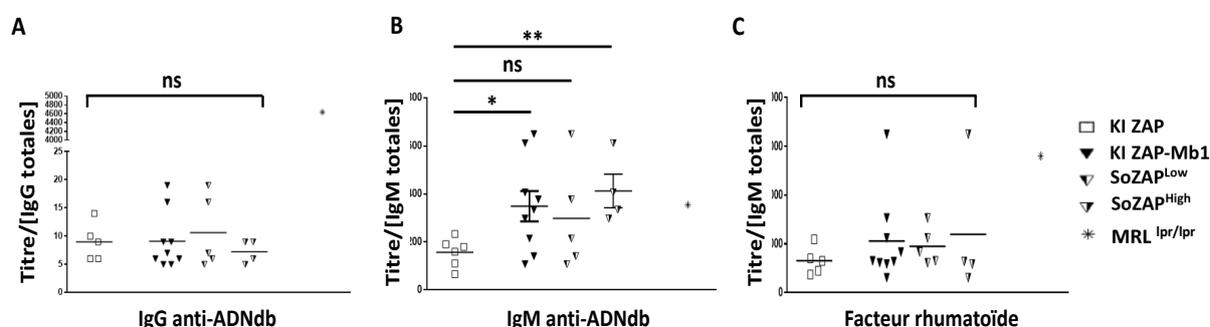


Figure 52. Taux d'IgG anti-ADNdb (A), d'IgM anti-ADNdb (B) et de facteur rhumatoïde (C) par ELISA à l'état basal dans le sérum des souris KI ZAP, de l'ensemble des souris KI ZAP-Mb1 et des sous-groupes ZAP^{Low} et ZAP^{High} âgées de 6 mois.

Du sérum d'une souris MRL^{lpr/lpr} âgée de 16 semaines avec protéinurie significative (≥ 3 croix à la bandelette urinaire) a été utilisé comme contrôle positif.

ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ (test de Mann-Whitney)

(2) EVALUATION DES AUTO-REACTIVITES SUR PANEL ANTIGENIQUE

Afin de confirmer les résultats préliminaires précédents et de tester de manière plus large et reproductibles d'éventuelles polyréactivités à l'état basal, les sérums de souris KI ZAP-MB1 et KI ZAP âgées de 10 mois ont été testés de façon simultanée envers un panel de 93 Ag par microarray. Les résultats sont détaillés dans la figure 53.

Après ajustement des densités optiques sur le bruit de fond obtenu pour chaque Ag correspondant (ratio signal/bruit de fond), un score d'auto-réactivité a été calculé pour chaque isotype pour chaque Ag testé : $\log_2(\text{signal} \times (\text{ratio signal/bruit de fond}) + 1)$. Ceci a été effectué pour les souris contrôles KI ZAP ($n = 12$), les souris KI ZAP-Mb1 ($n = 16$), mais aussi au sein de ces dernières pour les SoZAP^{Low} ($n = 7$) et les SoZAP^{High} ($n = 9$).

Une première analyse brute a constitué à comparer les scores obtenus pour chaque Ag entre les différents groupes de souris (Figure 53.A et C).

Concernant l'isotype IgG, les scores d'auto-réactivités étaient comparables entre les souris, et ce, quel que soit le niveau d'expression de ZAP-70. La seule exception (1/93) concernait l'Ag Sm pour lequel seules les SoZAP^{High} présentaient un score d'auto-réactivité significativement plus important que les souris contrôles KI ZAP ($p = 0,04$).

De même, pour l'isotype IgM, les SoZAP^{High} présentaient des scores d'auto-réactivité significativement supérieurs aux souris KI ZAP seulement pour 3 Ag parmi les 93 testés (cardiolipine : $p = 0,05$; MBP : $p = 0,02$; SP100 : $p = 0,04$).

Les scores des SoZAP^{Low} étaient comparables à ceux des souris KI ZAP pour l'ensemble des 93 Ag testés.

De la même façon que pour les ELISA anti-ADNdb et le facteur rhumatoïde, du fait de l'hypogamaglobulinémie observée dans les souris KI ZAP-Mb1, une analyse plus pertinente a été réalisée en normalisant les scores d'auto-réactivités souris sur le taux d'Ig sérique totale correspondante pour chaque Ag et pour chaque souris (Figure 53.B et D).

Ceci a permis de révéler une **auto-réactivité IgG et IgM ajustée significativement plus importante dans les SoZAP^{High}** comparativement aux KI ZAP respectivement pour 28 et 22 Ag parmi les 93 testés.

Une tendance ($0,05 < p < 0,1$) était aussi observée pour 15 et 41 autres Ag pour les isotypes IgG et IgM respectivement.

Les scores ajustés des **SoZAP^{Low}** étaient comparables à ceux des souris **KI ZAP pour l'ensemble des 93 Ag testés.**

De plus, les **SoZAP^{High}** présentaient des scores ajustés significativement supérieurs aux **SoZAP^{Low}** pour 77 Ag concernant l'isotype IgG, et pour 9 Ag concernant l'isotype IgM.

Les types d'Ag pour lesquels les scores d'auto-réactivités IgG et/ou IgM étaient significativement plus élevés dans les SoZAP^{High} étaient variés, témoignant d'une auto-réactivité globale ces souris. Toutefois, les différences les plus probantes concernaient des Ag nucléaires, tels que l'ADNdb, l'ADNsb, les histones H3/total, Np62, et PCNA.

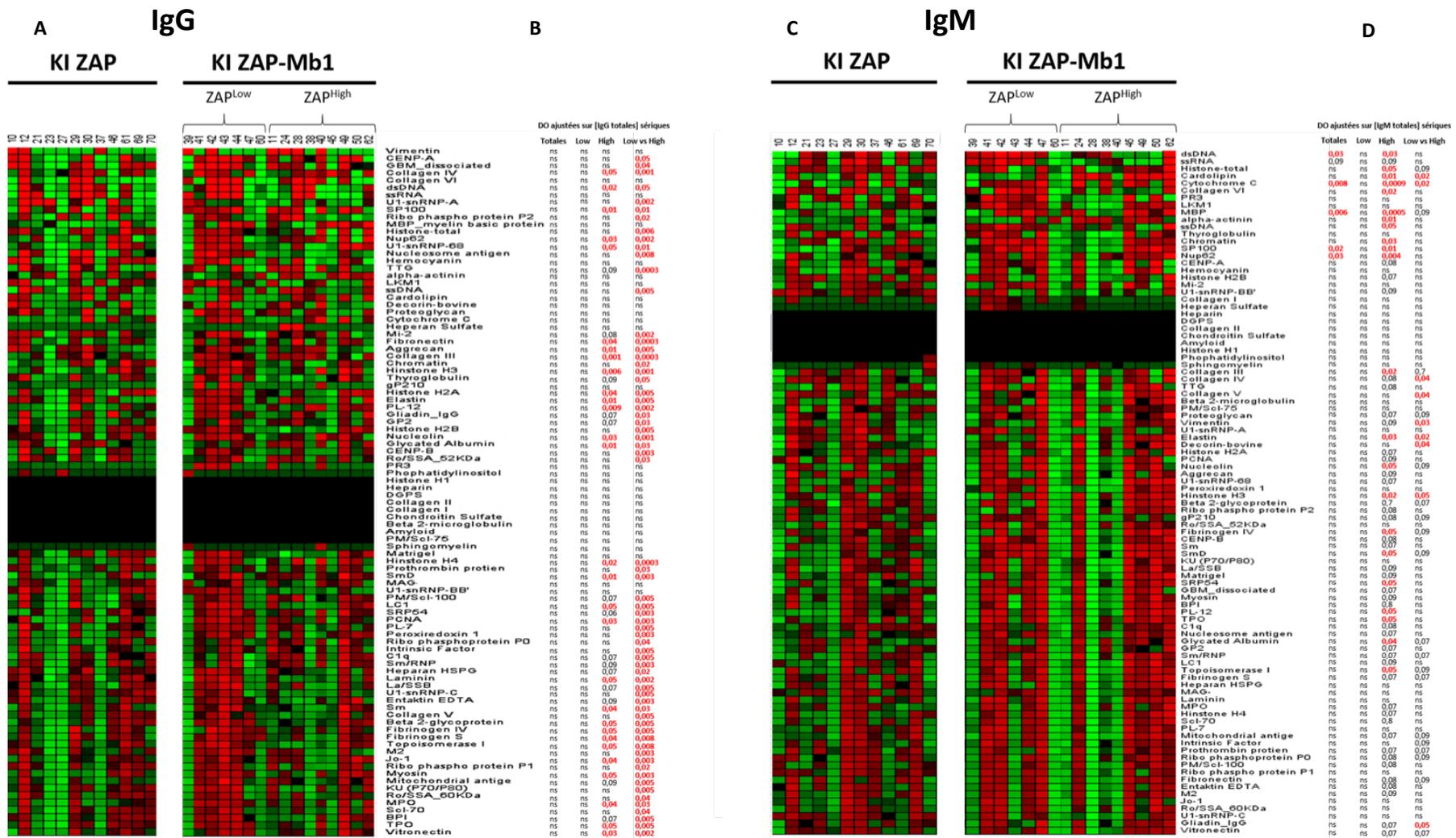


Figure 53. Autoréactivités IgG et IgM sériques envers un panel de 93 antigènes.

A et C) Heat maps des scores d'autoréactivité $[\log_2(\text{signal} \times (\text{ratio signal/bruit de fond}) + 1)]$ pour chaque antigène testé

B et D) Scores d'autoréactivités ajustés sur les taux d'Ig sériques correspondants pour chaque Ag testé. Les scores ajustés pour chaque Ag des souris contrôles KI ZAP ont été comparés à ceux des souris KI ZAP-Mb1 totales, SoZAP^{Low} et SoZAP^{High}, et les scores des SoZAP^{Low} et des SoZAP^{High} ont aussi été comparés entre eux (test de Mann-Whitney)

C) LYMPHOPROLIFERATION, CYTOPENIE(S) ET NEPHROPATHIE

Dans le but d'évaluer si la surexpression de ZAP-70 pouvait jouer un rôle dans : i) la transformation néoplasique des LB : ii) l'apparition de cytopénies et iii) l'apparition de complications systémiques notamment à type de néphropathie, il a été recherché chez les souris l'apparition respectivement : i) d'une lymphocytose périphérique, ii) de cytopénies périphériques et iii) d'une protéinurie. Pour cela, nous avons réalisé des dépistages de ces différents éléments par une NFS et une bandelette urinaire dès l'âge de 8 semaines, puis tous les 2 mois jusqu'au 18^e mois de vie pour les plus âgées.

Ainsi, sur l'ensemble de la durée d'observation, les taux de lymphocytes totaux périphériques n'étaient pas significativement différents entre les souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 (valeurs absolues et pourcentages). De même, au sein des KI ZAP-Mb1, les taux étaient comparables entre les SoZAP^{Low} et les SoZAP^{High} (Figure 54.A).

Concernant l'apparition de cytopénie(s) périphérique(s), il n'a pas non plus été observé de différences significatives en termes de taux d'hémoglobine, de taux de PNN (valeurs absolues et pourcentages) et de taux plaquettaires entre les différents groupes de souris (Figure 54.B, C et D).

Enfin, les taux de protéinuries, bien que fluctuants selon les souris et les âges, sont toujours restés bien en deca des 3 unités, seuil retenu pour une atteinte glomérulaire (Fu et al., 2017) et surtout, les taux étaient comparables entre les différents groupes de souris (Figure 54.E)

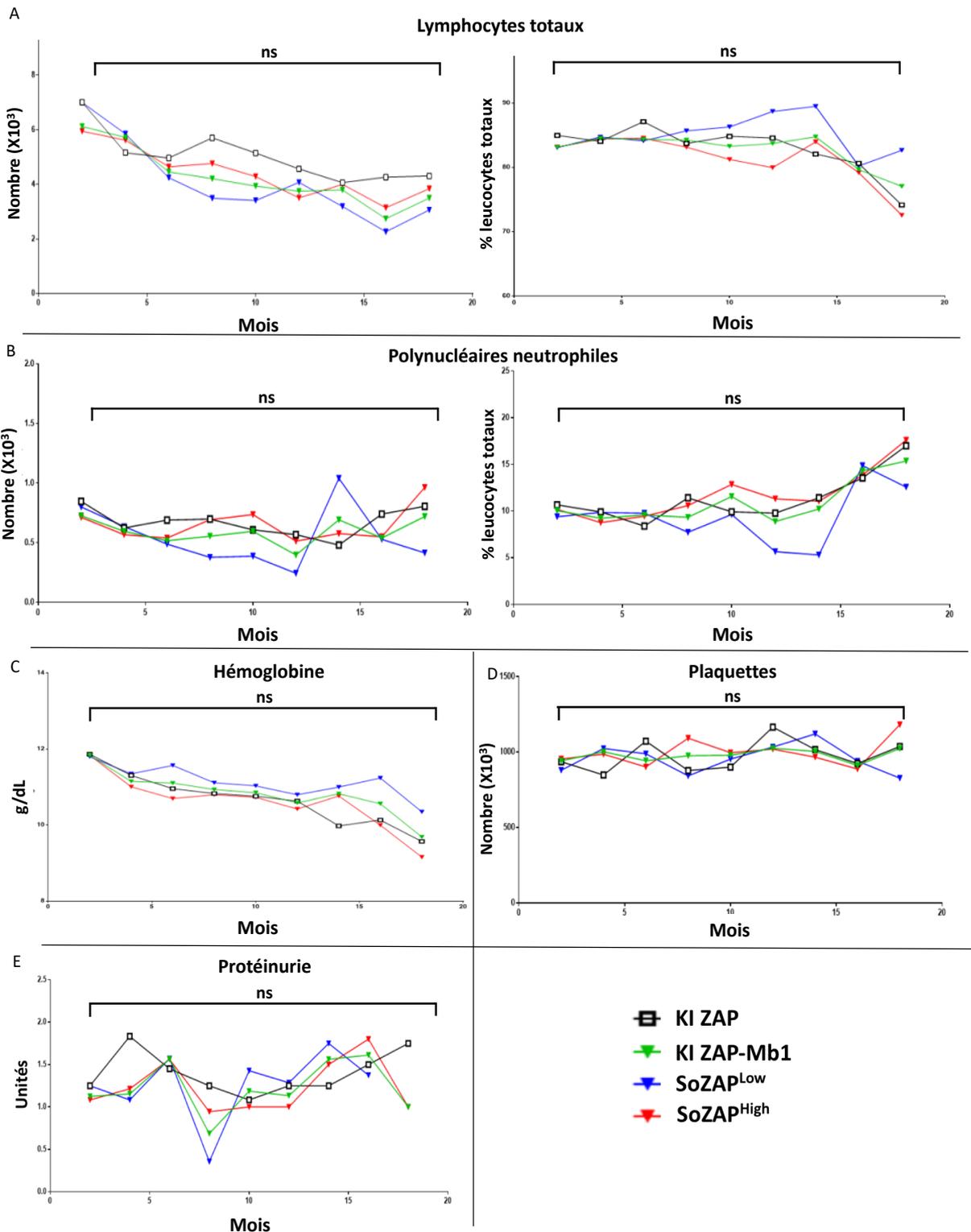


Figure 54. Évolution des taux sanguins périphériques, selon l'âge, des lymphocytes totaux (A), des polynucléaires neutrophiles (B), de l'hémoglobine (C), des plaquettes (D) et de la protéinurie (E), des souris KI ZAP, KI ZAP-Mb1 et des sous-groupes SoZAP^{Low} et SoZAP^{High}.
 Pour plus de lisibilité, les écarts types à la moyenne pour chaque âge n'ont pas été représentés
 ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

D) ANALYSES ANATOMOPATHOLOGIQUES SPLENIQUES ET GANGLIONNAIRES

Afin d'identifier d'éventuels infiltrats lymphoïdes monotypiques et/ou désorganisations architecturales tissulaires, les rates et les ganglions des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1, gardées pour vieillissement physiologique, ont été prélevés au moment de leur sacrifice à des âges différents (M20, M16 et M12) pour marquages à l'éosine et hématoxyphilline. Les analyses détaillées sont en cours.

Au total, les souris exprimant ZAP-70 dans les LB présentent au cours de leur vie :

- **une hypo-IgG et une hypo-IgM :**
 - **précoce et persistante concernant les IgG totaux**
 - **plus tardive concernant les IgM totales et concernant uniquement les SoZAP^{High}**

- **un enrichissement en IgG et IgM sériques autoréactives dans les SoZAP^{High}**
 - **autoréactivité dirigée contre de nombreux et divers Ag**
 - **mais principalement de type nucléaire**

Mais ne développent pas de lymphoprolifération

5. STIMULATIONS *IN VITRO* ET IMMUNISATIONS

Nous avons ensuite étudié si l'expression de ZAP-70 dans les LB modifiait aussi la capacité de ces cellules à répondre à différentes stimulations externes en conditions *in vitro* et *ex-vivo*.

Pour cela, une première partie a consisté à la stimulation *in vitro* de LB spléniques triés avec différents stimuli BCR-dépendants et BCR-indépendants. L'activation cellulaire, la prolifération et la production d'Ac ont ensuite été analysées sur ces cellules.

D'autre part, des immunisations avec un Ag T-dépendant ou T-indépendant ont été réalisées. La production d'Ac totaux et spécifiques de l'Ag, la prolifération cellulaire B et un immunophénotypage lymphocytaire B ont ensuite été analysés.

A) STIMULATIONS *IN VITRO*

Des LB spléniques triés négativement (CD43⁻) issus de souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 âgées de 6 mois ont été stimulés *in vitro* durant 48h avec différents stimuli BCR dépendants ou BCR-indépendants : i) anti-IgM; ii) anti-IgM + agoniste du CD40; iii) anti-IgM + agoniste du CD40 + IL-4; iv) LPS et v) ADN à îlots CpG (agoniste du TLR9). Une condition non stimulée (NS) contenant uniquement du milieu de culture a été utilisée comme contrôle interne.

(1) AUGMENTATION DE L'AUTOFLUORESCENCE DE LA GFP ET DE ZAP-70

Comparativement aux LB non stimulés, les LB stimulés présentaient une augmentation de l'intensité de fluorescence de la GFP rendant difficile voire impossible la distinction entre les LyGFP^{Low} et GFP^{High} (Figure 55.A). Il existait aussi une augmentation de la fluorescence intracellulaire de ZAP-70 (Figure 55.B).

A ce stade, les deux hypothèses étaient que la stimulation des LB entraînait soit une augmentation de l'autofluorescence, soit une augmentation de l'expression de ZAP-70 (et donc de la GFP). Les LB stimulés des souris contrôles KI ZAP présentant aussi une augmentation de l'intensité de la GFP et de ZAP-70 alors que ces cellules n'expriment pas la GFP/ZAP-70 plaidait en faveur de l'hypothèse d'une autofluorescence augmentée suite à la stimulation (Figure 55. A et B). Toutefois, le ratio de fluorescence de la GFP et de ZAP-70 des LB stimulés sur les LB correspondants non stimulés, était globalement plus important chez les souris KI ZAP-Mb1 (Figure 55.C et D) pouvant faire évoquer une part d'augmentation de synthèse de ZAP-70 dans les souris KI ZAP-Mb1.

Nous avons donc voulu vérifier rétrospectivement si ce phénomène avait aussi été observé dans les expériences de stimulation des LB triés CD43⁻ du modèle KI Trib1-Mb1 qui utilisait la même construction génique. Ainsi, bien que l'ensemble des combinaisons de stimuli n'aient pas pu être comparées, il existait aussi, pour les mêmes temps d'incubation et les mêmes concentrations en anti-IgM et en LPS, une augmentation de l'intensité de la GFP dans le modèle KI Trib1-Mb1 avec un ratio GFP B stimulés/B non stimulés plus important pour les souris KI Trib1-Mb1 comparativement aux contrôles KI Trib1. Ceci était toutefois moins marqué que dans notre modèle (figure 55.E).

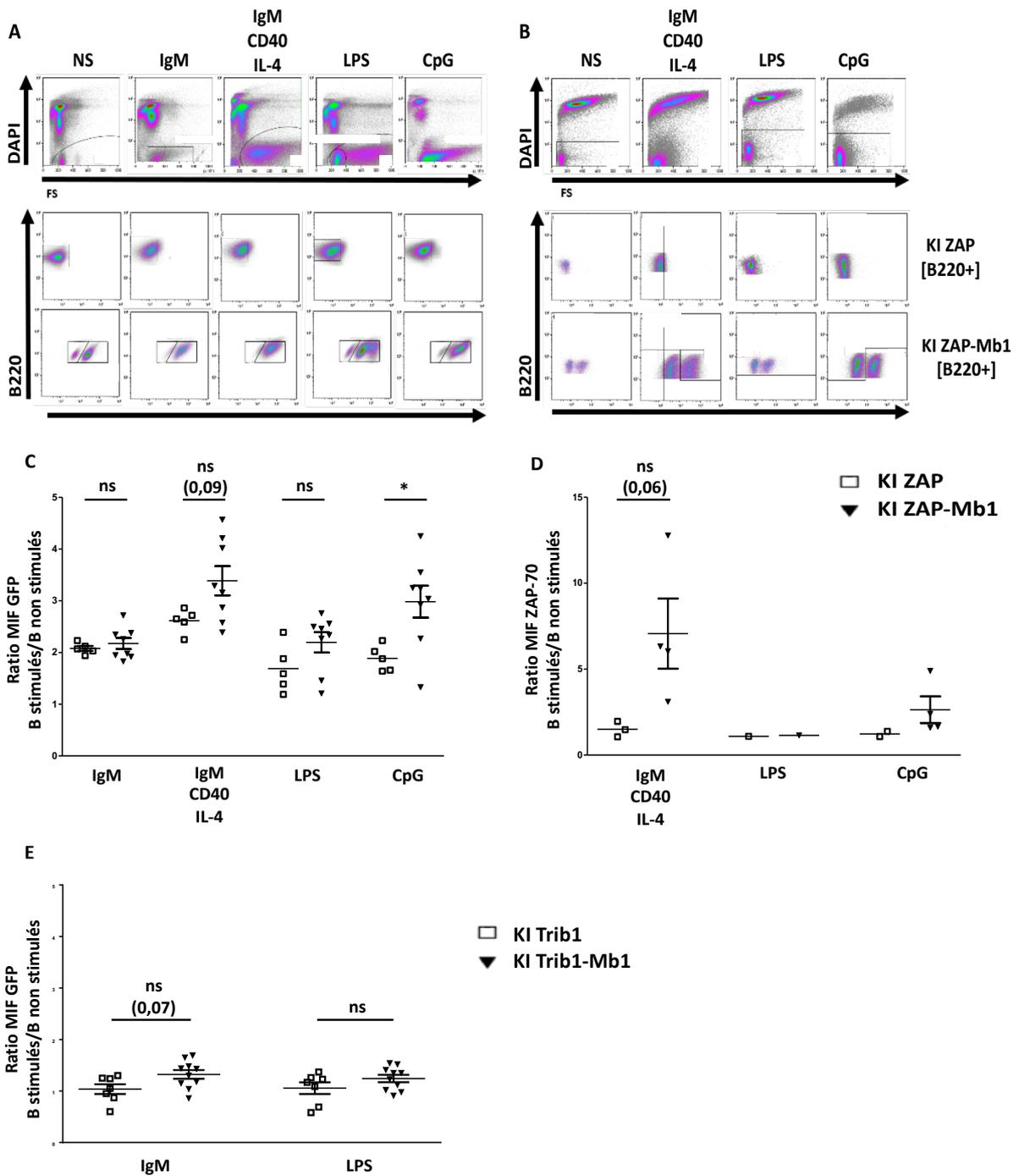


Figure 55. Modifications de l'autofluorescence de la GFP et de ZAP-70 sous différentes stimulations des LB spléniques triés dans les modèles KI ZAP-Mb1 et KI Trib1-Mb1

A et B) Exemples d'images de cytométrie en flux

C et D) Comparaison des ratios de MIF de la GFP et de ZAP-70 sur les cellules non stimulées correspondantes, entre les LB des souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1

E) Comparaison des ratios de MIF de la GFP entre les LB des souris KI Trib1 et KI Trib1-Mb1

ns : non significatif ; * : $p < 0,05$ (test de Mann-Whitney)

Ainsi, pour les stimulations *in vitro*, afin de pouvoir clairement discriminer l'éventuel impact de l'intensité basale de l'expression de ZAP-70 dans les LB dans les souris KI ZAP-Mb1, de même que précédemment, nous avons comparé des SoZAP^{High} (n = 3) et des SoZAP^{Low} (n = 3) à 6 souris contrôles KI ZAP du même âge.

Pour cette expérience nous avons pu obtenir 2 groupes très distincts en termes d'intensité d'expression de ZAP-70, les SoZAP^{High} ayant une proportion de LyGFP^{High} > 80 % des LyGFP Totale et les SoZAP^{Low} une proportion de LyGFP^{High} < 10 % des LyGFP Totale

Au total, nous avons conclu que **l'augmentation de fluorescence observée de la GFP (et de ZAP-70) suite aux différentes stimulations était plus probablement le reflet d'une autofluorescence plus importante et non d'une augmentation de la synthèse de ZAP-70.**

(2) MARQUEURS D'ACTIVATION PRÉCOCE

Après 48h de stimulation, l'expression conjointe des marqueurs d'activation CD69 et CD86 à la surface des LB triés (CD43⁻) B220⁺CD19⁺ a été mesurée par cytométrie en flux.

Les SoZAP^{High} **présentaient un enrichissement significatif en cellules CD69⁺CD86⁺ pour l'ensemble des conditions de stimulation mais aussi à l'état basal (NS) comparativement aux KI ZAP, et la même tendance était observée comparativement aux SoZAP^{Low} (p = 0,09) (Figure 56).**

A l'exception de la stimulation par LPS, les proportions de LB doubles positifs étaient par contre comparables entre les SoZAP^{Low} et KI ZAP.

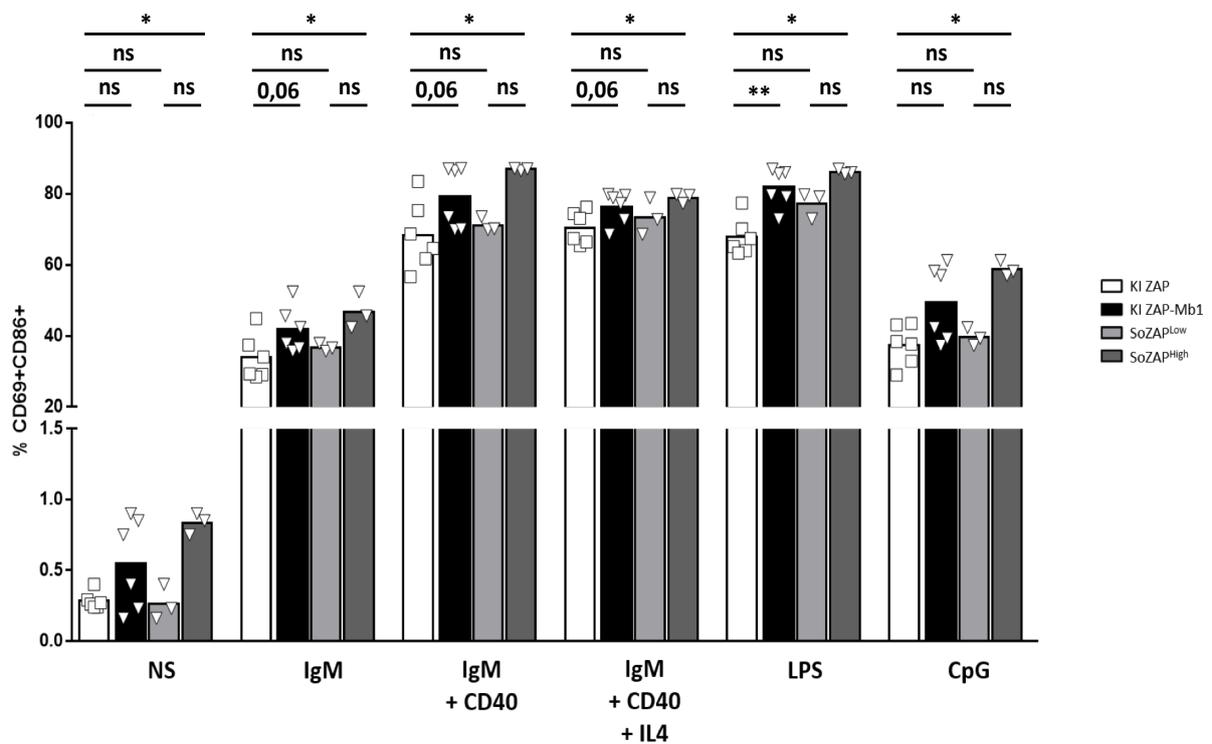


Figure 56. Étude par cytométrie en flux de l'activation des LB spléniques triés stimulés 48h *in vitro*.

Proportion de B220+CD19+ spléniques triés (CD43-) doubles positifs CD69+CD86+ selon les différentes conditions de stimulation.

NS : non stimulées ; ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ (test de Mann-Whitney)

(3) PROLIFÉRATION CELLULAIRE

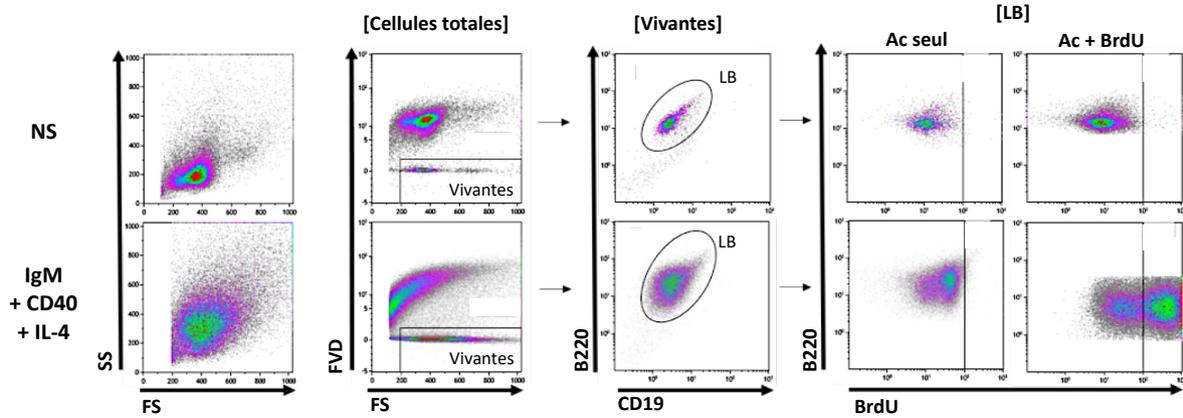
Après 90h de stimulation par anti-IgM + agoniste du CD40 + IL-4, la prolifération cellulaire B a été évaluée par cytométrie en flux sur la proportion de cellules B220⁺CD19⁺ ayant incorporé de la BrdU présente dans le milieu de stimulation.

Une condition de cellules NS sans BrdU dans le milieu de culture (Ac anti-BrdU seul) a été utilisée comme contrôle interne négatif permettant de définir un seuil de positivité pour la BrdU (Figure 57.A).

A l'état basal NS, il existait une prolifération spontanée des LB significativement plus importante dans les souris KI ZAP-Mb1. Ceci était le reflet des SoZAP^{High} car la prolifération spontanée des LB issus des SoZAP^{Low} était par contre comparable à celle des contrôles KI ZAP (Figure 57.B).

Après stimulation, les LB des SoZAP^{High} conservaient une prolifération significativement plus marquée que ceux de KI ZAP ($p = 0,008$) mais aussi que ceux des SoZAP^{Low} ($p = 0,009$).

A



B

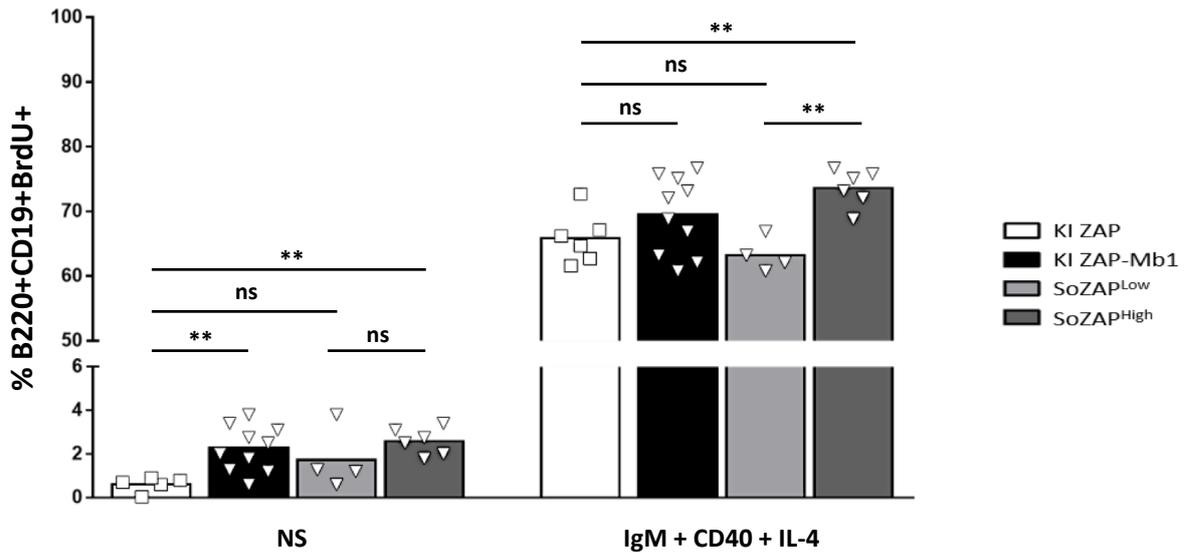


Figure 57. Étude par cytométrie en flux de la prolifération des LB spléniques triés stimulés 90h *in vitro*.

A) Stratégie de fenêtrage et détermination du seuil de positivité pour la BrdU.

B) Proportion de B220+CD19+ spléniques triés (CD43-) BrdU+ sans et après stimulation.

Ac : anticorps ; NS : non stimulées ; ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ (test de Mann-Whitney)

(4) PRODUCTIONS D'IG ET DIFFÉRENTIATION PLASMOCYTAIRE

Les concentrations en IgG totales des surnageants de cultures ont été dosées par ELISA après 72h de stimulation par LPS ou anti-IgM + agoniste du CD40 + IL-4 ou anti-IgM + agoniste du CD40 + IL-4 + IL-21 (l'IL-21 étant une cytokine majeure pour la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'Ac) (Figure 58).

Les concentrations en IgM totales ont aussi été dosées de la même manière mais seulement pour la stimulation par LPS, l'utilisation d'anti-IgM dans le milieu de culture interférant avec le dosage des IgM totales.

Sur la même expérience, les culots cellulaires ont été récupérés pour l'étude par cytométrie en flux de la différenciation en plasmablastes et en plasmocytes de ces cellules, pour les conditions non stimulées, LPS et anti-IgM + agoniste du CD40 + IL-4 + IL-21 (Figure 59).

(A) IG DANS LES SURNAGEANTS

Il n'était pas observé de différences de concentrations en IgG ou IgM totales en l'absence de stimulation entre les LB des souris KI ZAP-Mb1, SoZAP^{Low}, SoZAP^{High} ou des souris contrôles KI ZAP.

Il existait par contre une tendance à une réduction en IgG totales dans le groupe des souris KI ZAP-Mb1 après stimulation par anti-IgM + agoniste du CD40 + IL-4 et surtout par anti-IgM + agoniste du CD40 + IL-4 + IL-21 ($p = 0,09$ et $p = 0,06$ respectivement). Ces valeurs devenaient significatives concernant le sous-groupe ZAP^{Low} ($p = 0,04$ pour les deux stimulations), mais pas pour le sous-groupe ZAP^{High}.

Après stimulation par LPS, il n'était pas observé de différences pour les IgG totales entre les souris KI ZAP-Mb1, SoZAP^{Low}, SoZAP^{High} et les contrôles KI ZAP, mais il existait une réduction significative des IgM totales dans le groupe KI ZAP-Mb1 totales ($p = 0,008$). Ceci était principalement le reflet des SoZAP^{Low} ($p = 0,02$), seule une tendance à la réduction étant observé pour les SoZAP^{High} ($p = 0,08$).

(B) DIFFERENTIATION PLASMOCYTAIRE

Comparativement aux souris KI ZAP, sous anti-IgM + anti-CD40 + IL-4 + IL-21, il était observé une augmentation significative de la proportion de plasmablastes dans les SoZAP^{Low}, et une augmentation des plasmocytes, mais non significative, à la fois pour les SoZAP^{Low} et les SoZAP^{High} ($p = 0,09$). Le contraire était observé sous LPS avec une réduction plus marquée dans les SoZAP^{Low}, significative pour les plasmablastes et avec une tendance pour les plasmocytes ($p = 0,07$).

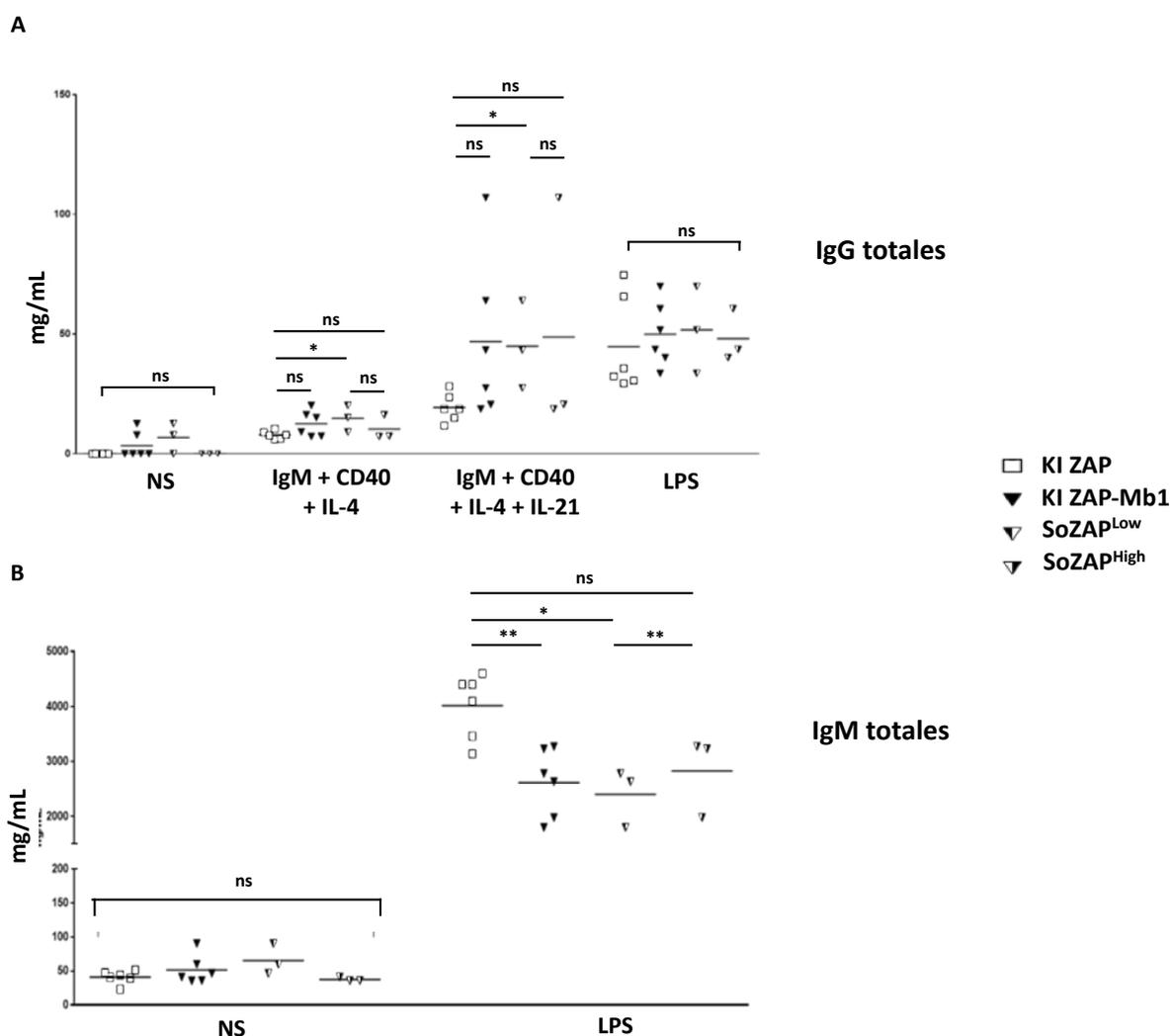
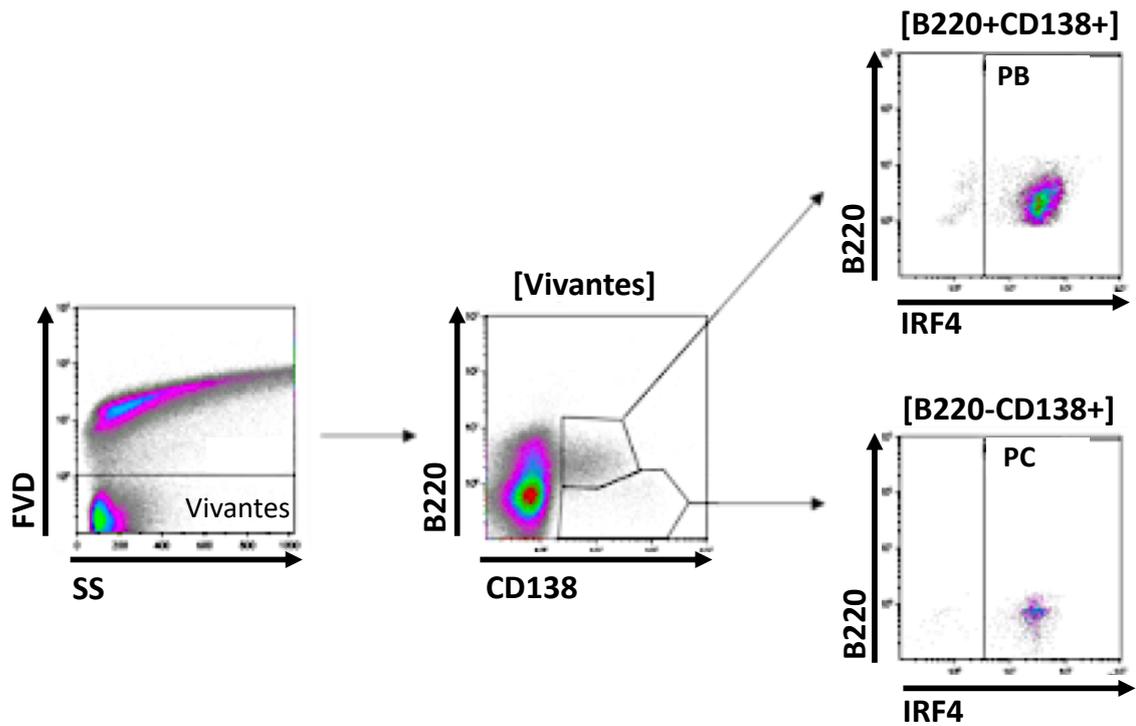


Figure 58. Dosages sériques par ELISA des IgG (A) et IgM (B) totales dans les surnageants de cultures à 72h de LB spléniques triés

NS : non stimulés ; IL : interleukine ; LPS : lipopolysaccharide ; ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ (test de Mann-Whitney)

A



B

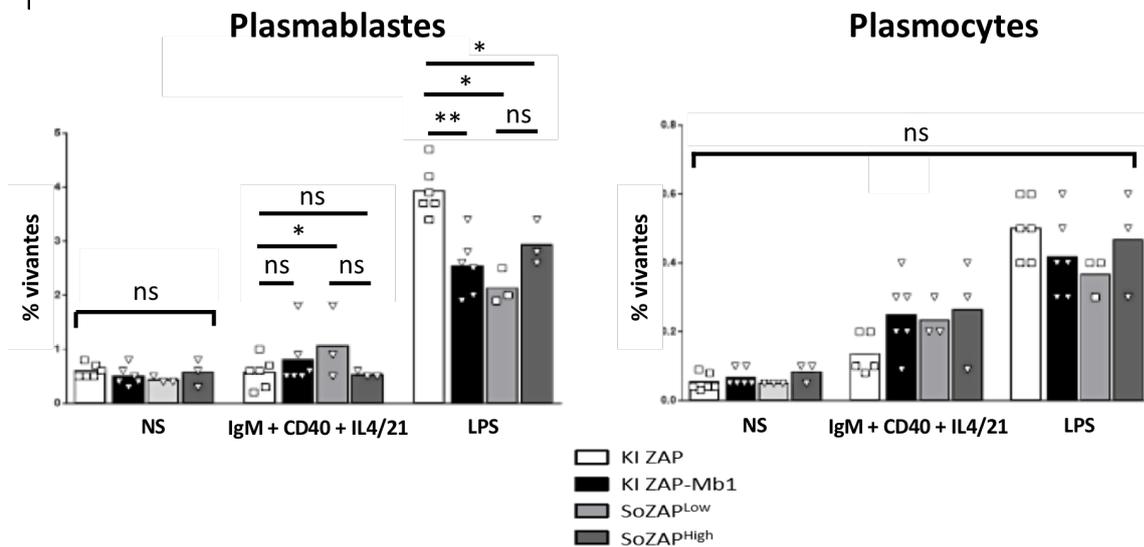


Figure 59. Différentiation plasmablastique et plasmocytaire après 72h de stimulation de LB spléniques triés

A) Stratégie de fenêtrage des plasmablastes (B220⁺CD138⁺IRF-4⁺) et des plasmocytes (B220⁻CD138⁺IRF-4⁺)

B) Proportion des plasmablastes et des plasmocytes par rapport au nombre total de cellules vivantes, selon le type de stimulation et les groupes de souris

NS : non stimulés ; IL : interleukine ; LPS : lipopolysaccharide ; PB : plasmablastes ; PC : plasmocytes
 ns : non significatif ; * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 (test de Mann-Whitney)

Au total, pris ensemble, les résultats des stimulations *in vitro* des LB spléniques triés objectivent les points suivants :

- **Un enrichissement en LB proliférant de façon spontanée à l'état basal chez les SoZAP^{High}, qui est conservé à 90h sous stimulation par anti-IgM + agoniste du CD40 + IL-4**
- **Un enrichissement, chez ces mêmes souris, en LB activés de façon spontanée à l'état basal, qui est conservé à 48h sous différents stimuli BCR-dépendants et BCR-indépendants**
- **Étonnamment, la production d'IgG totales après stimulations BCR-dépendantes est augmentée principalement dans le groupe des SoZAP^{Low}**
- **Une diminution de la production d'IgM totales par contre observée après stimulation par LPS, là encore de façon plus marquée dans le groupe des souris SoZAP^{Low}**

B) IMMUNISATIONS

Dans le but d'étudier *in vivo* la stimulation des LB médiée par les LT, des souris âgées de 6 mois ont été immunisées par de l'ovalbumine (OVA) qui est un immunogène T-dépendant, associée à de l'adjuvant de Freund.

En parallèle, d'autres souris du même âge ont été immunisées par du NP(0,3)-LPS (NP) qui est un immunogène T-indépendant permettant d'étudier cette fois-ci la stimulation réponse des LB à une stimulation directe non médiée par les LT.

Les différentes souris disponibles pour ces expériences ayant globalement le même profil d'expression de ZAP (entre 40 et 60 % de LyGFP^{High}) nous n'avons pas pu effectuer de sous analyses des SoZAP^{Low} vs SoZAP^{High}.

(1) REPONSE AC TOTALE ET SPECIFIQUE DE L'AG

(A) OVALBUMINE + ADJUVANT DE FREUND

*ELISA

Les taux d'IgG et d'IgM totales à J7, J10 et J30 après le début de l'immunisation ne différait pas entre les souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP (Figure 60.A et B).

En regard des Ac spécifiques, il existait par contre une tendance à la réduction de la production d'IgG anti-OVA dès J7 dans les souris KI ZAP-Mb1 ($p = 0,07$), qui devenait significative à J10 ($p = 0,01$) pour être à la limite de la significativité à J30 ($p = 0,06$) (Figure 60.C). Concernant l'isotype IgM, il existait une réduction de la production d'IgM anti-OVA dans les souris KI ZAP-Mb1 uniquement à J30 ($p = 0,03$), les taux étant comparables entre les 2 groupes de souris à J7 et J10 (Figure 60.D).

Après ajustement des titres sur la concentration en Ig totale correspondante, les résultats restaient superposables à ceux des titres seuls à l'exception d'une différence plus marquée concernant l'hypo-IgM anti-OVA à J30 dans les souris KI ZAP-Mb1 ($p = 0,009$) (résultats non montrés).

*ELISPOTs

Afin d'étudier, en parallèle de la quantité d'Ac produite, le réservoir de cellules sécrétrices de ces Ac, des ELISPOTs IgG et IgM totales, ainsi qu'IgG et IgM spécifiques anti-OVA ont été réalisés sur les splénocytes totaux à J30 lors du sacrifice des souris pour analyse.

Il n'a pas été observé de différences concernant le nombre de cellules IgG⁺ ou IgM⁺ entre les souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP, ce qui est cohérent avec les données précédentes en ELISA pour les IgG et IgM totales à J30 (Figure 61.A).

Il n'existait pas non plus de différence concernant les cellules IgG⁺ spécifiques anti-OVA (Figure 61.B) alors qu'une hypo-IgG anti-OVA à la limite de la significativité était observée pour les souris KI ZAP-Mb1 à J30 en ELISA ($p = 0,06$).

Concernant l'isotype IgM, bien que cela ne soit pas significatif, il existait une réduction en cellules IgM⁺ spécifiques anti-OVA chez les souris KI ZAP-Mb1 ($p = 0,09$) (Figure 61.B), ce qui est cohérent avec la réduction significative en IgM-anti-OVA à J30 observée en ELISA.

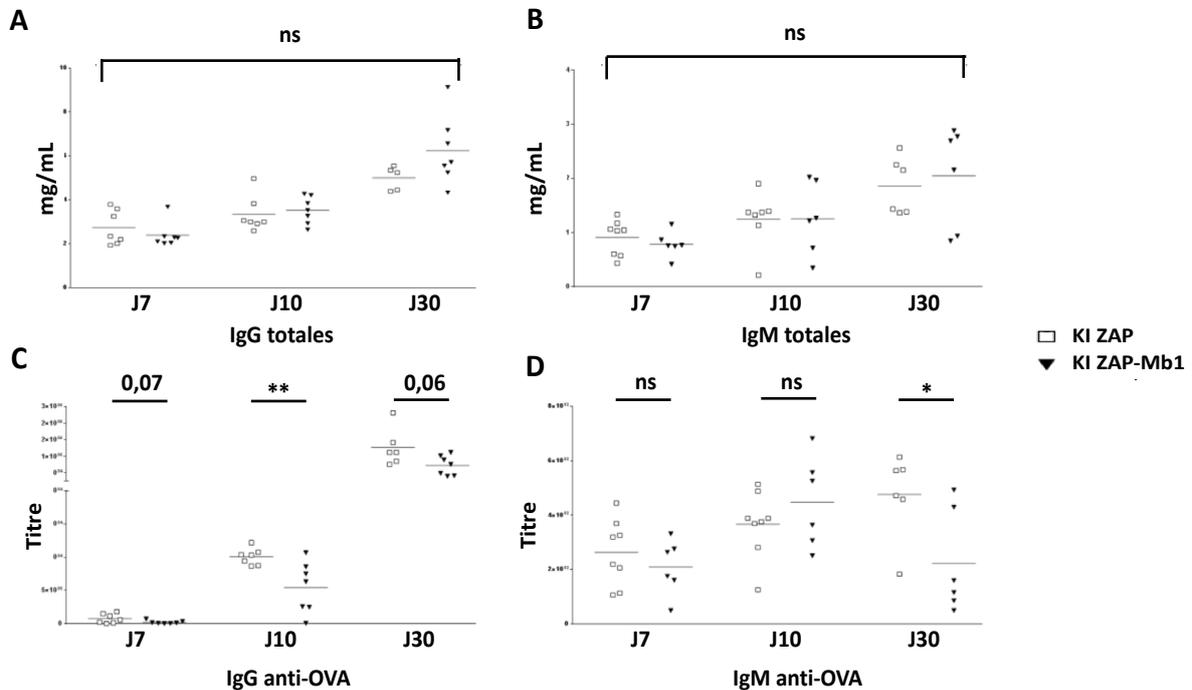


Figure 60. Dosages sériques par ELISA des IgG et IgM totales (A et B) ainsi que des Ig spécifiques anti-OVA (C et D) après immunisations des souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP par de l'ovalbumine et de l'adjuvant de Freund.

OVA : ovalbumine ; ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ (test de Mann-Whitney)

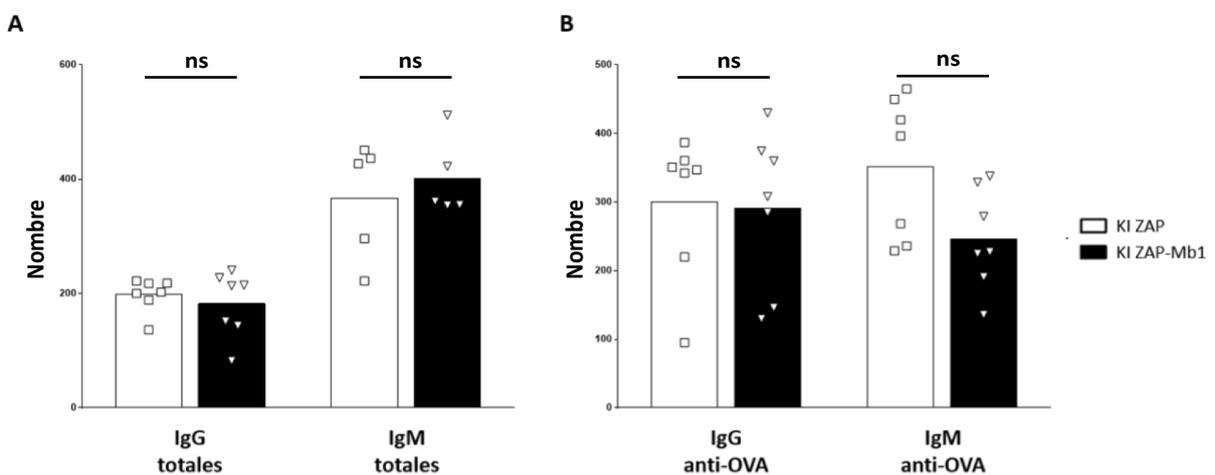


Figure 61. ELISPOTs IgG et IgM totales et IgG et IgM anti-ovalbumine à J30 après immunisations des souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP par de l'ovalbumine et de l'adjuvant de Freund.

A) Nombre de cellules IgG⁺ ou IgM⁺ pour 10^5 cellules totales.

B) Nombre de cellules IgG⁺ ou IgM⁺ spécifiques de l'ovalbumine pour $5 \cdot 10^5$ cellules totales

OVA : ovalbumine ; ns: non significatif (test de Mann-Whitney)

(B) NP(0,3)-LPS

*ELISA

A J7 de l'immunisation, il existait une hypo-IgM chez les souris KI ZAP-Mb1 ($p = 0,02$), et une tendance à une hypo-IgG ($p = 0,08$). Les taux étaient par contre comparables à la fois en IgG et en IgM totales à J10 et J30 (Figure 62.A et B).

En regard des Ac spécifiques, aucune différence n'a été observée en termes de titres d'IgG ou d'IgM anti-NP entre les 2 groupes de souris (Figure 62.C et D).

Après ajustement des titres sur la concentration en Ig totale correspondante, les résultats restaient superposables à ceux des titres seuls pour les deux isotypes, donc à une absence de différences entre les souris KI ZAP et KI ZAP-Mb1 (résultats non montrés).

*ELISPOTs

De la même manière que pour l'OVA, des ELISPOTs IgG et IgM totales, ainsi qu'IgG et IgM spécifiques anti-NP ont été réalisés sur les splénocytes totaux à J30 lors du sacrifice des souris pour analyse.

Il n'a pas été observé de différences concernant le nombre de cellules IgG⁺ ou IgM⁺ entre les souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP, ce qui est cohérent avec les données en ELISA pour les IgG et IgM totales à J30 (Figure 63.A).

Il n'existait pas non plus de différence concernant les cellules IgG⁺ ou IgM⁺ spécifiques anti-NP (Figure 63.B) ce qui était aussi cohérent avec les données en ELISA pour les IgG et IgM anti-NP à J30.

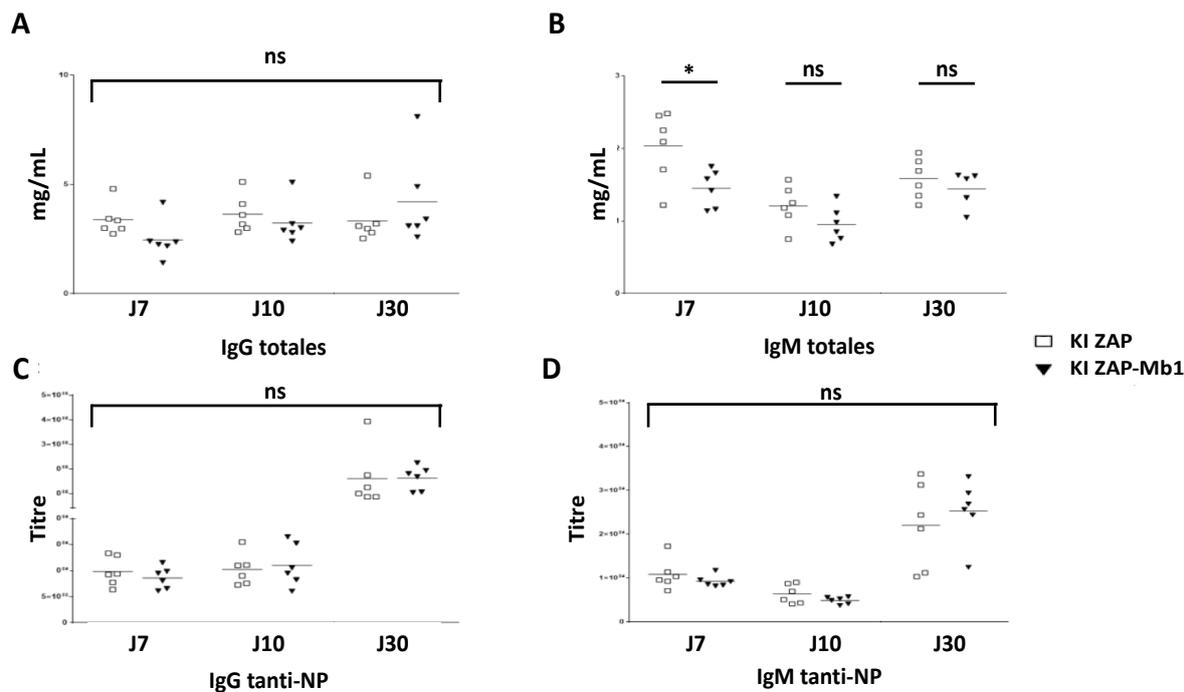


Figure 62. Dosages sériques par ELISA des IgG et IgM totales (A et B) ainsi que des Ig spécifiques anti-NP (C et D) après immunisations des souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP par du NP(0,3)-LPS.

ns : non significatif ; * : $p < 0,05$ (test de Mann-Whitney)

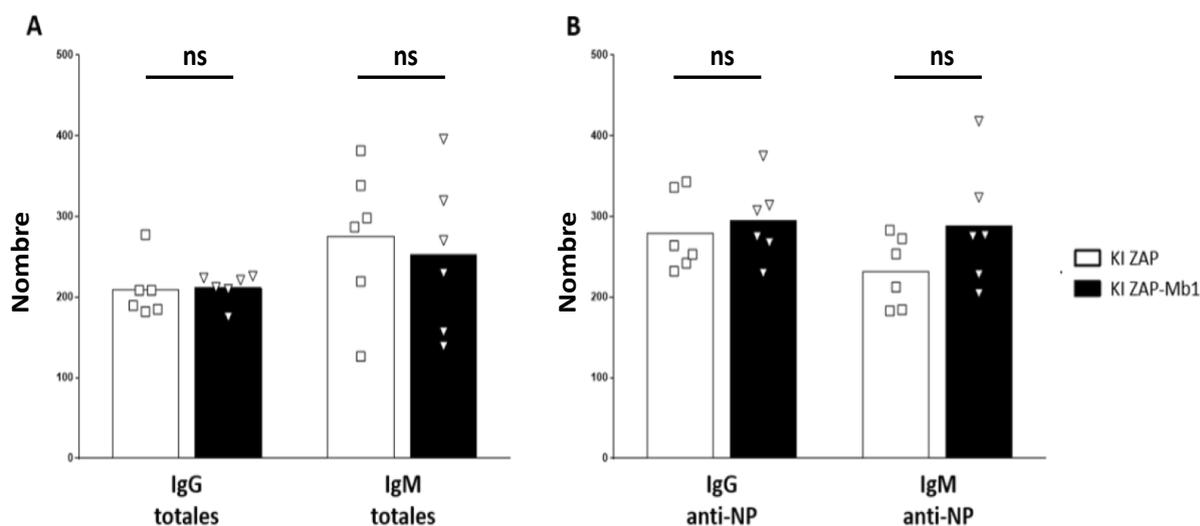


Figure 63. ELISPOTs IgG et IgM totales et IgG et IgM anti-NP à J30 après immunisations des souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP par du NP(0,3)-LPS.

A) Nombre de cellules IgG+ ou IgM+ pour 10⁵ cellules totales.

B) Nombre de cellules IgG+ ou IgM+ spécifiques du NP pour 5.10⁵ cellules totales
OVA : ovalbumine ; ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

(2) PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Les souris en cours d'immunisation par de l'ovalbumine + adjuvant de Freund ou par du NP(0,3)-LPS, ont reçu de la BrdU par voie IP à J20 (1 mg en dose unique) et par voie orale, diluée dans de l'eau de boisson (0,8 mg/L), de J20 à J30.

La prolifération cellulaire B a été évaluée par cytométrie en flux à J30 jour du sacrifice sur la proportion de splénocytes B220⁺ ayant incorporé de la BrdU *in vivo*.

Pour rappel, les différentes souris disponibles pour les expériences d'immunisation ayant globalement le même profil d'expression de ZAP (entre 40 et 60 % de LyGFP^{High}) nous n'avons pas pu effectuer de sous analyses des SoZAP^{Low} vs SoZAP^{High}.

Toutefois, les résultats de cytométrie en flux permettant de distinguer clairement les LyGFP^{Low} des LyGFP^{High}, une sous analyse de ces cellules a pu être réalisée. La stratégie de fenêtrage est détaillée en figure 64.A.

(A) OVALBUMINE + ADJUVANT DE FREUND

La proportion de cellules B220⁺BrdU⁺ parmi les LB B220⁺ totaux des souris contrôles KI ZAP était comparable à celle au sein des LB B220⁺ GFP Totale des souris KI ZAP-Mb1. Un discret enrichissement en cellules B220⁺BrdU⁺ était par contre observé parmi les LyGFP^{High} comparativement aux LyGFP^{Low} mais ceci n'était pas significatif (p = 0,09) (Figure 64.B).

(B) NP(0,3)-LPS

Il n'était pas observé de différence dans la proportion de cellules B220⁺BrdU⁺ parmi les LB B220⁺ totaux des souris contrôles KI ZAP comparativement à celle au sein des LB B220⁺ GFP Totale des souris KI ZAP-Mb1, ni des LyGFP^{Low} ou LyGFP^{High} (Figure 64.C).

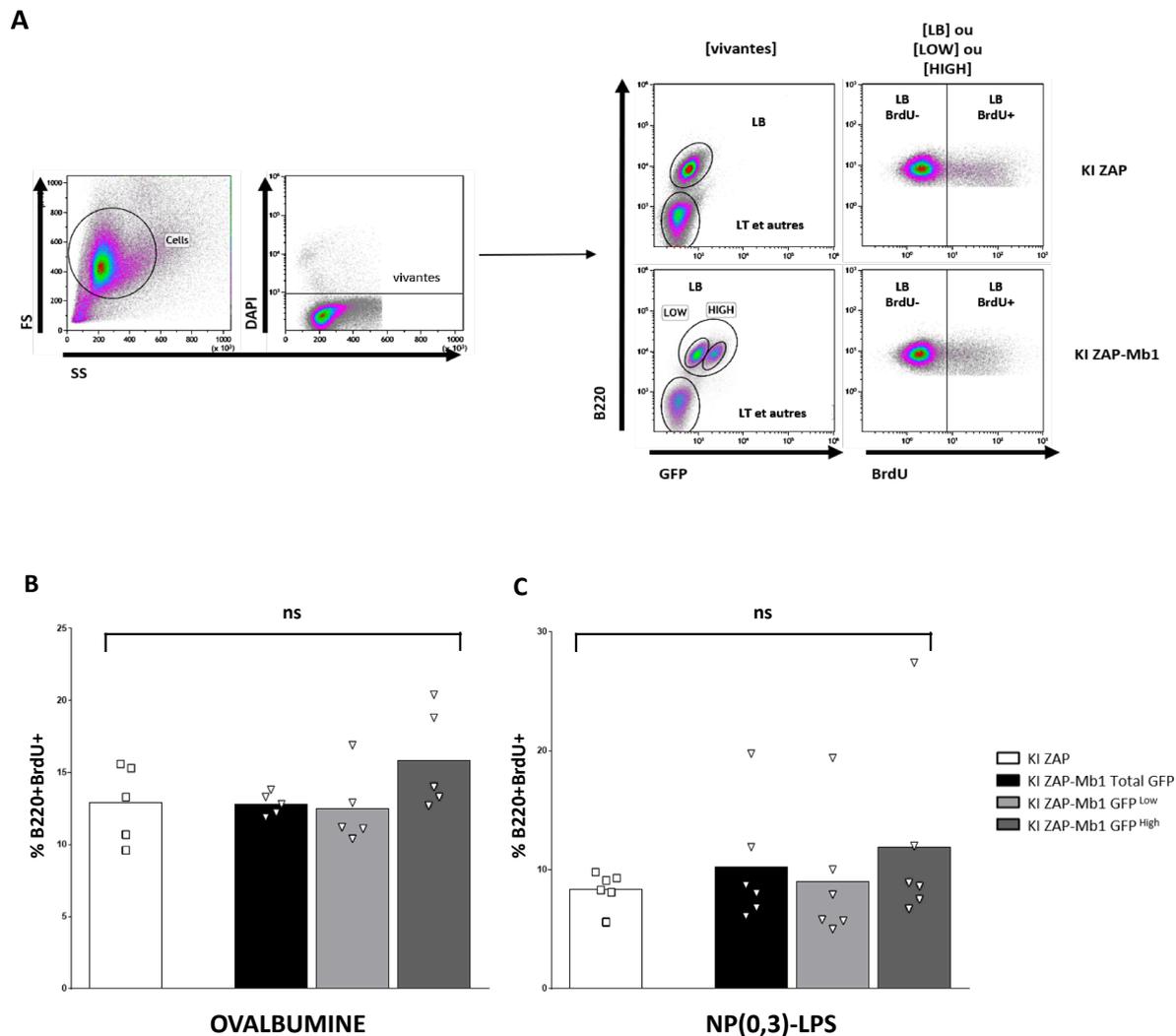


Figure 64. Étude par cytométrie en flux de la prolifération des LB spléniques *in vivo* à J30 après immunisations par de l'ovalbumine + adjuvant de Freund ou du NP(0,3)-LPS.

- A) Stratégie de fenêtrage pour l'étude des cellules B220⁺BrdU⁺
 B) Proportion de B220⁺BrdU⁺ après stimulation par ovalbumine + adjuvant de Freund
 C) Proportion de B220⁺BrdU⁺ après stimulation par NP(0,3)-LPS
 ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

Au total, après immunisations, l'expression de ZAP-70 dans les LB est associée à :

- Une réduction de la production d'Ac spécifiques anti-OVA
 - o Globale et précoce (dès J7) concernant les IgG
 - o Plus tardive (à J30) concernant les IgM
- Une tendance à la réduction du nombre de cellules IgM⁺ spécifiques de l'OVA
- Une production conservée des Ac et cellules spécifiques anti-NP

6. SIGNALISATION DU BCR

Au cours de la LLC, l'expression de ZAP-70 dans les LB tumoraux est associée à une sensibilisation du BCR.

Notre modèle murin exprimant ZAP-70 dans les LB normaux présente aussi une hyper prolifération cellulaire B mais aussi un état d'hyperactivation de ces cellules, sous différentes stimulations, dont celle médiée par le BCR.

Toutefois, à ce jour, le rôle mécanistique de ZAP-70 dans l'hypersignalisation du BCR reste totalement inconnu.

Ainsi, dans notre modèle murin, nous avons tenté d'étudier les conséquences fonctionnelles de l'expression de ZAP-70 in vivo sur les voies de signalisation du BCR et l'activation des LB non tumoraux.

A) FLUX CALCIQUE INTRACELLULAIRE

La signalisation calcique intracellulaire est un marqueur d'évaluation globale de l'activation cellulaire, qui peut être notamment médiée par la stimulation du BCR (Figure 65).

Nous avons ainsi cherché à identifier si les LB KI ZAP-Mb1 présentaient une augmentation du flux calcique intracellulaire suite à la stimulation du BCR.

Pour cela, les niveaux de calcium intracellulaire des LB spléniques triés de souris KI ZAP-Mb1 et des souris KI ZAP a été mesurés par cytométrie en flux après stimulation par un anticorps anti-IgM, à l'aide d'une sonde fluorescente Indo-1 émettant à une longueur d'onde différente selon sa liaison ou non au calcium (liée : 405 nm, non liée : 485 nm).

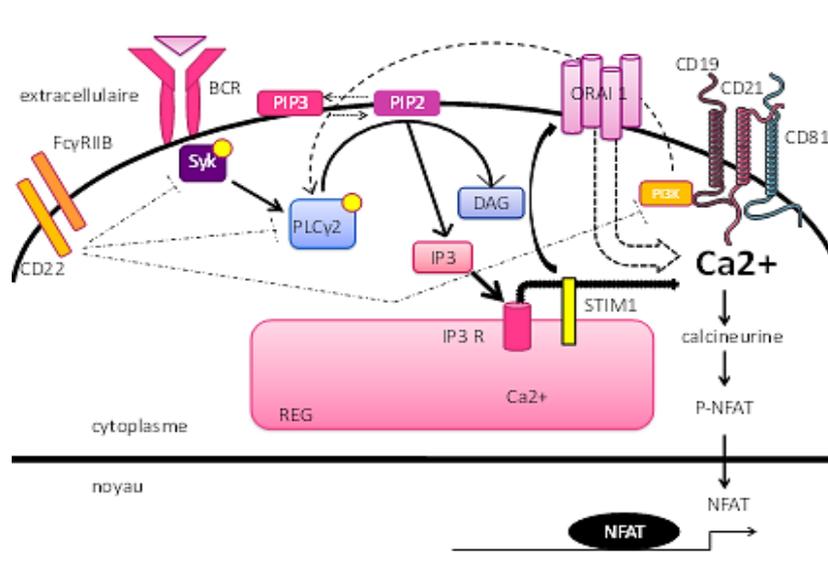


Figure 65. Signalisation calcique BCR-dépendante et sa régulation (adapté de Feske, Clin Immunol 2010)

La liaison d'un antigène au BCR provoque la phosphorylation de la PLC- γ 2 par SYK et BTK qui hydrolysent les phospho-inositides membranaires, dont le PIP2, aboutissant à la formation de deux seconds messagers, le DAG et l'IP3. Ce dernier se lie à son récepteur situé sur le REG provoquant la libération du calcium stocké dans cet organite vers le cytoplasme cellulaire. La baisse du calcium dans le REG active la protéine STIM1 qui permet l'entrée de calcium dans la cellule en activant des canaux CRAC membranaires (ORAI1). La calmoduline lie les ions Ca^{2+} , change de conformation et interagit avec la calcineurine. Cette dernière déphosphoryle le facteur de transcription qui change alors de conformation ce qui permet sa translocation nucléaire. CD22 et Fc γ RIIB agissent tous deux en inhibant l'activation de SYK, de la PLC- γ 2 et de la PI3K. La signalisation du BCR est modulée positivement par le complexe CD19/CD21/CD81 qui active la PI3K, qui elle-même active indirectement la PLC- γ 2.

Concernant les souris KI ZAP-Mb1, à l'instar des stimulations *in vitro*, nous avons pu obtenir deux groupes de souris très distincts en termes d'intensité d'expression de ZAP-70 : SoZAP^{High} (LyGFP^{High} > 80 % des LyGFP Totale) et SoZAP^{Low} (LyGFP^{High} < 10 % des LyGFP Totale).

Après stimulation du BCR, on observait une augmentation franche du flux calcique (ratio de fluorescence de la sonde liée/fluorescence de la sonde non liée) dans les LB des SoZAP^{High} comparativement aux LB KI ZAP mais aussi comparativement aux LB des SoZAP^{Low} (Figure 66.A et B).

Après normalisation (rapport de la médiane des pics de fluorescence sur la ligne de base avant stimulation par l'anti-IgM), ces différences visuelles étaient significatives ($p = 0,009$ et $0,02$ respectivement) (Figure 66.C).

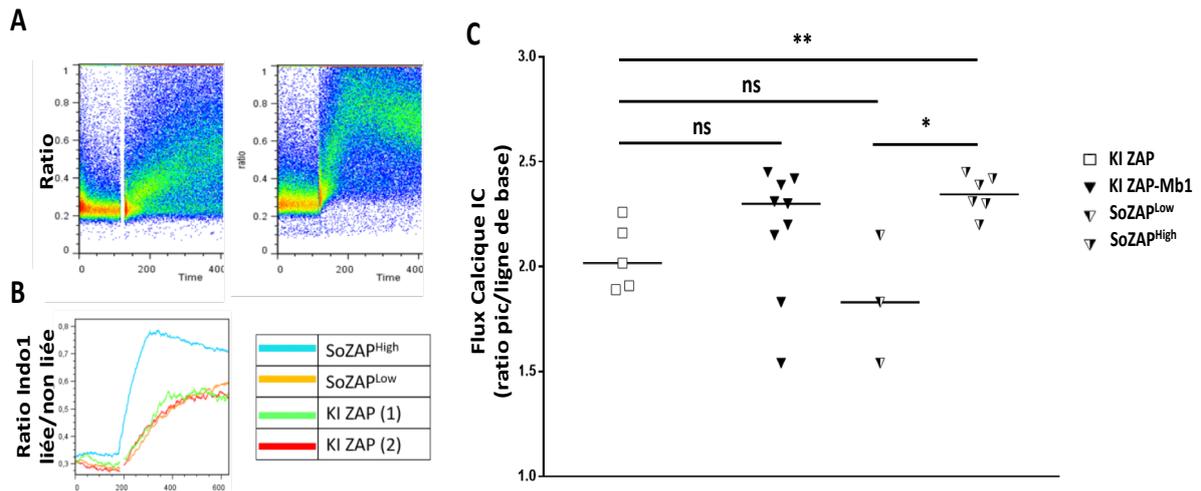


Figure 66. Flux calcique intracellulaire des LB spléniques triés (CD43-) par cytométrie en flux après stimulation du BCR

A et B). Exemples représentatifs des différentes expériences : ratio de fluorescence de la sonde Indo-1 ayant lié le calcium (longueur d'onde : 485 nm) sur la fluorescence de la sonde non liée (longueur d'onde : 405 nm), en fonction du temps, avant et après stimulation par anti-IgM, pour les LB des souris KI ZAP, KI ZAP-Mb1 et des SoZAP^{High} et SoZAP^{Low}.

C) Ratios du pic du flux calcique après stimulation par anti-IgM sur la ligne basale avant stimulation
 ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ (test de Mann-Whitney)

B) ETUDE PAR WESTERN BLOT DE LA PHOSPHORYLATION DES VOIES DE LA SIGNALISATION DU BCR

Après stimulation par un anticorps anti-IgM de LB spléniques triés (CD43⁻) issus de souris KI ZAP-Mb1 et KI ZAP, les extraits protéiques totaux de ces cellules ont été récupérés à différents temps pour l'analyse par Western blot du statut de phosphorylation des protéines suivantes : SYK, AKT, ERK et I κ B.

Un schéma simplifié résumant les différentes voies de signalisation du BCR impliquant ces protéines est proposé en figure 67.

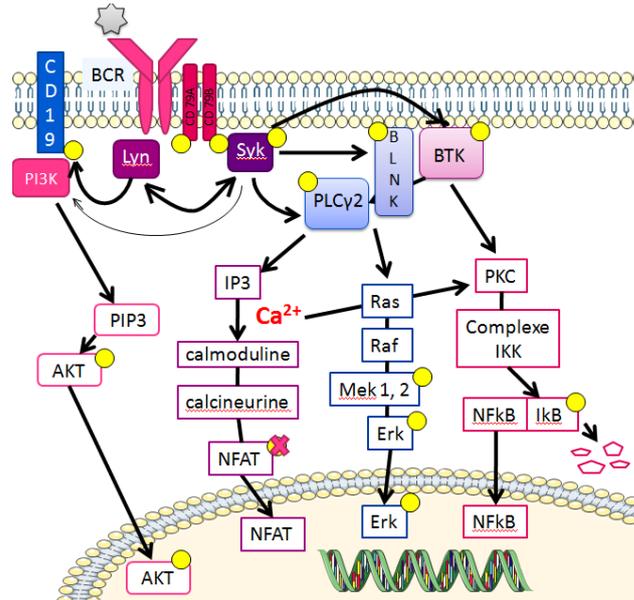


Figure 67. Schéma récapitulatif simplifié des voies de signalisation du BCR étudiées par Western blot dans notre modèle.

Le statut de phosphorylation des protéines suivantes a été étudié par Western blot après stimulation du BCR : SYK, AKT, ERK et IκB

Du fait des résultats précédents montrant des différences phénotypiques et de réponse aux stimulations principalement dans les souris exprimant fortement ZAP-70 dans leurs LB, nous avons comparé pour le moment et en première intention, le statut de phosphorylation des voies du BCR uniquement entre les SoZAP^{High} et les souris contrôles KI ZAP.

Les résultats sont pour le moment préliminaires et purement descriptifs, basés sur un nombre très limité de souris (n = 2 pour SYK AKT, et ERK ; n = 1 pour IκB).

Concernant SYK, sa phosphorylation basale est comparable entre les deux groupes de souris, mais il est observé une phosphorylation moins intense dans les LB des SoZAP^{High} après 1 min de stimulation par l'anti-IgM, ceci se maintenant à 3, 5 et 10 min pour ensuite retrouver globalement le niveau des LB des souris KI ZAP (Figure 69.A)

Le faible effectif, associé aux variations de résultats, ne permettait pas d'observer de tendances à des différences nettes de phosphorylation de ERK et d'AKT entre les deux groupes de souris (Figure 69.B et C).

Concernant I κ B α , les LB des SoZAP^{High} présentaient une phosphorylation basale moins importante que les LB KI ZAP (Figure 69.D). Ceci ne semblait pas être d u à une quantité moindre de protéine totale comme en attestent les taux comparables entre les deux groupes à l'état basal (Figure 69.E). Après stimulation par l'anti-IgM, la phosphorylation d'I κ B α augmentait dans les deux groupes avec un pic à 1 min, toute en restant moindre dans les LB des SoZAP^{High}. Ceci s'inversait à partir de 10 min, la phosphorylation persistant jusqu'à 30 minutes dans les LB des SoZAP^{High} mais diminuant d s 3 min de stimulation dans les LB des souris KI ZAP (Figure 69.D). Ces résultats, bien que limités, sont en adéquation avec la réduction progressive parallèle du taux de protéine totale correspondante, qui est plus tardive dans les LB des SoZAP^{High}, cette réduction du taux protéique reflétant la dégradation physiologique de la protéine par le protéasome suite à sa phosphorylation (Figure 69.E).

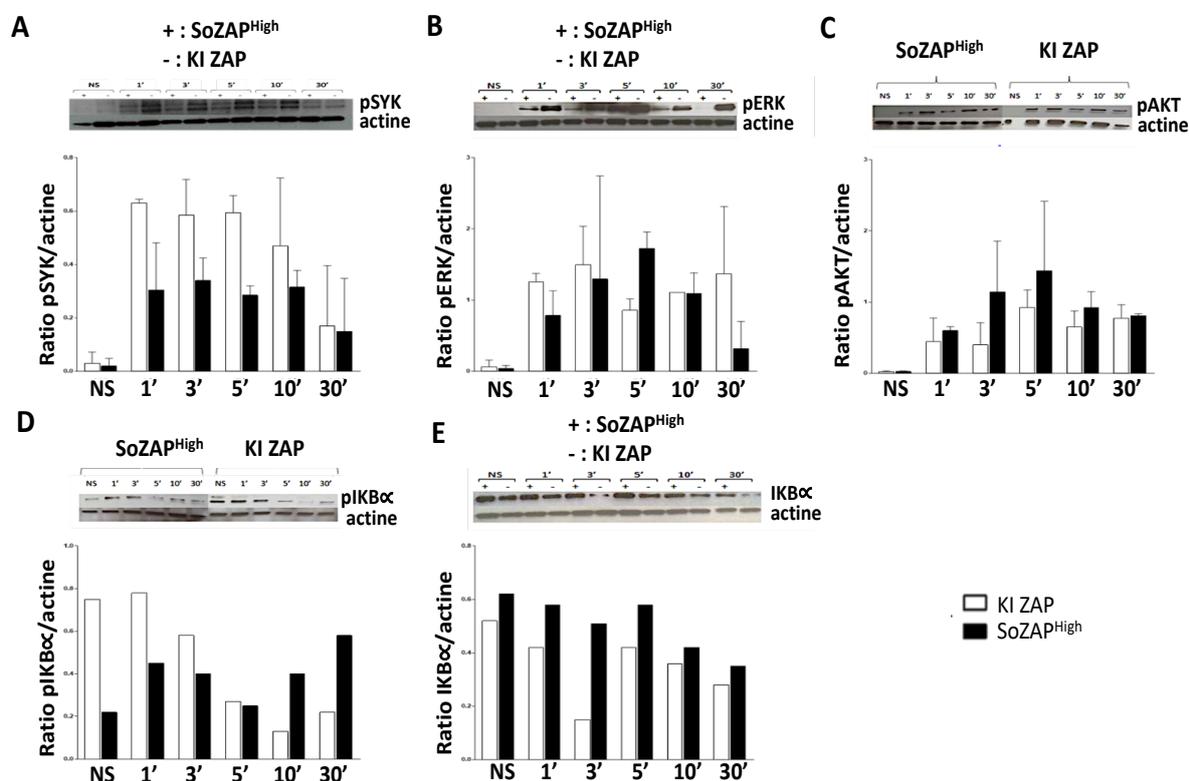


Figure 68. Statut de phosphorylation des principales protéines impliquées dans la signalisation du BCR à l'état basal et après stimulation du BCR

Des LB spléniques triés (CD43⁻) de SoZAP^{High} et contrôles KI ZAP ont été stimulés par anti-IgM (5 μ g/mL). Les lysats protéiques ont été analysés à 1, 3, 5, 10 et 30 min par Western blot en utilisant des anticorps anti-phospho-SYK (A), -ERK (B), -AKT(C), -I κ B α (D) et anti-I κ B α total (E). L'intensité de la bande de la protéine phosphorylée a été rapportée à l'intensité de la bande de la protéine totale correspondante ou de l'actine (logiciel ImageJ). NS : non stimulés

C) ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION DE ZAP-70 PAR IMMUNOPRECIPITATION

Là aussi, les résultats sont préliminaires, portant sur une seule SoZAP^{High} et une seule souris contrôles KI ZAP testées à ce jour.

Des LB spléniques triés (CD43⁻) de cette souris ont été stimulés avec un anticorps anti-IgM. La protéine ZAP-70 a ensuite été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-ZAP-70 et sa phosphorylation étudiée par Western blot à l'aide d'un anticorps anti phosphotyrosines, à différents temps (Figure 70.A et B). L'intensité de phosphorylation de ZAP-70 a été rapportée au taux de protéine totale correspondante pour chaque temps

Ainsi, il existait une phosphorylation de ZAP-70 à l'état basal qui, après stimulation du BCR, augmentait dès 1 min pour un maximum à 3' pour tendre à diminuer à 5 minutes (Figure 70.C).

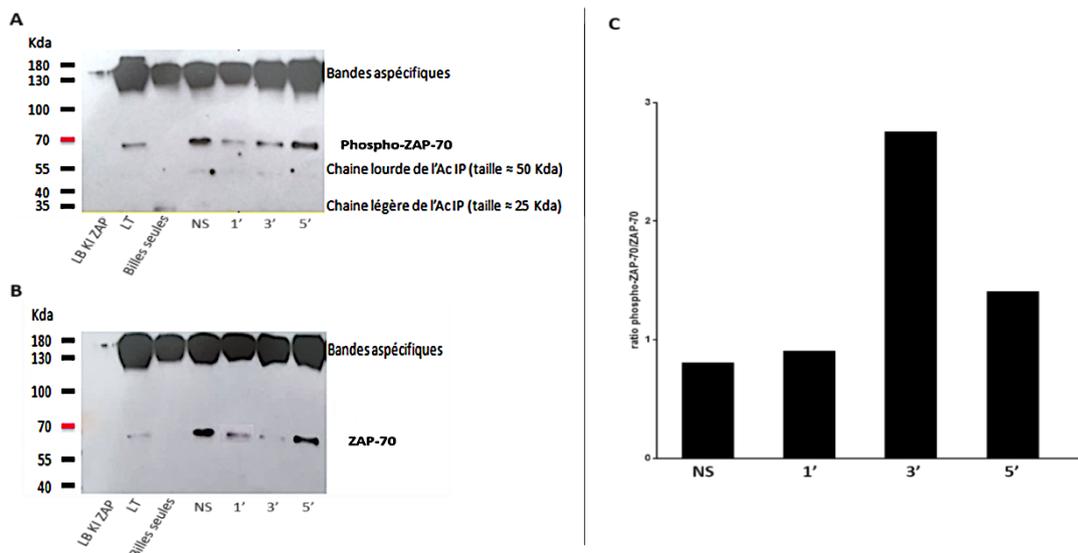


Figure 69. Phosphorylation de ZAP-70 après stimulation du BCR

Des LB spléniques triés (CD43⁻) d'une SoZAP^{High} et d'une souris contrôles KI ZAP ont été stimulés par anti-IgM (5 µg/mL) et analysés à 1, 3, et 5 minutes. ZAP-70 a été immunoprécipitée puis le produit a été analysé par Western blot en utilisant un anticorps anti-phosphotyrosines (A) puis un anticorps anti-ZAP-70 (B), comme contrôle de l'immunoprécipitation. L'intensité de la bande de la protéine phosphorylée a été rapportée à l'intensité de la bande de ZAP-70 correspondante (logiciel ImageJ) (C). Un extrait protéique immunoprécipité de LT stimulés par anti-CD3 (1 µg/mL) et anti-CD28 (5 µg/mL) a été utilisé comme contrôle positif. Un extrait protéique immunoprécipité de LB KI ZAP non stimulés et un extrait protéique de LB KI ZAP-Mb1 auquel ont été ajoutées les billes sans l'anticorps anti-ZAP-70 ont été utilisés comme contrôles négatifs.

kDa : kilo dalton ; Ac : anticorps, IP : immunoprécipitation ; NS : non stimulés

Au total, la stimulation du BCR des LB spléniques triés exprimant ZAP-70 était associée à une augmentation significative du flux calcique intracellulaire dans les LB des SoZAP^{High} mais pas dans les LB des SoZAP^{Low}

Les résultats des statuts de phosphorylation sont préliminaires mais peuvent suggérer qu'il existe dans les LB des SoZAP^{High} après stimulation du BCR :

- Une possible hypophosphorylation de SYK
- Un possible retard de phosphorylation de la voie I κ B
- Une possible hyperphosphorylation précoce de ZAP-70, maximale à 3 min

7. CONCLUSIONS DE LA PARTIE MURINE

Notre modèle murin est le premier à exprimer de manière conditionnelle ZAP-70 dans les LB, dès le stade proB, permettant ainsi l'étude *in vivo* des conséquences fonctionnelles de cette expression sur les LB et ce, dès l'ontogénie précoce.

Les principales altérations phénotypiques et fonctionnelles observées sont résumées dans le tableau 18.

Le modèle est valide et de façon étonnante, il est observé 2 profils bien distincts d'intensité d'expression de ZAP-70 et de la protéine rapporteuse GFP par les LB : LyGFP^{Low} et LyGFP^{High}, en proportions variables et non prévisibles selon les souris,

D'un point de vue physiologique au niveau d'un organisme entier, nous avons ainsi privilégié, quand cela était possible, la comparaison non pas des LB entre eux selon l'intensité d'expression de la GFP, mais plutôt les souris selon leur proportion de LyGFP^{High}, en définissant les SoZAP^{Low} (LyGFP^{High} \leq 50 % des LyGFP Totale) et les SoZAP^{High} (LyGFP^{High} > 50 % des LyGFP Totale).

Ainsi, bien que les souris de ce modèle ne développent pas de signes de lymphoprolifération, elles partagent tout de même quelques caractéristiques communes avec la LLC, telles qu'une hypo-IgG et hypo-IgM, et la production d'IgM et d'IgG circulant autoréactifs. Ces LB ZAP-70⁺ sont aussi enrichis en cellules activées et proliférantes à l'état basal hors stimulation, ceci se maintenant sous diverses stimulations, notamment impliquant le BCR, pouvant refléter une hypersignalisation précoce du BCR suite à sa stimulation.

D'autre part, il semble exister un blocage partiel du switch isotypique et une réduction des LB des centres germinatifs à l'état basal, ce qui est cohérent avec le déficit observé en IgG et IgM totales.

Il est à noter que l'ensemble de ces éléments était principalement observé pour les SoZAP^{High}, renforçant l'hypothèse d'altérations induites en rapport avec l'expression de ZAP-70 mais surtout en lien avec l'intensité d'expression de cette protéine. Ceci sera discuté dans le chapitre suivant.

Tableau 18. Principales altérations phénotypiques et fonctionnelles du modèle murin KI ZAP-Mb1

A) Comparaisons phénotypiques à l'état basal et des stimulations *in vitro* entre les souris KI ZAP et les souris KI-ZAP-Mb1 selon la proportion de LyGFP^{High} : SoZAP^{Low} (LyGFP^{High} ≤ 50 % des LyGFP Totale) et SoZAP^{High} (LyGFP^{High} > 50 % des LyGFP Totale)

B) Comparaisons des réponses anticorps après immunisations entre les souris KI ZAP et les souris KI-ZAP-Mb1 (les différentes souris disponibles au moment de ces expériences ayant globalement le même profil d'expression de ZAP (entre 40 et 60 % de LyGFP^{High}) la comparaison des sous-groupes SoZAP^{Low} vs SoZAP^{High} n'a pu être effectuée)

C) Principales différences phénotypiques à l'état basal entre les LyGFP^{Low} et les LyGFP^{High}, et comparaison aux LB KI ZAP de la différenciation des LyGFP^{Low} et des LyGFP^{High} après immunisations

NS : non stimulés ; CG : centres germinatifs ; ZM : zone marginale ; OVA : ovalbumine ; CSA : cellules sécrétrices d'anticorps

A

	Phénotypage état basal							Stimulations <i>in vitro</i> B triés						
	Immatures	Matures naïfs	Switchés	CG	B1a	B2	[IgG totales]	[IgM totales]	IgG et/ou IgM autoréactives	Prolifération (BrdU)	Activation		[IgG totales]	[IgM totales]
							Sérum				Flux Ca	Surnageants		
Souris ZAP ^{Low}	↗↗	↘↘	↔	↘	↔	↔	↘	↘	↔	↔	↔	↔	↗	↘
Souris ZAP ^{High}	↗	↘	↘	↘↘	↘	↗	↘	↘	↗	↗	↗	↗	↗	↘
Commentaires							M2/M4	> M12	Ag nucléaires principalement	Aussi pour NS	Aussi pour NS + BCR-dépendantes + BCR-indépendantes			

B

	Immunistations															
	OVA + FREUND								NP(0,3)-LPS							
	Ig				CSA				Ig				CSA			
	IgG		IgM		IgG		IgM		IgG		IgM		IgG		IgM	
	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques
Souris ZAP Totales	↔	↘	↔	↘	↔	↔	↔	↘	↔	↔	↔	↘	↔	↔	↔	↔
	J10 et J30		J30										J7			

C

	Phénotype état basal					Immunistations			
	Apoptose médullaire				ZM	OVA + FREUND		NP(0,3)-LPS	
	ProB	PréB	Immatures	Matures		Switchés	CG	Switchés	CG
LB GFP ^{Low}	NA				↔	↔	↔	↔	↔
LB GFP ^{High}	↘↘	↘	↘	↔	↗↗	↗	↔	↗	↗
Comparaison	Low vs High				Vs LB KI ZAP				

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'expression de ZAP-70 n'est pas restreinte aux LT, NK et aux LB LLC. Les résultats initiaux du projet avait en effet permis de d'identifier qu'une fraction des LB non tumoraux des patients atteints de LLC exprimaient aussi ZAP-70, et que l'intensité de cette expression était corrélée positivement à celle dans les LB tumoraux. Il existe ainsi dans la LLC quatre grandes populations de LB : tumoraux CD5⁺, pouvant être ZAP-70⁺ ou ZAP-70⁻, et non tumoraux résiduels CD5⁻ pouvant être aussi ZAP-70⁺ ou ZAP-70⁻.

Toutefois, à ce jour, il n'existe aucune donnée concernant la caractérisation et le rôle des LyB non tumoraux CD5⁻ZAP-70⁺ dans la LLC.

Nous avons vu que l'expression de ZAP-70 ds les cellules tumroales est corrélée à une hypersignalisation de la voie du BCR, à une prolifération cellulaire accrue et que les LB non tumoraux sont à l'origine de la production des auto-Ac polyclonaux responsables des CAI dans la LLC.

Notre travail, portant d'une part sur les LB CD5-ZAP-70⁺ de patients atteints de LLC et d'autre part sur un modèle murin original, exprimant de manière conditionnelle ZAP-70 dans les LB dès le stade proB, a permis d'étudier pour la première fois les conséquences fonctionnelles *ex vivo* et *in vivo* de l'expression de ZAP-70 sur les LB et d'apporter des éléments de réponse novateurs aux interrogations initiales suivantes concernant les LB non tumoraux ZAP-70⁺ :

Du point de vue oncologique :

- Ces LB partagent-ils des caractéristiques communes moléculaires avec le clone tumoral correspondant, pouvant suggérer que ces LB soient des cellules précancéreuses ?
- La surexpression précoce de ZAP-70 dans les LB prédispose-t-elle à la survenue d'une lymphoprolifération B maligne *in vivo* ?

Du point de vue immunitaire :

- Ces LB sont-ils autoréactifs, pouvant suggérer qu'ils soient à l'origine de la production des Ac polyclonaux responsables des CAI dans la LLC ?
- La surexpression précoce de ZAP-70 dans les LB prédispose-t-elle à la survenue de manifestations auto-immunes *in vivo* ?

Ainsi, les données de la partie humaine ont permis de confirmer tout d'abord que les **LB non tumoraux CD5⁺ZAP-70⁺ sont bien polyclonaux et sans lien moléculaire avec le clone tumoral** correspondant. **Ces LB sont principalement mutés par pression de sélection antigénique variée avec une absence de stéréotypie de leur BCR.** Enfin, il semblerait que ces **LB non tumoraux CD5⁺ZAP-70⁺ présentent toutefois un enrichissement en BCR autoréactifs** (réactivité anti-nucléaire et/ou polyréactivité) mais ceci reste à confirmer sur un plus large panel.

Les résultats de la partie murine ont montré **qu'une forte expression de ZAP-70 est associée à un avantage sélectif médullaire des LB, un enrichissement en LB de la ZM, ainsi qu'à un blocage partiel de la maturation et de la différenciation périphérique : augmentation des LB immatures, réduction des LB matures naïfs, des LB des centres germinatifs, des LB matures switchés et réduction des IgG et IgM totales sériques.**

La forte expression de ZAP-70 est aussi associée à un **enrichissement en IgG et IgM sériques autoréactives, une hyperactivation et une prolifération augmentée des LB suite à la stimulation du BCR, mais aussi à une capacité augmentée de ces LB à s'activer sous des stimuli BCR-indépendants.**

Dans cette partie, nous discuterons tout d'abord dans des sous-chapitres différents points techniques et les principaux résultats ci-dessus, puis nous terminerons par une synthèse générale exposant les points discordants concernant les conséquences de l'expression de ZAP-70 dans notre modèle murin.

Détection de ZAP-70 par cytométrie en flux pour le statut des patients LLC ZAP-70⁺

Concernant les LB humains non tumoraux ZAP-70⁺, il était crucial pour l'interprétation des résultats de disposer d'une technique fiable et reproductible permettant de distinguer ces cellules des LB non tumoraux ZAP-70⁻ d'une part, et des LB LLC ZAP-70⁺ d'autre part.

Diverses techniques de détection et de quantification de l'expression de ZAP-70 ont été proposées, telles que la PCR quantitative temps réel, l'immunohistochimie, le Western blot ou encore la cytométrie en flux (Crespo et al., 2003; Wiestner et al., 2003).

L'immunohistochimie, principalement utilisée sur coupes de moelle osseuse, est une technique assez facile et peu onéreuse, mais limitée d'une part par l'accessibilité du matériel organique, les explorations médullaires étant peu fréquentes dans la LLC, et d'autre part par le caractère non quantitatif de la méthode de détection et son interprétation subjective. Le Western blot est une méthode longue et compliquée, nécessitant une isolation pure des différentes populations cellulaires au préalable. La PCR quantitative temps-réel est sensible et précise pour la détection de l'expression de *Zap-70*, mais reste chère et surtout, de même que pour le Western blot, nécessite l'isolement pur des LB afin d'éviter la contamination par des LT/NK qui sont ZAP-70⁺. La cytométrie en flux reste à ce jour la méthode la plus facile et la plus utilisée en pratique clinique pour la détection de ZAP-70. En effet, c'est une technique simple et peu onéreuse, permettant de distinguer l'expression de ZAP-70 de façon séparée dans les différentes populations (LB LLC, LB normaux, LT, LK) sans tri préalable.

Pour toutes ces raisons, la technique de choix retenue pour la détection des LB ZAP-70⁺ dans notre projet a été la cytométrie en flux. Toutefois, la méthode de détection n'est toujours pas standardisée à ce jour, les résultats pouvant varier selon : i) les kits de fixation/perméabilisation de ZAP-70 ; ii) l'Ac et le fluorochrome utilisé ; iii) la stratégie de fenêtrage des différentes populations cellulaires et surtout iv) le seuil de positivité utilisé pour la définition de la positivité pour ZAP-70.

Le type de prélèvement et les conditions de stockage des cellules préalablement au marquage de ZAP-70 ont aussi une influence. Ainsi, l'expression de ZAP-70 étant significativement modifiée en présence d'anticoagulant si l'analyse est effectuée au-delà de 24h après le prélèvement (Best et al., 2006; Letestu et al., 2006) pour l'ensemble des patients, les PBMC ont été isolées par centrifugation par gradient de densité puis immédiatement congelées à -80°C à partir des tubes EDTA contenant le sang total des patients au maximum dans les 12h suivant le prélèvement. L'ensemble des analyses de l'expression de ZAP-70 des LB CD5⁻ ayant été faite à partir de PBMC congelés et son expression ne semblant de toute façon pas différer entre les cellules fraîches ou congelées (Orchard et al., 2004), cet éventuel biais d'analyse était très limité dans notre étude.

Le clone utilisé pour le marquage de ZAP-70 tout au long de notre projet a été le même pour la partie humaine et murine (1E7.2, BD Bioscience). Il reconnaît un épitope conservé à l'intérieur du domaine tyrosine kinase et a été **développé spécifiquement pour la cytométrie en flux**, ce qui n'est pas le cas pour d'autres Ac monoclonaux reconnaissant anti-ZAP-70 (Best et al., 2006). Ce clone présente aussi **une des meilleures résolutions discriminatives disponibles entre les cellules ZAP-70⁺ et ZAP-70⁻** (Shankey et al., 2006). De plus, pour le dépistage des LLC ZAP-70⁺, nous avons utilisé le kit de fixation/perméabilisation **FACS Lysing Solution (BD Bioscience)** qui est recommandé pour la meilleure efficacité avec l'Ac monoclonal correspondant (Bekkema et al., 2008).

Nous avons choisi de définir le seuil de positivité pour ZAP-70 dans les LB CD5⁻ et CD5⁺ en fonction du contrôle isotypique (moins de 0,5 % de LB LLC ZAP-70⁺) (Dürig et al., 2003; Orchard et al., 2004) pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il est plus difficile de se baser sur un seuil de MIF car celui-ci est sujet à des variations entre les différentes expériences et doit ainsi plutôt être utilisé dans un ratio de MIF sur un contrôle interne qu'en tant que valeur individuelle indépendante. D'autre part, le choix du contrôle interne est primordial car l'expression de ZAP-70 peut varier dans les autres populations. En effet, des données ancillaires au début de notre projet ont montré qu'il existait une corrélation positive de l'intensité d'expression de ZAP-70 entre les LB tumoraux et les LB non tumoraux. De plus, il était observé que les LT des

patients atteints de LLC exprimaient aussi plus fortement ZAP-70 que les LT de sujets contrôles. Ceci a aussi été montré dans une étude récente (Rizzo et al., 2013), confirmant que l'évaluation de l'expression de ZAP-70 dans les LB LLC basée sur les différents ratio T/B pour chaque patient n'était pas fiable, que cela soit en termes de pourcentages (Crespo et al., 2003), de MIF (Rossi et al., 2010), ou bien de médianes (Bakke et al., 2006). L'approche par MESF (molecule of equivalent soluble fluorochrome) pourrait représenter une alternative intéressante pour la quantification de l'expression de ZAP-70, basée sur la comparaison avec une courbe étalon (Chen et al., 2007; Kay et al., 2006). Toutefois, le peu de données publiées avec cette méthode malgré le recul laisse suggérer que son utilisation n'est pas si pertinente ou aisée. **Ainsi, le seuil de contrôle isotypique sur LB LLC nous a paru le meilleur compromis pour la quantification de l'expression de ZAP-70 dans les LB tumoraux et surtout non tumoraux.**

*

Utilisation d'une RT-PCR spécifique ZAP-70 pour l'étude du répertoire et production des Ac monoclonaux

La stratégie initiale de tri des LB non tumoraux ZAP-70⁺ directement en pools cellulaires par cytométrie en flux comportait l'avantage d'être plus simple et moins coûteuse en temps et financièrement que le tri sur cellule unique hors marquage ZAP-70. Malheureusement, nous nous sommes heurtés à de très importantes difficultés techniques d'amplification des IGHV et IGLV. Ceci était inattendu car le kit d'extraction d'ARN et les amorces utilisées étaient pourtant théoriquement adaptées pour tissus fixés. La possibilité d'amplification de la β -actine par RT-PCR sur ces mêmes cellules, bien que moins efficace que sur cellules non fixées/perméabilisées, plaide pour un manque de sensibilité de la technique, liée non pas à la dégradation des ARN ou un échec de la transcription inverse, mais aux amorces et/ou aux conditions des PCR1/2. Le facteur responsable le plus évident était probablement une persistance partielle de la liaison du formaldéhyde sur les acides nucléiques, empêchant la fixation correcte des amorces et l'amplification de l'ADNc. La quantité d'ARN codant pour la β -actine

étant physiologiquement plus importante que celle des chaînes lourdes et légères des Ig, ceci peut aussi expliquer la difficulté sélective de l'amplification de ces séquences géniques.

Devant cette impasse technique, nous avons réussi à réduire la quantité de formaldéhyde par quatre tout en gardant un marquage discriminant de ZAP-70. Ceci n'a malheureusement pas suffi à augmenter la sensibilité de la PCR avec les amorces adaptées sur cellules fixées/perméabilisées. Bien que permettant l'obtention de meilleurs résultats d'amplification, l'utilisation d'amorces, plus sensibles, capables d'amplifier des séquences d'Ig sur ADNc synthétisé à partir de cellule unique, donc à partir d'une quantité extrêmement faible d'ADN, n'a hélas pas non plus permis des résultats fiables et reproductibles selon les expériences.

Ainsi, le recours a été de d'éviter l'étape du formaldéhyde afin de pouvoir secondairement amplifier plus facilement les segments de gènes des Ig, mais ceci impliquait donc de se passer de l'étape permettant le dépistage rapide par cytométrie en flux des LB ZAP-70⁺ au profit d'un dépistage par RT-PCR sur cellules uniques CD19⁺CD5⁻ triées préalablement par cytométrie en flux. Cette technique était longue, difficile et coûteuse car elle nécessitait le dépistage d'un grand nombre de LB CD5⁻, la majeure partie de ces cellules étant ZAP-70⁻.

Des LT de patients LLC triés en cellule unique ont été initialement utilisés comme contrôle positif pour la mise au point de la RT-PCR ZAP-70 sur cellule unique dans notre laboratoire. Bien que l'amplification de *Zap-70* soit de 100 % sur ces cellules, nous ne pouvons exclure que seules les cellules exprimant fortement ZAP-70 soient détectées par notre technique. Ainsi, nous ne pouvons pas conclure de façon certaine qu'une cellule unique est bien ZAP-70⁻ si la PCR est négative, cette cellule pouvant être en deca du seuil de détection de la PCR (ZAP^{Low}) ou bien ZAP-70⁻.

Les premières bandes d'intérêts obtenues correspondant à l'amplification des ARNm de *Zap-70* ont été séquencées afin de vérifier l'homologie et la fiabilité de notre RT-PCR spécifique sur cellule unique. Il a ainsi été observé une homologie de 100 % avec la séquence de *Zap-70* antérieurement décrite dans les LT, ce qui est en accord avec les données de la littérature indiquant que les LT et les LB (de LLC et non tumoraux) utilisent le même gène *Zap-70*, qui est aussi identique à celui de la

séquence originale déposée dans les banques de données (Cutrona et al., 2006; Rosenwald et al., 2001). De plus, notre équipe avait confirmé que l'ARNm amplifié de *Zap-70* dans les LB CD5⁻ correspondait bien à celui de la classique isoforme1 et non à la forme tronquée TZK (truncated ZAP kinase) dans laquelle il manque les domaines SH2 et une partie de l'interdomaine B (Kuroyama et al., 2004).

Il est à noter que **notre équipe est la première à notre connaissance à avoir réussi à détecter l'expression de *Zap-70* par RT-PCR sur cellule unique et de plus dans des LB non tumoraux.**

*

Vérification de l'absence de contamination par le clone tumoral

Un autre aspect important pour l'interprétation correcte des résultats de la partie humaine du projet était de **s'assurer que les LB non tumoraux CD5⁻ exprimant ZAP-70 n'étaient pas le reflet d'une contamination par un contingent du clone tumoral correspondant qui aurait perdu en partie l'expression du CD5.**

Pour limiter ce risque, le tri cellulaire des LB (CD19⁺) s'est effectué selon l'intensité d'expression de CD5, avec la sélection des LB bien en deca du seuil de positivité pour CD5 concernant les LB non tumoraux et au contraire CD5^{High} concernant les LB LLC. De plus, les résultats initiaux des tris cellulaires avec cette méthode avaient objectivé que LB CD5⁻ exprimaient plus fortement CD19 et la chaîne légère de surface comparativement aux LB CD5⁺, et surtout que ces **LB CD5⁻ étaient polyclonaux, avec un ratio ratio kappa/lambda normal.** Ceci avait aussi été **démonstré au niveau nucléique par RT-qPCR sur cellules uniques** préalablement triées selon la même stratégie de fenêtrage par cytométrie en flux. **Le caractère polyclonal et distinct du clone tumoral de ces LB non tumoraux ZAP-70⁺ a définitivement été prouvé par l'analyse de leur répertoire (cf ci-dessous).**

Absence de stéréotypie des LB CD5-ZAP-70⁺ et de filiation moléculaire évidente avec le clone tumoral

Nos résultats ont montré que les LB non tumoraux CD5-ZAP-70⁺ différaient entre eux dans l'utilisation des segments de gènes VH, DH, JH et VL, JL utilisés. Ceci était vrai entre les différents LB non tumoraux d'un même patient, mais aussi entre les différents patients. Ces gènes et les CDR3 (chaîne lourde et légère) étaient aussi différents de ceux du clone tumoral correspondant pour chaque patient analysé. Ceci **confirme donc d'une part, au niveau moléculaire, le caractère polyclonal de ces LB CD5-ZAP-70⁺ et suggère fortement d'autre part, malgré le faible nombre de cellules analysées au total, qu'il n'existe généralement pas de lien moléculaire clonal entre eux ni avec le clone tumoral.**

Une exception concerne le patient 2 pour lequel la chaîne légère du seul LB non tumoral disponible était en tout point identique à celle du clone tumoral (cellules 2.A.κ vs 2.CM.κ), en termes de séquences des VL et JL utilisés mais aussi en termes de séquence de la CDR3 et du nombre et du type de mutations. La chaîne lourde est par contre totalement distincte de celle du clone tumoral.

Une hypothèse serait que ce LB non tumoral ZAP-70⁺ soit une cellule autoréactive à partir de laquelle le clone tumoral a émergé par édition du BCR via le remplacement du VH (García-Muñoz et al., 2012; Zhang et al., 2004). Toutefois, plusieurs éléments vont à l'encontre de cette hypothèse : i) l'édition du BCR concerne plus classiquement la chaîne légère (García-Muñoz et al., 2012), ii) en cas de remplacement du VH par édition du BCR, la CDR3 est le plus souvent allongée par incorporation de codons supplémentaire (Zhang et al., 2004), ce qui n'est pas le cas ici avec des CDR3 de taille identique entre le LB tumoral et non tumoral et iii) cette similarité moléculaire n'est observée pour aucune des autres cellules analysées.

Ainsi, il est plus probable que, malgré les précautions prise, ceci résulte d'une contamination par la chaîne légère du clone malin lors des étapes de PCR. L'amplification des différentes chaînes se faisant dans des puits séparés, une contamination peut très bien ne concerner qu'un seul puit.

A l'exception du patient n°3, les **HCDR3 des clones tumoraux étaient plus longues** que celles des LB non tumoraux. Ceci étant une des caractéristiques des LB ayant subi une édition de leur BCR, incluant le remplacement du VH (García-Muñoz et al., 2012; Zhang et al., 2004), **il est ainsi possible que les LB LLC dérivent de LB autoréactifs.**

Concernant le détail des gènes utilisés, la famille V-3 étant celle comptant le plus de gènes, cette famille était de manière attendue la plus représentée dans les chaînes lourdes, mais ceci n'était pas observée pour les chaînes légères ou la famille V-1 était majoritaire, principalement représentée par le sous-groupe 1-39. **Cette répartition préférentielle dans les chaînes légères de la famille V-1 pourrait laisser suggérer une pression de sélection.** Une explication à la sélection de ces segments de gènes particulier pourrait être que certaines de ces cellules ont subi une édition du BCR, incluant le remplacement des VL, du fait d'une potentielle autoréactivité initiale (García-Muñoz et al., 2012). Toutefois, les CDR3 de ces cellules n'étaient pas plus longues que celles des LB CD5⁺ZAP-70⁺ utilisant la famille V-3 dans leur VL, ce qui plaide contre l'édition du BCR (Zhang et al., 2004).

Les **IGHV des LB non tumoraux ZAP-70⁺ analysés étaient principalement mutés** (14/19). Ceci est cohérent avec le fait que ces LB soient des cellules ayant subi la commutation isotypique dans les centres germinatifs suite à un contact antigénique. En effet, nous avons triés uniquement les LB IgM⁻IgD⁻ afin d'enrichir la population d'intérêt en LB switchés, ces cellules étant hypothétiquement celles à l'origine des plasmocytes sécréteurs des Ac polyclonaux responsables des CAI. Un élément renforçant le fait que ces cellules ont subi un contact antigénique est la **très forte majorité de mutations de type non silencieuses (remplaçantes)** dans les CDRs.

L'objectif principal n'étant pas d'étudier précisément la pression de sélection antigénique subie par ces cellules, et le faible nombre de cellules analysées à ce jour ne permettant d'analyses statistiques pertinentes, nous avons opté de rester sur le modèle d'analyse binomiale simple proposée par Shlomchik et al (Shlomchik et al., 1987). Ce modèle considère que les mutations peuvent survenir de façon aléatoire dans toutes les parties du gène de manière égale et qu'un ratio R/S > 2,925 dans les

CDRs est considéré comme la signature d'une sélection antigénique. Ceci est toutefois approximatif car il a été démontré depuis que les HCDRs sont plus susceptibles de subir des mutations non silencieuses que les régions framework suite aux contacts antigéniques (Chang and Casali, 1994). De plus, il existe une variabilité intrinsèque des régions codantes des IGHV, faisant que les CDRs ont une tendance à accumuler plus de mutations R que de mutations S et ce, indépendamment de la pression de sélection antigénique (Dunn-Walters and Spencer, 1998). Cette variabilité intrinsèque devrait être prise en compte dans les analyses de mutations des gènes d'Ig (Bose and Sinha, 2005).

Ainsi, une perspective sera d'augmenter le nombre de LB CD5-ZAP-70⁺ étudiés, à partir d'autres patients, afin de confirmer et d'affiner ces résultats, et de permettre notamment des comparaisons statistiques et l'étude d'éventuels biais de sélection antigénique.

*

Les LB CD5-ZAP-70⁺ seraient enrichis en cellules autoréactives ?

De la même manière que pour l'étude du répertoire, les LB CD5-ZAP-70⁺ ont été triés en cellule unique pour la production d'Ac monoclonaux afin de tester leur autoréactivité(s). Ceci permettait d'évaluer si ces LB étaient enrichis en cellules autoréactives et si les cellules à l'origine de la production des auto-Ac responsables des CAI dans la LLC appartiennent au pool de LB non tumoraux ZAP-70⁺.

La relative négativité des ELISA anti-ADNdb, anti-actine et anti-thyroglobuline et la stricte négativité des tests de Coombs direct et des MAIPA ne permettait pas d'exclure la possibilité que les LB CD5-ZAP-70⁺ puissent tout de même être à l'origine de la production des Ac autoréactifs pathogènes chez les patients. En effet, d'une part, seul un faible nombre d'Ac monoclonaux ont été testés, or la proportion de LB autoréactifs parmi l'ensemble des LB de manière générale très faible. D'autre part, les surnageants ont été utilisés purs et les concentrations en Ac monoclonaux dans ces surnageants étaient faibles, potentiellement en deçà du seuil minimal nécessaire de

positivité de ces tests. De plus, pour des raisons techniques non connues, les concentrations en Ac monoclonaux obtenus dans les surnageants étaient bien inférieures à celles obtenues par l'équipe du Pr Eric Meffre à Yale plaidant pour un plus faible rendement de la transfection dans notre laboratoire. Enfin, les tests de Coombs direct et MAIPA utilisés ici ont par ailleurs été développés pour des analyses de routine en pratique clinique et leurs sensibilités respectives pour les Ac monoclonaux n'est pas connue.

Il est clairement établi que durant l'ontogénie B, un grand nombre de BCR autoréactifs disparaissent du répertoire au stade immature dans la moelle osseuse, de même que durant le passage du stade B transitionnels à B matures naïfs en périphérie, constituant les deux principaux points de contrôles immunologiques des LB (Wardemann et al., 2003). Ainsi, avec les mêmes techniques que celles utilisées dans notre projet, cette étude rapportait que 6 % des BCR des LB matures naïfs présentent une réactivité anti-nucléaire (seule ou cytoplasmique associée) et que 4,3 % sont polyréactifs. **Dans notre projet, il était observé des fréquences plus importantes avec les BCR issus des LBCD5-ZAP-70⁺ switchés.** En effet, 15,5 % (2/13) présentaient une réactivité antinucléaire (seule ou cytoplasmique associée) et 15,5 % (2/13) étaient polyréactifs, ces 4 Ac étaient par ailleurs issus de 4 LB CD5-ZAP-70⁺ différents.

Ainsi, **ces résultats peuvent laisser suggérer que les LB non tumoraux ZAP-70⁺ sont enrichis en cellules autoréactives.** Toutefois, ils portent sur un nombre très limité de cellules qui ne différait pourtant pas des autres en termes d'intensité d'expression de ZAP-70 dans ses LB LLC, de présentation clinique ou du type ce CAI compliquant sa LLC (syndrome d'Evans).

La production et les tests complémentaire de 7 autres clones issus de 3 patients différents sont en cours. Si ces résultats préliminaires se confirment, une deuxième étape sera de produire des Ac monoclonaux issus cette fois-ci de LB non tumoraux ZAP-70⁻ et de comparer leurs autoréactivités à celles des LB ZAP-70⁺.

En cas d'autoréactivité significativement plus importante dans ces derniers, ceci sera alors un argument fort pour une imputabilité de l'expression de ZAP-70 dans la rupture de tolérance de ces LB dans la LLC qui à ce stade, n'est que suspectée.

Nous n'avons par contre pas pu apporter d'éléments de réponse à ce jour concernant l'éventuelle imputabilité des LB non tumoraux ZAP-70⁺ dans les CAI de la LLC en raison des limitations liées à la sensibilité des techniques de Coombs direct et de MAIPA, comme ceci a été discuté précédemment.

Par ailleurs, une approche alternative de détection des LB ZAP-70⁺ autoréactifs par cytométrie avait aussi été essayée dans notre laboratoire (thèse de Dana Gerghus). Ceci consistait à la détection couplée des LB ZAP-70⁺ et de leur liaison spécifique via leur BCR à des auto-Antigènes purifiés marqués (GPIIb/IIIa et RhCE pour les patients LLC compliquée respectivement de PTI et d'AHAI).

Malheureusement, l'analyse du marquage anti-GPIIb/IIIa était rendue impossible du fait de l'absence de contrôle négatif, l'ensemble des sujets sains utilisés comme contrôles présentant des IgM polyréactives liant la GPIIb/IIIa (résultats non montrés). Cette approche a été abandonnée.

La seconde méthode, visant à détecter les LB ZAP-70⁺ reconnaissant les érythrocytes n'a pas encore pu être mise en pratique à ce jour. Des peptides synthétisés à partir de la protéine RhCE, principale cible des Ac dans l'AHAI, ont toutefois été générés. Brièvement, 8 peptides, correspondant à chaque boucle extracellulaire de la protéine RhCE avec 2 peptides pour la seconde et la quatrième boucle, correspondant aux 2 Ag à ces sites (C/c et E/e). Ces peptides ont été biotinylés pour la détection par streptavidine et sont prêts à être testés pour leur interaction avec les LB de patients avec LLC compliquée de CAI. En cas de tests concluants, cette technique de détection pourrait être aussi intéressante dans la caractérisation es LB autoréactifs dans l'AHAI en générale, pas seulement liée à la LLC. De plus, ces peptides pourraient aussi être testés en ELISA afin d'étudier la réactivité des Ac monoclonaux issus des LB non tumoraux ZAP-70⁺ mais aussi de façon plus globale la présence d'auto-Ac dans le sérum des patients avec AHA1.

Une limitation de ces techniques est aussi en lien avec le faible nombre de LB autoréactifs. En effet, comme dans les maladies auto-immunes typiques (ex : LES), les cellules autoréactives représentent une faible proportion des LB circulants (Lieby et al., 2004; Wardemann et al., 2003). De plus, dans la LLC, les LB tumoraux sont

rare (0,01-0,1 % des LB totaux). Ainsi, la détection simultanée des LB non tumoraux et anti-GPIIBIIIa ou anti-RhCE revient à identifier un nombre infime de LB dans la LLC. Toutefois, l'optimisation de ces techniques permettrait à terme leur utilisation pour le tri en cellule unique afin de cibler directement les LB non tumoraux autoréactifs, pour l'amplification par RT-PCR de ZAP-70 et des IGHV, IgVK/IGVL selon les mêmes techniques que dans notre projet actuel, pour analyse de leur répertoire et la production des Ac monoclonaux afin de tester leur(s) autoréactivité(s) autre(s) qu'anti-GPIIBIIIa et anti-RhCE.

Notre modèle murin original, exprimant de manière conditionnelle ZAP-70 dans les LB dès le stade proB, a permis d'étudier, pour la première fois à notre connaissance, les conséquences fonctionnelles de la surexpression précoce et prolongée de ZAP-70 sur les LB à l'échelle d'un organisme entier.

ZAP-70 est exprimé selon 2 niveaux d'intensité dans les LB

Nous avons été surpris de constater 2 populations de LB bien distinctes **LyGFP^{Low}** et **LyGFP^{High}** correspondant respectivement aux LB exprimant faiblement et fortement ZAP-70. Le caractère totalement aléatoire entre les souris, l'absence d'effet fondateur, d'impact du sexe ou de l'âge des souris, et d'arguments pour une sélection positive ou négative des cellules selon leur profil d'expression de GFP, ont fait évoquer une **variabilité d'expression imputable au construit génique et non au transgène.**

Cette hypothèse était renforcée par les mêmes observations, bien que dans une moindre mesure, dans une autre lignée murine KI Trib1-Mb1, obtenue en utilisant exactement la même construction génique que notre modèle et par croisement avec la même lignée *Mb1-Cre^{+/-}* afin de surexprimer TRIB1 de manière conditionnelle spécifiquement dans les LB dès le stade proB.

De plus, Mb1 ne semble pas non plus être en cause. En effet, après croisement de quelques souris *ZAP-70^{+/+}* avec des souris *Lck-Cre^{+/-}*, les souris obtenues KI ZAP-Lck (*Zap-70^{+/-} / Lck-Cre^{+/-}*), il était aussi observé des LyGFP^{Low} et des LyGFP^{High} au sein d'une même souris, en proportions variables selon les souris (résultats non montrés).

Ces 2 profils d'expression de ZAP-70 et de la GFP n'étaient **pas en rapport avec des variations de traduction** car d'une part les résultats de RT-qPCR confirmaient les données protéiques en montrant 2 profils d'expression des ARNm de ZAP-70 (^{Low} et ^{High}) et d'autre part tous ces ARNm étaient porteurs de la même séquence Kozak, permettant une traduction amplifiée de ZAP-70 et de la GFP. Ainsi, ces variations interindividuelles interviennent **très probablement au stade de la transcription, pour des raisons encore inconnues**, au niveau de la fixation/activation de l'ARN polymérase III sur le promoteur synthétique CAG, et/ou plus en amont au niveau des facteurs de transcription régulant l'ARN polymérase III.

Nous avons pris contact avec l'équipe à l'origine de la création du vecteur de recombinaison utilisé (CTV, Dr Klaus Rajewsky (Xiao et al., 2007)). A ce jour, il n'a jamais été observé de variations du niveau d'expression des transgènes utilisés dans leurs différents modèles KI ROSA26. Ceci pose donc toute de même la question de l'imputabilité éventuelle du transgène *Zap-70* dans les différents profils d'expression observés qui, à ce jour, restent non expliqués. Il pourrait être intéressant, sur des LB KI ZAP, de tester l'expression de la GFP induite par TAT-Cre, afin d'observer si la forte expression de ZAP-70 serait uniforme ou non dans les différents LB.

Ainsi, il était nécessaire de comparer aux LB et souris contrôles tous les résultats aussi selon les profils d'expression de ZAP-70 dans les LB. Bien que compliquant et multipliant les analyses murines, le fait d'avoir 2 niveaux distincts d'expression de ZAP-70 dans les LB conférait toutefois l'avantage de permettre l'étude des conséquences de l'expression globale de ZAP-70 mais aussi selon son niveau d'expression dans ces cellules. Ceci permettait ainsi 2 approches différentes mais complémentaires : i) comparer pour chaque souris les LyGFP^{Low} aux LyGFP^{High} ; ii) comparer les souris comportant majoritairement des LyGFP^{High} (SoZAP^{High}) aux souris comportant majoritairement des LyGFP^{Low} (SoZAP^{Low}).

Bien que la comparaison des LyGFP^{Low} vs LyGFP^{High} ait permis de montrer qu'il existait un effet du niveau d'expression de ZAP-70, cette méthode n'analyse n'est pas exempte de biais. En effet, certaines souris contenant une minorité de LyGFP^{High} ou au contraire de LyGFP^{Low}, il était difficile d'apprécier correctement la fréquence des petites sous-populations B au sein de ces sous-groupes de GFP et la pertinence physiologique d'un si petit nombre de cellules est discutable. De plus, les LyGFP^{Low} et LyGFP^{High} interagissant entre eux *in vivo*, il était plus pertinent, notamment pour les analyses fonctionnelles (stimulations et immunisations) d'étudier l'impact de l'intensité d'expression de ZAP-70 sur l'ensemble des LB au niveau d'un organisme entier. Le seuil de 50 % de LyBGFP^{High} utilisé pour la distinction des SoZAP^{Low} et des SoZAP^{High} est arbitraire et donc critiquable, mais nous paraissait le meilleur compromis compte tenu du nombre limité de souris disponibles de chaque type. Il aurait été plus discriminant, dans l'hypothèse d'un effet du niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB, de pouvoir comparer pour chaque type d'expérience des souris très majoritairement vs très minoritairement ZAP^{High} (> 80 % vs < 20 % idéalement). Par problème d'effectifs et du caractère aléatoire de la proportion de SoZAP^{High} obtenue dans chaque portée, ceci n'a pu être effectué que pour les stimulations *in vitro* et reste une limitation de notre projet.

*

Les LyGFP^{High} présentent une apoptose des progéniteurs médullaires proB, préB et immatures significativement réduite comparativement aux LyBGFP^{Low}.

La sélection positive médullaire des LB se fait lors de la transition proB-préB en ne sélectionnant uniquement les cellules ayant un pré-BCR complet et fonctionnel (Goodnow et al., 2005).

D'autre part, il a été démontré chez la souris que ZAP-70 a un rôle fonctionnel redondant avec SYK au point de contrôle du pré-BCR, les deux kinases étant capables, à des degrés divers, de transduire le signal du pré-BCR permettant la différenciation du stade pro-B à pré-B. En effet, un blocage complet au stade proB était

observé dans les souris double KO *Syk*^{-/-}*Zap-70*^{-/-}, alors que ce blocage était partiel dans les souris *Syk*^{-/-}*Zap-70*^{+/+} et absent dans les souris *Syk*^{+/+}*Zap-70*^{-/-} (Schweighoffer et al., 2003). Toutefois, des données de transfection suggèrent que la surexpression de ZAP-70 dans les souris *Syk* KO permet une différenciation normale en préB et la maturation en cellules immatures. (Fallah-Arani et al., 2008). Il semblerait donc que SYK soit la principale kinase pour l'ontogénie précoce des LB mais qu'une surexpression de ZAP-70 puisse pallier à un déficit de SYK. De plus, les proB/PréB contenant aussi LAT et SLP-76, impliquées dans la transduction du signal du TCR, il est probable que ZAP-70 utilise soit les composants de la signalisation du BCR (PI3K et PLC- γ 2), soit ceux du TCR (LAT et SLP-76) pour promouvoir l'expansion et la différenciation des pro-B en pré-B (Oya et al., 2003; Su and Jumaa, 2003).

Ainsi, il est **probable que l'expression plus importante de ZAP-70 dans les LyGFP^{High} de notre modèle, comparativement aux LyGFP^{Low}, leur confère un avantage sélectif ontogénique très précoce en facilitant la signalisation du pré-BCR de façon conjointe avec SYK, ce qui active de façon plus intense et soutenue la voie ERK1/2 et ainsi l'entrée en cycle cellulaire des préB et leur expansion et expliquerait aussi l'apoptose moins fréquente des proB et des préB GFP^{High}** (Königsberger et al., 2012).

D'autre part, la sélection négative médullaire des LB s'effectue au stade immature par test de tolérance aux auto-Ag. Les LB immatures reconnaissant les ligands du soi polyvalents subissent une délétion clonale par apoptose ou une édition du BCR, ceux fixant des Ag du soi capables d'interconnecter les BCR vont devenir anergiques, et ceux reconnaissant des Ag solubles du soi avec une faible affinité ou des Ag monovalents incapables d'interconnexion des BCR vont devenir des clones ignorants (Goodnow et al., 2005).

Ainsi, l'apoptose plus faible des immatures GFP^{High} reflète une sélection négative moindre de ces cellules. Si les LyGFP^{High} sortant de la MO étaient principalement de type anergique, il aurait été attendu d'observer un enrichissement en LB T3 (CD93⁺CD23⁺IgM^{Low}) (Merrell et al., 2006), et une incapacité de ces cellules à s'activer et à proliférer suite à la stimulation du BCR, ce qui n'était pas le cas dans

notre modèle (cf discussion ci-après). Une édition importante du BCR est aussi peu probable car les SoZAP^{High} présentent un net enrichissement en IgM et IgG circulantes autoréactives. **Les hypothèses les plus probables restent que les LyGFP^{High} soient des cellules ignorantes de par une faible affinité de leur BCR ou que ces cellules aient une signalisation plus faible de leur BCR, permettant dans les deux cas leur survie et leur migration en périphérie.**

*

La forte expression de ZAP-70 dans les LB est associée à un enrichissement en auto-Ac circulants, mais sans conséquences cliniques.

Comparativement aux SoZAP^{Low} et aux souris contrôles, les **SoZAP^{High} présentaient un enrichissement en IgG et IgM sériques autoréactives avec de multiples spécificités antigéniques.** Ces souris ne développaient toutefois pas de symptomatologie auto-immune (absence de cytopénies ou de néphropathie). Il est à noter qu'une auto-immunité purement sérologique est observée chez 8-41 % des patients LLC (Hodgson et al., 2011). Toutefois, chez ces patients, les Ac étant polyclonaux, il n'est pas possible d'évaluer précisément leur caractère polyréactif ou non.

Il était aussi observé un **enrichissement en LB de la ZM parmi les LyGFP^{High},** au dépend des LB folliculaires. Les LB de la ZM sont potentiellement autoréactifs car ils produisent les Ac « naturels », polyréactifs, de faible affinité, dont les fonctions sont multiples (élimination des débris cellulaires, transport de cytokines ou encore formation des complexes antigènes/anticorps présentés aux cellules B folliculaires par les cellules dendritiques folliculaires dans les centres germinatifs).

La force du signal médié par le BCR conditionne le devenir phénotypique des LB en périphérie. En effet, il a clairement été démontré que les LB T2 recevant des signaux de survie par BAFF pouvaient se différencier en LB de la ZM ou en LB

folliculaires selon l'intensité du signal médié par le BCR. Ainsi, les LB de la ZM semblent provenir de la différenciation des LB T2 CD21^{High}, une sous population des LB T2, par sélection positive suite à la propagation d'un signal faible du BCR via Notch2 et l'activation de NF-κB, alors que les LB folliculaires de type I semble dériver des cellules T2 soit grâce à une sélection positive par l'antigène et un signal transduit du BCR via BTK (type I), soit via un signal tonique du BCR en l'absence de stimulation antigénique (type II) (Cariappa et al., 2001; Pillai and Cariappa, 2009).

D'autre part, dans un modèle murin transgénique exprimant ZAP-70 en remplacement de SYK, il existait un blocage partiel de l'ontogénie B au stade proB avec réduction des LB totaux en périphérie, mais il était observé un enrichissement en LB de la ZM qui était associé à une autoréactivité biologique, notamment anti-insuline, pouvant refléter un défaut de sélection négative médullaire des progéniteurs parvenant au stade immature (Königsberger et al., 2012). Ceci confirme que ZAP-70 reste inférieure à SYK pour la transmission du signal médié par le BCR, et qu'une plus faible signalisation du BCR est associée au développement préférentiel de LB de la ZM et d'une auto-immunité. Enfin, de façon plus générale, il est observé que l'expansion de LB de la ZM, notamment dans les lymphomes, est associée à la survenue de manifestations auto-immunes, principalement biologiques (CAI notamment) (Teixeira Mendes and Wotherspoon, 2017). Ceci étant moins fréquemment observé dans les autres lymphomes, l'imputabilité des LB de la ZM dans ces complications auto-immunes est plausible ou probable .

Ainsi dans notre modèle, il est possible que les LyGFP^{High} aient une signalisation du BCR altérée résultant en un défaut de sélection négative médullaire et une différenciation préférentielle en LB de la ZM, pouvant faciliter la survenue d'une auto-immunité.

La forte expression de ZAP-70 pourrait entrer en compétition avec l'action physiologique de SYK dans la signalisation du BCR, résultant en une plus faible signalisation du BCR. Ceci semble être effectivement le cas sur nos résultats préliminaires et sera détaillée dans la section correspondante plus loin dans le texte.

Bien qu'il n'ai pas été observé de lymphopénie chez nos souris, *il serait intéressant de doser BAFF* car il a été montré que BAFF pouvait prévenir la délétion

périphérique de LB autoréactifs non anergiques et permettre leur survie au sein de la ZM (Thien et al., 2004). La voie du NF-κB semble aussi intéressante à analyser en détail car des données ont montré que l'activation préférentielle de la voie canonique NF-κB suite à l'activation du BCR, permette la différenciation préférentielle en ZM plutôt qu'en folliculaires (Sasaki et al., 2006).

Enfin, la réduction significative des LB1a dans les l'ensemble des souris KI ZAP-Mb1 et notamment dans les SoZAP^{High} pourrait aussi participer à la rupture de tolérance.

En effet, les LB1a sont une source importante de production d'IL-10, cytokine immunosuppressive impliquée notamment dans la régulation négative des réponse cellulaires immunes et la prévention de la rupture de tolérance (DiLillo et al., 2010). D'autre part, il a été suggéré que l'induction d'un phénotype B1 pourrait permettre de tolérer des LB exprimant certaines spécificités antigéniques nécessaires pour la production d'Ac naturels polyspécifiques de faible affinité (Berland and Wortis, 2002). Toutefois, des données contradictoires montrent que la survenue d'auto-immunité dans les modèles murins serait plutôt associée à un expansion anormale des LB1, via la production d'Ac naturels polyréactifs devenant de haute affinité et leur capacité augmentée de présentation antigénique aux LT (Duan and Morel, 2006). Néanmoins, un fort signal du BCR semblant nécessaire pour induire une différenciation en LB1 (Berland and Wortis, 2002; Pillai et al., 2005), **l'hypothèse d'une plus faible signalisation du BCR en cas d'expression de ZAP-70 pourrait ainsi résulter en partie à une incapacité à induire une différenciation en LB1 comme observé dans notre modèle, pouvant ainsi favoriser une rupture de tolérance.**

Enfin, des données préliminaires très intéressantes ont été présentées en communication orale à l'ASH en 2011, à partir d'un modèle murin KI ZAP-70 exprimant différents niveaux de ZAP-70 dans les LB non tumoraux (Gobessi et al., 2011). Brièvement, le gène *Zap-70* était sous le contrôle, soit du promoteur VH (VH-ZAP70) permettant une expression faible de ZAP-70 (10 fois inférieure à celle dans les LT murins normaux), soit du promoteur CD19 (CD19-ZAP70) permettant un niveau d'expression de ZAP-70 comparable à celle des LT. Contrairement à notre

modèle, il n'était pas observé de différences en termes de pourcentages de LB ZM ou folliculaires spléniques ni de LB1 péritonéaux entre les souris VH-ZAP70, CD19-ZAP70 et wild type. **Les auteurs suggéraient qu'une expression anormale de ZAP-70 dans les LB, même de forte intensité, n'affectait pas le développement normal des LB et leur maturation. Ceci est donc en contradiction avec notre modèle où il existe un enrichissement en LB de la ZM et une réduction des LB folliculaire et des LB1a, notamment parmi les LB exprimant fortement ZAP-70.**

*

L'expression de ZAP-70 altère la maturation des LB en périphérie et leur réponse aux Ag T-dépendants.

En effet, nous observons que les SoZAP^{High}, mis aussi les SoZAP^{Low} **sont enrichies en LB de type immatures** (IgM⁺IgD⁻) (et dans une moindre mesure en LB transitionnels T1, T2 et T3) avec au contraire une **réduction des LB matures naïfs** (IgM⁺IgD⁺) et **matures switchés** (IgM⁻IgD⁻IgG⁺). Il existe aussi une **tendance à la réduction des plasmablastes et des plasmocytes** ainsi qu'une **réduction significative des LB de phénotype CG**. L'ensemble de ces éléments est ainsi **cohérent avec la réduction observée en IgG et IgM totales sériques** chez ces souris.

L'hypogammaglobulinémie est fréquemment observée dans la LLC. Sa physiopathologie est complexe et encore peu claire à ce jour, faisant intervenir entre autres l'inhibition par le clone tumoral de la différenciation plasmocytaire des LB résiduels non tumoraux, mais aussi des anomalies fonctionnelles intrinsèques de ces LB non tumoraux CD5⁻ (Wadhwa and Morrison, 2006). Les résultats initiaux de ce projet ayant montré pour la première fois que ces LB non tumoraux résiduels exprimaient ZAP-70 et une réduction des IgG et IgM sériques totales étant observée chez nos souris KI ZAP-Mb1, l'expression de ZAP-70 dans les LB CD5⁻ pourrait être une piste physiopathologique intéressante à l'hypogammaglobulinémie dans la LLC.

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer les anomalies phénotypiques observées dans notre modèle murin.

Les modèles KO *Syk*^{-/-}*Zap*^{+/+} ont montré que les LB immatures sont capables de migrer en périphérie, mais subissent un phénomène d'exclusion folliculaire splénique en restant bloqués dans la pulpe rouge et hors des zones T, avec une durée de vie réduite (Turner et al., 1995). Ces cellules sont de plus incapables de se différencier en LB matures, imputable au défaut intrinsèque de SYK, qui ne permet plus la transmission de la signalisation intracellulaire suite à l'activation du BCR (Cornall et al., 2000; Turner et al., 1997). Notre modèle partage ce phénotype mais à un degré moindre. Ceci est probablement dû à l'expression conservée de SYK, qui pourrait expliquer du moins en partie, qu'une partie des LB ZAP-70⁺ puisse tout de même se différencier en LB matures en périphérie. Les niveaux d'expression de ZAP-70 étant variables selon les souris, il est très probable que ces 2 kinases interagissent de façons différentes dans la propagation du signal du BCR selon leur degré respectif d'expression. Ainsi, comme évoqué précédemment, **il est possible qu'en cas de forte expression de ZAP-70, cette dernière entre en compétition avec le rôle physiologique de SYK. Cet effet du niveau d'expression de ZAP-70 pourrait expliquer, du moins en partie, les variations phénotypiques observées entre les LyGFP^{Low}/GFP^{High} et les SoZAP^{Low}/ZAP^{High}.**

La réduction des LB des CG pourrait résulter d'un phénomène d'exclusion folliculaire des LB ZAP-70⁺, ce qui empêcherait ainsi une réponse T-dépendante au sein des CG et résulterait en une absence de switch et de production d'IgG (Goodnow et al., 2005).

Cette réduction des LB des CG et switchés ne semble pas être uniquement le reflet de la plus faible proportion de LB matures naïfs. En effet, alors que ce sont les SoZAP^{Low} qui présentent majoritairement une réduction en LB matures naïfs, c'est au contraire parmi les SoZAP^{High} que sont observées les plus fortes réductions en LB des CG, en LB switchés et en IgG et IgM sériques.

Au total nos **résultats suggèrent que le niveau d'intensité d'expression de ZAP-70 peut influencer différemment les caractéristiques des LB selon leur**

stade de maturation et semble entrainer un blocage partiel de différenciation au stade immature.

D'autre part, il n'était pas observé de différences phénotypiques dans les ganglions et ainsi ces résultats étaient discordants avec ceux observés dans les spléniques. Ceci peut résulter du fait que nous avons effectué les analyses sur des ganglions cutanés (axillaires et inguinaux) qui sont dans les territoires de drainages des membres, sites les plus sujets aux lésions cutanées. Ainsi, il est possible que les disparités des valeurs observées dans ces ganglions soient liées à des niveaux variables d'inflammations et d'activation locale du système immunitaire, ne reflétant pas un désordre systémique. Ainsi, à la différence de la rate, les ganglions périphériques ne sont probablement pas un bon reflet du phénotype des LB dans les OLS car satellites de lésions cutanées. Il aurait été préférable d'analyser des ganglions profonds notamment rétropéritonéaux ou thoracique. C'est ce qui a été fait pour les analyses anatomopathologiques, dont les analyses sont en cours.

Les résultats des stimulations *in vitro*, bien que limités de par le faible effectif et le nombre minime de cellules analysables, confortent en partie les résultats observés à l'état basal en montrant aussi une réduction de la différenciation en plasmablastes et dans une moindre mesure en plasmocytes sous LPS, ainsi qu'une hypoproduction significative d'IgM. Il est toutefois paradoxalement observé une hyperproduction d'IgG sous anti-IgM + antiCD40 + IL-4 + IL-21 ainsi qu'un enrichissement en plasmablastes et dans une moindre mesure en plasmocytes. **Ceci suggère que l'effet du niveau d'expression de ZAP-70 est probablement variable selon le stade de maturation et/ou les conditions de stimulation des cellules.**

Cette expérience de différenciation plasmocytaire in vitro méritera d'être renouvelée afin de confirmer ou non ces résultats préliminaires.

Il était intéressant d'analyser par des immunisations les conséquences fonctionnelles *in vivo* de l'expression de ZAP-70 dans des LB stimulés soit par un Ag T-dépendant (OVA) soit T-indépendant (NP(0,3)-LPS). De manière intéressante, seule

l'immunisation par OVA entraînait des différences, avec une réduction significative de la production des IgG et IgM spécifiques anti-OVA, précoce et persistante pour les IgG et plus tardive pour les IgM. Ceci est probablement en rapport avec la réduction du nombre de cellules sécrétrices d'Ac spécifiques de l'OVA, comme le suggèrent les données des ELISPOTs, notamment pour les IgM.

Cela rappelle les caractéristiques de l'hypo-IgG basale observée à l'état basal, précoce et perdurant à M14, alors que l'hypo-IgM ne débutait qu'à M12. Les causes de ce phénomène seront à éclaircir.

L'absence de différences observées pour le NP(0,3)-LPS **peut laisser suggérer que l'activation T-dépendante des LB est altérée en cas d'expression de ZAP-70**, et ce malgré l'utilisation de l'adjuvant de Freund qui entraîne classiquement une forte réponse Ac, **alors que l'activation T-indépendante est conservée**. Ce point est cohérent avec la réduction des LB des CG à l'état basal, lieu privilège des interactions T/B, ainsi qu'à l'inverse une expansion des LB de la ZM, qui ne nécessitent pas ce type d'interaction. Les raisons de ces différences entre les réponses T-dépendantes et T-indépendantes restent à préciser.

*

La forte expression de ZAP-70 dans les LB est associée à un phénotype activé et à une prolifération augmentée de ces cellules

Alors que l'ensemble des résultats discutés précédemment vont plutôt dans le sens d'une signalisation altérée du BCR en cas de forte surexpression de ZAP-70 dans ces cellules, nous observons paradoxalement chez les **SoZAP^{High}** un **enrichissement en LB proliférant de façon spontanée**, et conservant une **prolifération augmentée sous stimulation par anti-IgM + agoniste du CD40 + IL-4**. Ces mêmes souris présentent aussi un **enrichissement en LB activés à l'état basal et une hyperactivation sous différents stimuli BCR-dépendants et BCR-indépendants** (LPS ou CpG).

Les seules données disponibles à ce jour sur l'étude de la prolifération des LB ZAP-70⁺ concerne les LB LLC ou il est clairement démontré que l'expression de ZAP-70 favorise leur prolifération clonale en entraînant une signalisation chronique et accrue du BCR suite à sa stimulation directe (Chen, 2005; Zhang and Kipps, 2014). Cette hypersignalisation du BCR résultant en une prolifération accrue des LB LLC ZAP-70⁺ est aussi observée via la stimulation directe du TLR9 par CpG, suggérant que ZAP-70 est capable d'intégrer des signaux activateurs indépendants du BCR et de faire le lien entre immunité innée et adaptatrice (Wagner et al., 2016). Toutefois, bien que cela nécessite une faible présence de stimuli, ces derniers sont nécessaires et il n'est pas rapporté de prolifération spontanée de ces LB LLC ZAP-70⁺ (Packham et al., 2014), contrairement à notre modèle.

D'autre part, les LB LLC ont un phénotype de LB activés. Ceci a été observé via l'expression constitutive de divers marqueurs membranaires tels que CD69, CD40 ou CD71 (Damle et al., 2002), mais aussi devant un profil transcriptomique similaire aux LB non tumoraux activés (Li et al., 2011; Rosenwald et al., 2001). Ce phénotype d'activation est d'autant plus marqué dans les LB LLC non mutés et donc probablement dans les LB LLC ZAP-70⁺ (Damle et al., 2002). Dans ces cellules, l'activation cellulaire semble lié à la localisation nucléaire constitutive de NF- κ B et de NF-AT qui est une caractéristique des LB LLC, et cette affinité augmentée pour la liaison à l'ADN est associée à une progression plus rapide la LLC (Hewamana et al., 2008; Schuh et al., 1996).

Concernant les LB non tumoraux ZAP-70⁺, les données sont peu nombreuses mais ces cellules semblent avoir aussi un phénotype activé (CD38⁺) (Cutrona et al., 2006; Nolz et al., 2005; Toluoso et al., 2009), associé à l'intensité d'expression de ZAP-70 dans ces cellules (Nolz et al., 2005). Les seules données indirectes concernant la prolifération des LB non tumoraux ZAP-70⁺ provient de l'étude d'un modèle murin *Zap-70* KO avec expression conservée de SYK où il n'existait pas de différence en termes de flux calcique ou de prolifération comparativement aux souris wild type (Fallah-Arani et al., 2008). Les auteurs concluaient que le rôle de ZAP-70 dans l'activation et la prolifération des LB non tumoraux est nul ou non détectable en présence de SYK. Ceci est relativiser car le niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB analysés était très faible, de l'ordre de 4-6 % de l'intensité des LT rendant possiblement son impact fonctionnel effectivement nul ou négligeable dans ces cellules.

Ainsi, aux vues de nos résultats, il est **probable qu'en présence d'une intensité plus forte de ZAP-70, comme dans les LyGFP^{High} de notre modèle, cette kinase ait une action pro-activatrice et proliférative sur les LB.**

D'autre part, l'expression de CD38 dans les LB ZAP-70⁺ est particulièrement intéressante. En effet, CD38 n'est pas qu'un marqueur d'activation cellulaire. Cette molécule participe à la régulation des LB humains et murins via l'activation de substrats intracellulaires tels que LYN et FYN menant à l'augmentation de l'activation de NF-κB, et participe aussi à l'augmentation du flux calcique et de diverses molécules impliquées dans la prolifération cellulaire. (voir pour revue (Vences-Catalán and Santos-Argumedo, 2011). De manière intéressante, l'expression de CD38 est maximale dans les LB de la ZM, son engagement est associé à une augmentation de la signalisation du BCR et possiblement à une inhibition partielle de la différenciation plasmocytaire. CD38 est aussi un facteur de mauvais pronostic dans la LLC, car de par sa liaison à CD31 présent à la surface de nombreux types cellulaires du microenvironnement, CD38 est capable d'activer ZAP-70 et les voies des MAPK/ERK et d'augmenter ainsi indirectement la signalisation du BCR et la prolifération des LB LLC mais aussi indirectement via la formation d'un complexe multiprotéique impliquant CD38, ZAP-70, CD49d, CD44 et MMP-9 (Zhang and Kipps, 2014). Le(s) ligand(s) naturel(s) de CD38 chez la souris est toutefois inconnu à ce jour. Ainsi, il est possible que dans notre modèle murin, les LB des SoZAP^{High} surexpriment CD38 de manière constitutive, et que cette co-expression ZAP-70/CD38 participe à une hypersignalisation chronique du BCR, ainsi qu'à l'activation et la prolifération cellulaire accrue observées dans ces cellules.

Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de CD38 à la surface des différentes populations de LB dans notre modèle.

Au total, **nos données suggèrent pour la première fois dans des LB non tumoraux qu'une forte expression de ZAP-70 est associée à un phénotype activé et à une prolifération accrue de ces cellules, à l'état basal et après stimulation impliquant le BCR suggérant une signalisation tonique et facilitée du BCR par ZAP-70.** L'hyper-activation de ces cellules est aussi observé sous stimulation par CpG

ou par LPS suggérant que **ZAP-70 pourrait être aussi impliqué dans l'intégration d'autres signaux activateurs indépendants du BCR, et capable de transduire ces signaux en intracellulaire comme cela est observé dans la LLC** (Wagner et al., 2016).

Ceci est donc discordant avec les données phénotypiques et l'hypo-IgG/IgM plaidant plutôt pour une signalisation altérée du BCR en cas de forte expression de ZAP-70.

Des analyses complémentaires de stimulation des LB spléniques à différents temps sont nécessaires pour étudier i) la prolifération incluant différents stimuli BCR-indépendants ; ii) l'expression d'autres marqueurs membranaires tels que CD38 ; iii) l'apoptose et iv) la différenciation plasmocytaire. Ceci permettrait de mieux préciser s'il existe un avantage prolifératif mais aussi de survie selon le niveau d'expression de ZAP-70, et si les l'hyperactivation précoce observée à 48h se maintient plus tardivement (72h ou 96h par exemple)

*

La forte expression de ZAP-70 dans les LB est associée à une augmentation du flux calcique participant à l'activation cellulaire après stimulation du BCR.

Les interactions entre ZAP-70 et SYK dans les LB est très peu connue.

Dans les LB normaux à l'état basal, SYK est déjà à proximité ou fixée sur le BCR (Alsadeq et al., 2014; Infantino et al., 2010). Lors de la stimulation du BCR par une anti-IgM, le recrutement de SYK au BCR est fortement augmenté dès 1 min et diminue à partir de la 5^e minute de stimulation, et s'accompagne d'une augmentation du flux calcique. Le recrutement de ZAP-70 s'effectue beaucoup plus tardivement, après 15 et 30 min de stimulation, et sans modification du flux calcique (Alsadeq et al., 2014). Dans les LB double KO pour Syk et l'inhibiteur du récepteur du BCR *Ship-1*, une co-localisation BCR/ZAP-70 est observée à l'état basal et augmente significativement après 1 min de stimulation, comme dans les LB non mutés, mais

toujours sans retentissement sur le flux calcique (Alsadeq et al., 2014). Ceci suggère que ZAP-70 pourrait se substituer à SYK en cas d'absence de cette kinase, mais sans sa capacité à activer le flux calcique, ce qui est cohérent avec les données précédentes stipulant que ZAP-70 est moins efficient que SYK pour la transmission du signal médié par le BCR.

Dans notre modèle où l'expression de SYK est conservée et associée à une surexpression de ZAP-70, nous observons une **phosphorylation** basale de **SYK** non modifiée, mais qui est par contre **diminuée dès les premières minutes de stimulation** par l'anti-IgM, ceci se maintenant jusqu'à la 10^e minute. **Au contraire, la phosphorylation de ZAP-70 à l'état basal augmentait dès 1 min pour un maximum à 3' pour tendre à diminuer à 5 minutes.**

D'autre part le **flux calcique était significativement augmenté dans les SoZAP^{High} après stimulation par l'anti-IgM mais pas dans les SoZAP^{Low}.** Ces données sont **cohérentes avec l'enrichissement en LB activés (CD69⁺CD86⁺) observé à l'état basal et après stimulation du BCR chez les SoZAP^{High}.**

Cette phosphorylation basale de ZAP-70, augmentée rapidement après stimulation du BCR, associée à l'augmentation significative du flux calcique sont concordantes avec les données observées dans les LB LLC ZAP-70⁺ ou les LB LLC ZAP-70⁻ transfectés à l'aide de vecteurs adénoviraux contenant le transgène *Zap-70* (Chen, 2005; Chen et al., 2002). Ces données de phosphorylation augmentée de ZAP-70 après stimulation du BCR ont aussi été observées dans les LB non tumoraux amygdalien issus de patients sains (Nolz et al., 2005). Dans ces études, il était par contre observé une hyperphosphorylation de SYK, suggérant que cette dernière reste la kinase principalement impliquée dans la signalisation suite à l'activation du BCR. Toutefois, l'utilisation de LB de LLC a comme principale limitation que ces cellules restent des LB tumoraux, bien que n'exprimant pas ZAP-70 de manière constitutive avant transfection. Les résultats ne peuvent donc pas être extrapolés aux LB non tumoraux, à la différence de notre modèle. D'autre part, les niveaux d'expression de ZAP-70 dans les LB amygdaliens étant faibles, il est difficile d'effectuer une comparaison de phosphorylation avec SYK.

Bien que très intéressants, nos résultats sont toutefois préliminaires et il conviendra notamment de confirmer les résultats de phosphorylation de SYK et de ZAP-70 sur d'autres SoZAP^{High} et de les comparer aux SoZAP^{Low}.

ZAP-70 étant négativement régulée par SHP-1 dans les LT (Kosugi et al., 2001; Plas et al., 1996) et SHP-1 étant elle-même inhibée par les ROS sous la dépendance du flux calcique intracellulaire (Reth, 2002), il serait ainsi intéressant d'étudier dans un second temps dans notre modèle les effets des inhibiteurs et activateurs du BCR tels que SHP-1 /SHIP et SHP-2 et CD148, ainsi que de la production des ROS.

Au total, la phosphorylation basale de ZAP-70 pourrait refléter dans notre modèle, à l'instar des LB LLC, une stimulation chronique du BCR (Petlickovski et al., 2005) et en cas de forte expression de ZAP-70, cette kinase pourrait agir précocement en lieu et place de SYK dans la signalisation précoce du BCR et permettre l'augmentation du flux calcique intracellulaire.

Nos résultats suggèrent ainsi, pour la première fois dans un modèle non tumoral, que l'expression de ZAP-70 dans les LB est capable de sensibiliser le signal calcique et d'activer précocement ces cellules par stimulation du BCR.

Ceci n'étant pas le cas en cas d'expression faible de ZAP-70 (SoZAP^{Low}), cela renforce l'hypothèse d'un effet du niveau d'intensité d'expression de ZAP-70 dans la signalisation du BCR.

Nous avons donc cherché à étudier quelles pouvaient être les voies de signalisation du BCR impliquées dans cet état d'hyperactivation de ces cellules. Les protéines du complexe du BCR (SYK, BLNK, PLC- γ) étant à l'origine de l'activation simultanée de différentes voies et leur phosphorylation étant moins stable que les protéines d'aval après stimulation du BCR, nous avons privilégié l'étude d'effecteurs plus en aval dans les voies de signalisation, tels que ERK, AKT et I κ B α qui sont aussi plus spécifiques des voies menant à l'activation des principaux facteurs de transcription.

Le très faible effectif et les écarts type obtenus ne nous ont hélas pas permis d'observer de différence concernant pERK et pAKT, et l'activation de la voie médiée

par IKK semblait même retardée comparativement aux LB contrôles. A la différence du flux calcique et des expériences de stimulations *in vitro*, ces résultats portent toutefois sur un effectif très limité d'échantillons avec une variabilité inter-expérience importante et sont donc difficilement interprétables en l'état.

La répétition de ces expériences est nécessaire sur un plus grand nombre d'échantillons.

Il serait aussi intéressant de pouvoir étudier plus précisément les sites de phosphorylation de SYK et de ZAP-70 suite à la stimulation du BCR. Ceci est toutefois difficile car de nombreux Ac ciblant les tyrosines phosphorylées de ZAP-70 reconnaissent aussi les phosphotyrosines de SYK, du fait de l'homologie entre ces deux molécules. De plus, il semblait difficile de privilégier en première intention un site de phosphorylation précis de ZAP-70 compte tenu de l'incertitude des mécanismes d'action et de régulation de cette protéine dans les LB non tumoraux.

Les seules données de comparaison disponibles à ce jour concernant l'analyse des voies d'activation du BCR dans des LB ZAP-70⁺ proviennent d'une communication orale à l'ASH en 2011 à partir des modèles murins VH-ZAP70 et CD19-ZAP70 détaillés précédemment (Gobessi et al., 2011). Il a ainsi été rapporté que les LB VH-ZAP70 ne présentaient pas d'anomalies de la transduction du signal médié par le BCR, au contraire des LB CD19-ZAP70 qui comportaient des altérations de la phosphorylation de plusieurs molécules telles que SYK et BLNK. Les auteurs suggèrent donc que de faibles niveaux d'expression de ZAP-70 dans les LB ne modifie pas la signalisation du BCR au contraire d'une forte expression de ZAP-70. Le détail des anomalies observées en cas de forte expression de ZAP-70 dans ces LB n'a toutefois toujours pas été publié à ce jour à notre connaissance. Nos résultats préliminaires pourraient aller dans ce sens avec une altération de la phosphorylation de SYK dans les LB surexprimant fortement ZAP-70, mais nécessitent d'être confirmés.

Les rares autres données disponibles concernent les LB LLC ZAP-70⁺ dans lesquels il a été observé une phosphorylation augmentée des protéines du complexe du BCR (SYK, BLNK, PLC- γ) après stimulation du BCR (Chen, 2005; Chen et al., 2002, 2008). Toutefois, persiste la limitation de ne porter que sur des LB tumoraux donc non extrapolable à des LB normaux comme discuté précédemment.

L'expression de ZAP-70 est-elle inducible par stimulations du BCR ou BCR-indépendantes ?

A la différence de la LLC où l'expression de ZAP-70 ne varie pas dans les LB tumoraux pour un même patient, son caractère inducible a été évoqué par quelques équipes pour expliquer sa détection dans des LB non tumoraux de sujets sains avec des résultats contradictoires. Ainsi, trois équipes différentes ont rapporté une augmentation de l'expression protéique de ZAP-70 par immunoblot et/ou par cytométrie en flux dans des LB du sang périphérique ou amygdaliens suite à différentes stimulations comparativement aux LB non stimulés (anti-IgM seule, co-stimulations polyclonales ou encore par CpG) (Bekeredjian-Ding et al., 2008; Nolz et al., 2005; Scielzo et al., 2006). Inversement, une autre équipe observait des taux stables de ZAP-70 dans les différentes sous-populations B suite à des stimulations BCR-dépendantes ou par LPS ou IL-4 (Fallah-Arani et al., 2008).

Dans notre modèle, il existait une **augmentation de la fluorescence de ZAP-70** et de la GFP **sous les différentes stimulations**. Cette augmentation était **supérieure dans les souris KI ZAP-Mb1 comparativement à celle observée pour les souris KI ZAP suggérant une possible induction de l'expression de ZAP-70 après stimulation en plus d'une augmentation de l'autofluorescence**.

Bien que moins marquées, les mêmes constatations étaient observées dans le modèle KI Trib1-Mb1.

Ainsi, à ce stade, et aux vues des données de la littérature ci-dessus, **nous ne pouvons ainsi ni exclure ni conclure que l'expression de ZAP-70 soit en partie inducible dans notre modèle sous stimulations du BCR mais aussi BCR-indépendantes**.

L'augmentation conjointe de l'autofluorescence observée sous stimulation par cytométrie en flux ne permettant pas de trancher, il conviendrait de s'affranchir de l'autofluorescence en stimulant séparément des LyBGFP^{Low} et des LyBGFP^{High} puis en comparant les quantités protéiques et/ou en ARNm de ZAP-70 respectivement en immunoblot et/ou RT-qPCR avant et après stimulation afin de pouvoir conclure en une expression inducible ou non de ZAP-70 dans notre modèle.

Les souris KI ZAP-Mb1 développent des caractéristiques de la LLC

Nos souris n'ont pas développé de LLC, évaluée sur l'apparition d'une lymphoprolifération périphérique, d'un enrichissement en LB CD5⁺ péritonéaux ou médullaires, et/ou d'adénopathies/splénomégalie, comme cela est observé dans le principal modèle murin spontané de LLC E μ -TCL1 (Bichi et al., 2002).

Ce modèle E μ -TCL1 est toutefois différent, utilisant VH comme promoteur conditionnel et IgH comme amplificateur pour l'hyperexpression de *Tcl1* dans les LB à partir du stade immature, cette hyperexpression étant connue pour être observée dans une grande variété d'hémopathies dérivées de la lignée B (Narducci et al., 2000).

De plus, ce modèle n'exprime jamais ZAP-70 (Bichi et al., 2002). Ainsi une équipe a tenter d'évaluer l'impact de différents niveaux d'expression de ZAP-70 dans les souris E μ -TCL1, en les croisant avec les souris VH-ZAP70 ou CD19-ZAP70 détaillées précédemment (Gobessi et al., 2011). Ainsi, les souris VH-ZAP70/E μ -TCL1 développaient une LLC au même âge (7-8 mois) et avec la même évolution que les souris E μ -TCL1, suggérant que de faibles niveaux de ZAP-70 n'influençait pas sur la survenue et l'évolution de la LLC. Les données concernant les souris CD19-ZAP-70/E μ -TCL1 ont été présentées à l'ASH de 2011, mais à ce jour, ni ces données ni le détail des souris VH-ZAP70/E μ -TCL1 n'ont été publiées à notre connaissance.

Dans notre modèle KI ZAP-Mb1, les LB présentent de façon très intéressante des caractéristiques observées classiquement dans la LLC : un phénotype hyper-activé, une prolifération et un flux calcique augmentés. De même, il existe aussi une réduction en IgG et IgM totales sériques, et un enrichissement en IgG et IgM sériques poly-autoréactives sans développent de réelle maladie auto-immune, ce qui est aussi fréquemment observé dans la LLC (Hodgson et al., 2011; Wadhwa and Morrison, 2006). Enfin, bien que non significative, il était aussi observé une augmentation de l'expression de ZAP-70 dans les LT des souris KI ZAP-Mb1 comparativement aux souris KI ZAP (Rizzo et al., 2013).

Ainsi, il serait important d'étudier le répertoire de ces LB murins CD5-ZAP-70⁺ dans notre modèle à la recherche d'une stéréotypie du BCR et/ou d'une clonalité.

Les caractéristiques précédentes sont uniquement, ou principalement observée dans les SoZAP^{High}.

Toutefois, les analyses complémentaires n'ont pas montré de corrélation positive entre le niveau d'expression de ZAP-70 (ou de la GFP) et les différentes altérations observées pour chaque souris (résultats non montrés). En d'autres termes, au sein des SoZAP^{High}, un taux plus faible d'Ig n'était pas associé à une expression plus intense de ZAP-70/GFP, comparativement aux souris avec des taux plus importants d'Ig. Les mêmes constatations étaient faites concernant les proportions de LB activés ou proliférants ou encore d'IgG/IgM autoréactives. Ceci suggère un **effet on/off de l'expression de ZAP-70 dans les LB, sa seule présence au-delà d'un certain seuil étant suffisante à modifier le phénotype et le comportement cellulaire de ces cellules.**

Ceci est en accord avec les données humaines initiale de notre projet où, parmi les patients ZAP-70⁺ avec CAI, le niveau de ZAP-70 dans les LB CD5⁻ n'était pas statistiquement différent de celui dans les LB CD5⁻ des patients ZAP-70⁺ sans CAI.

Ces résultats sont aussi cohérents avec les données dans les LB LLC, où un certain seuil de quantité de protéine ZAP-70 est nécessaire pour augmenter la signalisation du BCR (Chen, 2005).

Bien que le caractère aléatoire de la proportion de SoZAP^{High} ne nous ai pas permis d'affiner la distinction des groupes de souris autrement que par un seuil binaire de 50 % de LyGFP^{High} pour définir une SoZAP^{High}, cela a tout de même révélé **l'effet significatif d'un niveau d'expression de ZAP-70 dans les LB sur leur survie, maturation, différenciation, prolifération et activation, ainsi que sur la production d'Ig poly-autoréactives.**

Synthèse de la partie murine

Au total, notre modèle murin original KI ZAP-Mb1 montre que la surexpression précoce de ZAP-70 dans les LB dès la stade proB, ainsi que son niveau d'expression sont associés à différentes altérations, en termes de phénotype, de différenciation, d'activation et de prolifération ainsi qu'à la production d'auto-Ac circulants.

Certains résultats sont toutefois en l'apparence contradictoires, la forte surexpression de ZAP-70 allant soit dans le sens d'une altération de la signalisation du BCR soit au contraire dans le sens d'une hypersignalisation du BCR.

a) Arguments en faveur d'une réduction du signal du BCR :

- **Réduction de l'apoptose des progéniteurs médullaires** : un faible signal médié par le BCR pourrait tout d'abord expliquer que les progéniteurs médullaires exprimant fortement ZAP-70 (LyGFP^{High}), subissent moins de sélection négative par apoptose et qu'ils puissent donc plus facilement migrer en périphérie sous forme immature/transitionnels (Goodnow et al., 2005)..
- **Enrichissement en LB de la ZM** : en périphérie, via la propagation d'un signal faible du BCR, les LyGFP^{High} T2 pourraient préférentiellement se différencier en LB de la ZM au dépend des LB folliculaires et des LB1 (Berland and Wortis, 2002; Cariappa et al., 2001; Pillai and Cariappa, 2009; Pillai et al., 2005).
- **Augmentation des LB immatures, réduction des LB matures (naïfs, switchés), des LB des CG, hypo-IgG et hypo-IgM** : il a été montré qu'une altération de la signalisation médiée par le BCR est associée à une exclusion folliculaire des LB immatures et une capacité réduite de ces cellules à se différencier en LB matures (Cornall et al., 2000; Turner et al., 1995, 1997).
- **Défaut de production d'IgG et d'IgM spécifiques après immunisation T-dépendante avec réduction du nombre de cellules sécrétrices d'Ac spécifiques** : ceci est cohérent avec les données précédentes à l'état basal et la faible signalisation du BCR suite à sa stimulation antigénique ne permet pas une différenciation correcte en plasmocytes sécréteurs d'Ac.
- **Enrichissement en auto-Ac circulants avec multiples cibles antigéniques** : ceci est cohérent avec l'enrichissement en LB de la ZM potentiellement autoréactifs, avec la réduction des LB1, et avec la réduction de la sélection négative médullaire où des LB ignorants ou autoréactifs mais ayant échappé à

la sélection négative du fait de la faible signalisation du BCR, ont pu migrer en périphérie et devenir secondairement autoréactifs suite à leur activation par différents auto-Ag et des molécules de co-stimulation

- **Possible altération de la phosphorylation de SYK** : or il a été montré dans les LB normaux et de LLC que SYK reste la kinase principalement impliquée dans la signalisation du BCR (Chen, 2005; Chen et al., 2002; Nolz et al., 2005; Alsadeq et al., 2014).

b) Arguments en faveur d'une hypersignalisation du BCR dans les LB des SoZAP^{High} :

- **Hyperactivation de ces cellules à l'état basal et après stimulation du BCR** : ceci a clairement été démontré dans les LB LLC ZAP-70⁺ (Damle et al., 2002) mais aussi dans les LB non tumoraux ZAP-70⁺ humains (Cutrona et al., 2006; Nolz et al., 2005; Toluoso et al., 2009) où le statut activé était par ailleurs associé à l'intensité d'expression de ZAP-70 dans ces cellules (Nolz et al., 2005)
- **Augmentation du flux calcique après stimulation du BCR** : ceci est cohérent avec une hypersignalisation du BCR observée dans les LB de LLC ZAP-70⁺ (Chen, 2005; Chen et al., 2002)
- **Augmentation de la prolifération spontanée de ces cellules, ainsi qu'après stimulation du BCR** : une prolifération augmentée a clairement été montrée dans les LB tumoraux ZAP-70⁺ de LLC via une signalisation chronique et accrue du BCR suite à sa stimulation directe (Chen, 2005; Zhang and Kipps, 2014), mais ceci n'a pas été démontré dans des LB non tumoraux
- **Enrichissement en auto-Ac circulants** : ceci peut aussi survenir en cas d'hypersignalisation chronique du BCR, comme l'ont démontré des modèles KO pour différentes molécules inhibitrices du signal du BCR (Nitschke, 2009; Pritchard and Smith, 2003; Schickel et al., 2012).

Ces arguments, bien que factuels, ne permettent toutefois pas de contrebalancer l'ensemble des arguments précédents en faveur d'une altération de la signalisation du BCR dans les LB surexprimant ZAP-70 qui peuvent expliquer la quasi-totalité du phénotype de nos souris.

c) Proposition d'explication des discordances observées

Bien que préliminaires, nos données de signalisation, suggèrent que **ZAP-70 pourrait entrer en compétition avec SYK dans la signalisation du BCR suite à sa stimulation**. En effet, contrairement aux LB normaux (Alsadeq et al., 2014; Nolz et al., 2005), il est observé une réduction précoce de la phosphorylation de SYK au profit de celle de ZAP-70 après stimulation du BCR.

Ainsi, **il est possible que dans notre modèle, ZAP-70 ait un effet biphasique :**

- **Un effet précoce activateur :** il permettrait l'augmentation du flux calcique, l'expression de marqueurs d'activation précoces suite à la stimulation du BCR (voire même en intégrant des signaux BCR-indépendants tels que le LPS et le CpG), ainsi qu'une prolifération rapide.
- **Un effet tardif plutôt inhibiteur :** l'effet activateur initial pourrait en effet être insuffisant en termes d'intensité ou de durée, pour entraîner une différenciation et la survie de ces LB, ZAP-70 étant rapporté comme moins efficace que SYK pour la transmission du signal du BCR dans les LB murins (Cornall et al., 2000; Turner et al., 1995, 1997). Ceci pourrait donc expliquer, du moins en partie, le phénotype immature avec réduction en IgG et IgM totales sériques observés à l'état basal décrit précédemment.

L'état d'hyperactivation et de prolifération à l'état basal pourrait s'expliquer par une signalisation constitutive chronique mais faible du BCR médiée par ZAP-70. Toutefois, en l'absence d'engagement du BCR et de signaux de survie, cet état d'activation chronique entraîne classiquement une mort cellulaire retardée de ces cellules par AICD (activation-induced cell death) (Donjerković and Scott, 2000). Ainsi, si ZAP-70 entraîne une stimulation chronique du BCR, il devrait exister une diminution progressive avec l'âge de la proportion de LyGFP^{High} par rapport aux LyGFP^{Low}. Or, nous avons constaté la présence de LyGFP^{High} parfois > 50 % des LyGFP Totale dans des souris âgées de 12 mois (résultats non montrés). Nous n'avons toutefois pas de comparatif pour ces mêmes souris à un âge plus jeune afin de s'assurer que le ratio LyGFP^{High}/LyGFP^{Low} ne varie pas au cours du temps. Ceci reste une perspective de travail.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail s'intègre dans un projet vaste et ambitieux visant à étudier si l'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux favorise la rupture de tolérance et/ou la transformation néoplasique de ces cellules.

Il fait directement suite et complète les travaux Humains initiés dans notre laboratoire par le Dr Dana Ghergus dans le cadre de sa thèse de Science soutenue en septembre 2015, où il a notamment été montré pour la première fois chez les patients atteints de LLC qu'une fraction des LB non tumoraux expriment anormalement ZAP-70, et que l'intensité de cette expression est corrélée à celle dans les LB tumoraux. De plus, l'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux est associée à la survenue de CAI suggérant que ces cellules pourraient être à l'origine des Ac polyclonaux responsables des CAI de la LLC.

Le travail présenté ici confirme tout d'abord que ces LB non tumoraux ZAP-70⁺ sont bien polyclonaux et sans lien moléculaire avec le clone tumoral correspondant. Ces cellules sont principalement mutées par pression de sélection antigénique variée avec une absence de stéréotypie de leur BCR.

Il semblerait que ces LB non tumoraux ZAP-70⁺ présentent toutefois un enrichissement en BCR autoréactifs (réactivité anti-nucléaire et/ou polyréactivité) mais ceci reste à confirmer sur un plus large panel. Des mises au point sont aussi nécessaires pour tester la réactivité de ces BCR envers les Ag impliqués dans la survenue de CAI.

Nous avons par ailleurs généré un modèle murin original surexprimant de façon conditionnelle ZAP-70 dans les LB dès le stade proB permettant d'étudier les conséquences fonctionnelles d'une telle expression *in vivo*. Ce modèle est valide et entraîne l'expression de deux niveaux d'intensités de ZAP-70 dans les LB en proportions variables selon les souris, permettant de définir des souris ZAP^{Low} et ZAP^{High}.

Ainsi, ce modèle nous a permis de montrer qu'il existe un effet du niveau d'intensité d'expression de ZAP-70, une forte expression étant associée à un avantage

sélectif médullaire des LB, et à un enrichissement en cellules potentiellement autoréactives de type ZM, ainsi qu'à un blocage partiel de la maturation et de la différenciation périphérique.

De plus, bien que les SoZAP^{High} ne développent pas de LLC, elles présentent des caractéristiques communes à la LLC : réduction en IgG et IgM totales sériques, enrichissement en IgG et IgM sériques autoréactives, hyperactivation et prolifération augmentée des LB suite à la stimulation du BCR. La forte expression de ZAP-70 confère aussi à ces LB la capacité de s'activer et de proliférer de façon augmentée sous des stimuli BCR-indépendants.

Il est possible, aux vues des données présentées, que ZAP-70 entre en compétition avec SYK dans la signalisation du BCR suite à sa stimulation, avec un effet précoce plutôt activateur mais une signalisation du BCR globalement altérée, responsable d'un défaut de maturation et de différenciation normale des LB, pouvant favoriser l'enrichissement en cellules immatures autoréactives. Le rôle mécanistique précis de ZAP-70 dans les LB non tumoraux reste à préciser, en étudiant précisément les interactions de ZAP-70 avec les protéines du complexe du BCR, notamment SYK, et les différentes voies de signalisation d'aval.

Au final, les données humaines et murines de ce travail tendent à montrer que l'expression de ZAP-70 dans les LB non tumoraux ne semble pas favoriser la survenue d'une transformation néoplasique de ces cellules, mais par contre semble favoriser un enrichissement en LB poly-autoréactifs.

A terme, si nous parvenons à confirmer que les LB non tumoraux ZAP-70⁺ sont à l'origine des CAI dans la LLC et qu'une forte expression de ZAP-70 dans des LB non tumoraux est associée de façon plus globale à une rupture de tolérance cela légitimera des tests thérapeutiques ciblant ZAP-70 dans les complications auto-immunes des néoplasies.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension du développement B et de la physiopathologie de la rupture de tolérance et de la transformation néoplasique.

BIBLIOGRAPHIE

Admirand, J.H., Rassidakis, G.Z., Abruzzo, L.V., Valbuena, J.R., Jones, D., and Medeiros, L.J. (2004). Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 17, 954–961.

Agathangelidis, A., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Brochet, X., Murray, F., Yan, X.-J., Davis, Z., van Gastel-Mol, E.J., Tresoldi, C., Chu, C.C., et al. (2012). Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 119, 4467–4475.

Alsadeq, A., Hobeika, E., Medgyesi, D., Kläsener, K., and Reth, M. (2014). The role of the Syk/Shp-1 kinase-phosphatase equilibrium in B cell development and signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 268–276.

Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A., and Roifman, C.M. (1994). Defective T cell receptor signaling and CD8⁺ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 76, 947–958.

Au-Yeung, B.B., Levin, S.E., Zhang, C., Hsu, L.-Y., Cheng, D.A., Killeen, N., Shokat, K.M., and Weiss, A. (2010). A genetically selective inhibitor demonstrates a function for the kinase Zap70 in regulatory T cells independent of its catalytic activity. *Nat. Immunol.* 11, 1085–1092.

Au-Yeung, B.B., Zikherman, J., Mueller, J.L., Ashouri, J.F., Matloubian, M., Cheng, D.A., Chen, Y., Shokat, K.M., and Weiss, A. (2014a). A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E3679-3688.

Au-Yeung, B.B., Melichar, H.J., Ross, J.O., Cheng, D.A., Zikherman, J., Shokat, K.M., Robey, E.A., and Weiss, A. (2014b). Quantitative and temporal requirements revealed for Zap70 catalytic activity during T cell development. *Nat. Immunol.* 15, 687–694.

Au-Yeung, B.B., Shah, N.H., Shen, L., and Weiss, A. (2017). ZAP-70 in Signaling, Biology, and Disease. *Annu. Rev. Immunol.*

Bakke, A.C., Purtzer, Z., Leis, J., and Huang, J. (2006). A robust ratio metric method for analysis of Zap-70 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cytometry B Clin. Cytom.* 70, 227–234.

Barcellini, W., Montesano, R., Clerici, G., Zaninoni, A., Imperiali, F.G., Calori, R., Cortelezzi, A., and Zanella, A. (2002). In vitro production of anti-RBC antibodies and cytokines in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 71, 177–183.

Barcellini, W., Imperiali, F.G., Zaninoni, A., Reda, G., Consonni, D., Fattizzo, B., Lonati, S., Nobili, L., Zanella, A., and Cortelezzi, A. (2014). Toll-like receptor 4 and 9 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: relationship with infections, autoimmunity and disease progression. *Leuk. Lymphoma* 55, 1768–1773.

Barker, R.N., and Elson, C.J. (1994). Multiple self epitopes on the Rhesus polypeptides stimulate immunologically ignorant human T cells in vitro. *Eur. J. Immunol.* 24, 1578–1582.

Barker, R.N., Hall, A.M., Standen, G.R., Jones, J., and Elson, C.J. (1997). Identification of T-cell epitopes on the Rhesus polypeptides in autoimmune hemolytic anemia. *Blood*

90, 2701–2715.

Bekeredjian-Ding, I., Doster, A., Schiller, M., Heyder, P., Lorenz, H.-M., Schraven, B., Bommhardt, U., and Heeg, K. (2008). TLR9-Activating DNA Up-Regulates ZAP70 via Sustained PKB Induction in IgM⁺ B Cells. *J. Immunol.* *181*, 8267–8277.

Bekkema, R., Tadema, A., Daenen, S.M.G.J., Kluin-Nelemans, H.C., and Mulder, A.B. (2008). An improved flow cytometric method using FACS Lysing Solution for measurement of ZAP-70 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin. Cytom.* *74*, 40–44.

Belmont, J., Gu, T., Mudd, A., and Salomon, A.R. (2017). A PLC- γ 1 Feedback Pathway Regulates Lck Substrate Phosphorylation at the T-Cell Receptor and SLP-76 Complex. *J. Proteome Res.* *16*, 2729–2742.

Berland, R., and Wortis, H.H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 253–300.

Bertilaccio, M.T.S., Simonetti, G., Dagklis, A., Rocchi, M., Rodriguez, T.V., Apollonio, B., Mantovani, A., Ponzoni, M., Ghia, P., Garlanda, C., et al. (2011). Lack of TIR8/SIGIRR triggers progression of chronic lymphocytic leukemia in mouse models. *Blood* *118*, 660–669.

Best, O.G., Ibbotson, R.E., Parker, A.E., Davis, Z.A., Orchard, J.A., and Oscier, D.G. (2006). ZAP-70 by flow cytometry: a comparison of different antibodies, anticoagulants, and methods of analysis. *Cytometry B Clin. Cytom.* *70*, 235–241.

Bichi, R., Shinton, S.A., Martin, E.S., Koval, A., Calin, G.A., Cesari, R., Russo, G., Hardy, R.R., and Croce, C.M. (2002). Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 6955–6960.

Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguet, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., et al. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* *48*, 198–206.

Boldizsar, F., Talaber, G., Szabo, M., Bartis, D., Palinkas, L., Nemeth, P., and Berki, T. (2010). Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology* *215*, 521–526.

Boldizsar, F., Szabo, M., Kvell, K., Czompoly, T., Talaber, G., Bjorkan, J., Bartis, D., Nemeth, P., and Berki, T. (2013). ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in T cells. *Mol. Immunol.* *53*, 111–117.

Bose, B., and Sinha, S. (2005). Problems in using statistical analysis of replacement and silent mutations in antibody genes for determining antigen-driven affinity selection. *Immunology* *116*, 172–183.

Böttcher, S., Ritgen, M., Fischer, K., Stilgenbauer, S., Busch, R.M., Fingerle-Rowson, G., Fink, A.M., Bühler, A., Zenz, T., Wenger, M.K., et al. (2012). 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.

- Brachtl, G., Piñón Hofbauer, J., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2014). The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. *Ann. Hematol.* 93, 361–374.
- Braiman, A., and Isakov, N. (2015). The Role of Crk Adaptor Proteins in T-Cell Adhesion and Migration. *Front. Immunol.* 6, 509.
- Brdicka, T., Kadlecěk, T.A., Roose, J.P., Pastuszak, A.W., and Weiss, A. (2005). Intramolecular regulatory switch in ZAP-70: analogy with receptor tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4924–4933.
- Cai, J., Humphries, C., Richardson, A., and Tucker, P.W. (1992). Extensive and selective mutation of a rearranged VH5 gene in human B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 176, 1073–1081.
- Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., et al. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 353, 1793–1801.
- Calissano, C., Damle, R.N., Hayes, G., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Moreno, C., Sison, C., Kaufman, M.S., Kolitz, J.E., Allen, S.L., et al. (2009). In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114, 4832–4842.
- Calpe, E., Codony, C., Baptista, M.J., Abrisqueta, P., Carpio, C., Purroy, N., Bosch, F., and Crespo, M. (2011). ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood* 118, 4401–4410.
- Carabia, J., Carpio, C., Abrisqueta, P., Jiménez, I., Purroy, N., Calpe, E., Palacio, C., Bosch, F., and Crespo, M. (2017). Microenvironment regulates the expression of miR-21 and tumor suppressor genes PTEN, PIAS3 and PDCD4 through ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Sci. Rep.* 7, 12262.
- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., and Pillai, S. (2001). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14, 603–615.
- Cartron, G., de Guibert, S., Dilhuydy, M.-S., Morschhauser, F., Leblond, V., Dupuis, J., Mahe, B., Bouabdallah, R., Lei, G., Wenger, M., et al. (2014). Obinutuzumab (GA101) in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: final data from the phase 1/2 GAUGUIN study. *Blood* 124, 2196–2202.
- Catovsky, D., Fooks, J., and Richards, S. (1989). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br. J. Haematol.* 72, 141–149.
- Cerhan, J.R., and Slager, S.L. (2015). Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood* 126, 2265–2273.
- Chakupurakal, G., Murrin, R.J.A., and Neilson, J.R. (2007). Prolonged remission of pure white cell aplasia (PWCA), in a patient with CLL, induced by rituximab and

- maintained by continuous oral cyclosporin. *Eur. J. Haematol.* 79, 271–273.
- Chan, A.C., Irving, B.A., Fraser, J.D., and Weiss, A. (1991). The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9166–9170.
- Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., and Weiss, A. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649–662.
- Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R., and Kurosaki, T. (1995). Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 14, 2499.
- Chan, A.Y., Punwani, D., Kadlecsek, T.A., Cowan, M.J., Olson, J.L., Mathes, E.F., Sunderam, U., Man Fu, S., Srinivasan, R., Kuriyan, J., et al. (2016). A novel human autoimmune syndrome caused by combined hypomorphic and activating mutations in ZAP-70. *J. Exp. Med.*
- Chang, B., and Casali, P. (1994). The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol. Today* 15, 367–373.
- Chen, L. (2005). ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 105, 2036–2041.
- Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2002). Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100, 4609–4614.
- Chen, L., Huynh, L., Apgar, J., Tang, L., Rassenti, L., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2008). ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111, 2685–2692.
- Chen, Y.-H., Peterson, L.C., Dittmann, D., Evens, A., Rosen, S., Khoong, A., Shankey, T.V., Forman, M., Gupta, R., and Goolsby, C.L. (2007). Comparative analysis of flow cytometric techniques in assessment of ZAP-70 expression in relation to IGHV mutational status in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 127, 182–191.
- Cheng, A.M., Negishi, I., Anderson, S.J., Chan, A.C., Bolen, J., Loh, D.Y., and Pawson, T. (1997). The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9797–9801.
- Cheng, A.M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J.B., and Pawson, T. (1995). Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378, 303–306.
- Cheson, B.D., Fisher, R.I., Barrington, S.F., Cavalli, F., Schwartz, L.H., Zucca, E., Lister, T.A., Alliance, Australasian Leukaemia and Lymphoma Group, Eastern Cooperative Oncology Group, European Mantle Cell Lymphoma Consortium, et al. (2014). Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 3059–3068.

- Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2010). Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 117, 1781–1791.
- Choi, M.Y., Kashyap, M.K., and Kumar, D. (2016). The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 29, 40–53.
- Chu, C.C., CATERA, R., Hatzi, K., Yan, X.-J., Zhang, L., Wang, X.B., Fales, H.M., Allen, S.L., Kolitz, J.E., Rai, K.R., et al. (2008). Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood* 112, 5122–5129.
- Chu, D.H., Morita, C.T., and Weiss, A. (1998). The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* 165, 167–180.
- Chu, D.H., van Oers, N.S., Malissen, M., Harris, J., Elder, M., and Weiss, A. (1999). Pre-T cell receptor signals are responsible for the down-regulation of Syk protein tyrosine kinase expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 2610–2620.
- Claus, R., Lucas, D.M., Ruppert, A.S., Williams, K.E., Weng, D., Patterson, K., Zucknick, M., Oakes, C.C., Rassenti, L.Z., Greaves, A.W., et al. (2014). Validation of ZAP-70 methylation and its relative significance in predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 124, 42–48.
- Colucci, F., Schweighoffer, E., Tomasello, E., Turner, M., Ortaldo, J.R., Vivier, E., Tybulewicz, V.L.J., and Di Santo, J.P. (2002). Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat. Immunol.* 3, 288–294.
- Corbett, S.J., Tomlinson, I.M., Sonnhammer, E.L., Buck, D., and Winter, G. (1997). Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, “minor” D segments or D-D recombination. *J. Mol. Biol.* 270, 587–597.
- Cornall, R.J., Cheng, A.M., Pawson, T., and Goodnow, C.C. (2000). Role of Syk in B-cell development and antigen-receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1713–1718.
- Corti, D., Voss, J., Gamblin, S.J., Codoni, G., Macagno, A., Jarrossay, D., Vachieri, S.G., Pinna, D., Minola, A., Vanzetta, F., et al. (2011). A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333, 850–856.
- Costello, R.T., and Sébahoun, G. (2010). Agranulocytosis occurring in a patient with chronic lymphocytic leukemia in complete remission; treatment by rituximab and cyclosporin. *Leuk. Res.* 34, e329-330.
- Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marcé, S., López-Guillermo, A., Campo, E., and Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 1764–1775.
- Crespo, M., Villamor, N., Giné, E., Muntañola, A., Colomer, D., Marafioti, T., Jones, M., Camós, M., Campo, E., and Montserrat, E. (2006). ZAP-70 expression in normal

pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 12, 726–734.

Curtis, B.R., and McFarland, J.G. (2009). Detection and identification of platelet antibodies and antigens in the clinical laboratory. *Immunohematol. Am. Red Cross* 25, 125–135.

Cutrona, G., Colombo, M., Matis, S., Reverberi, D., Dono, M., Tarantino, V., Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2006). B lymphocytes in humans express ZAP-70 when activated in vivo. *Eur. J. Immunol.* 36, 558–569.

Cwynarski, K., van Biezen, A., de Wreede, L., Stilgenbauer, S., Bunjes, D., Metzner, B., Koza, V., Mohty, M., Remes, K., Russell, N., et al. (2012). Autologous and allogeneic stem-cell transplantation for transformed chronic lymphocytic leukemia (Richter's syndrome): A retrospective analysis from the chronic lymphocytic leukemia subcommittee of the chronic leukemia working party and lymphoma working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 2211–2217.

Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., et al. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1840–1847.

D'Arena, G., and Cascavilla, N. (2009). Chronic lymphocytic leukemia-associated pure red cell aplasia. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 22, 279–286.

D'Arena, G., and Cascavilla, N. (2011). Romiplostim for chronic lymphocytic leukemia-associated immune thrombocytopenia. *Leuk. Lymphoma* 52, 701–704.

D'Arena, G., Guariglia, R., La Rocca, F., Trino, S., Condelli, V., De Martino, L., De Feo, V., and Musto, P. (2013). Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 730131.

Davature, S., Leignadier, J., Milani, P., Soubeyran, P., Malissen, B., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.-M., and Boyer, C. (2005). Selective defect in antigen-induced TCR internalization at the immune synapse of CD8 T cells bearing the ZAP-70(Y292F) mutation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 3140–3149.

Dazzi, F., D'Andrea, E., Biasi, G., De Silvestro, G., Gaidano, G., Schena, M., Tison, T., Vianello, F., Girolami, A., and Caligaris-Cappio, F. (1995). Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75, 26–32.

Deaglio, S., Vaisitti, T., Aydin, S., Bergui, L., D'Arena, G., Bonello, L., Omede, P., Scatolini, M., Jaksic, O., Chiorino, G., et al. (2007). CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 110, 4012–4021.

Dearden, C., Wade, R., Else, M., Richards, S., Milligan, D., Hamblin, T., Catovsky, D., UK National Cancer Research Institute (NCRI), Haematological Oncology Clinical Studies Group, and NCRI CLL Working Group (2008). The prognostic significance of a positive direct antiglobulin test in chronic lymphocytic leukemia: a beneficial effect of the combination of fludarabine and cyclophosphamide on the incidence of hemolytic

anemia. *Blood* 111, 1820–1826.

Deindl, S., Kadlecsek, T.A., Brdicka, T., Cao, X., Weiss, A., and Kuriyan, J. (2007). Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell* 129, 735–746.

Deng, G.-M., Kyttaris, V.C., and Tsokos, G.C. (2016). Targeting Syk in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front. Immunol.* 7, 78.

Dhalla, F., Lucas, M., Schuh, A., Bhole, M., Jain, R., Patel, S.Y., Misbah, S., and Chapel, H. (2014). Antibody deficiency secondary to chronic lymphocytic leukemia: Should patients be treated with prophylactic replacement immunoglobulin? *J. Clin. Immunol.* 34, 277–282.

Di Bartolo, V., Mège, D., Germain, V., Pelosi, M., Dufour, E., Michel, F., Magistrelli, G., Isacchi, A., and Acuto, O. (1999). Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 6285–6294.

DiLillo, D.J., Matsushita, T., and Tedder, T.F. (2010). B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183, 38–57.

Döhner, H., Stilgenbauer, S., James, M.R., Benner, A., Weilguni, T., Bentz, M., Fischer, K., Hunstein, W., and Lichter, P. (1997). 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 89, 2516–2522.

Donjerković, D., and Scott, D.W. (2000). Activation-induced cell death in B lymphocytes. *Cell Res.* 10, 179–192.

Dreger, P., Schetelig, J., Andersen, N., Corradini, P., van Gelder, M., Gribben, J., Kimby, E., Michallet, M., Moreno, C., Stilgenbauer, S., et al. (2014). Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood* 124, 3841–3849.

Duan, B., and Morel, L. (2006). Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 5, 403–408.

Duek, A., Shvidel, L., Braester, A., and Berrebi, A. (2006). Clinical and immunologic aspects of B chronic lymphocytic leukemia associated with autoimmune disorders. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* 8, 828–831.

Dunn-Walters, D.K., and Spencer, J. (1998). Strong intrinsic biases towards mutation and conservation of bases in human IGHV genes during somatic hypermutation prevent statistical analysis of antigen selection. *Immunology* 95, 339–345.

Dürig, J., Nüchel, H., Cremer, M., Führer, A., Halfmeyer, K., Fandrey, J., Möröy, T., Klein-Hitpass, L., and Dührsen, U. (2003). ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 17, 2426–2434.

Efremov, D.G., Ivanovski, M., Siljanovski, N., Pozzato, G., Cevreska, L., Fais, F., Chiorazzi, N., Batista, F.D., and Burrone, O.R. (1996). Restricted immunoglobulin VH region repertoire in chronic lymphocytic leukemia patients with autoimmune hemolytic

anemia. *Blood* 87, 3869–3876.

Evans, R., Lellouch, A.C., Svensson, L., McDowall, A., and Hogg, N. (2011). The integrin LFA-1 signals through ZAP-70 to regulate expression of high-affinity LFA-1 on T lymphocytes. *Blood* 117, 3331–3342.

Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S.L., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K., Rassenti, L.Z., et al. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest.* 102, 1515–1525.

Falchi, L., Keating, M.J., Marom, E.M., Truong, M.T., Schlette, E.J., Sargent, R.L., Trinh, L., Wang, X., Smith, S.C., Jain, N., et al. (2014). Correlation between FDG/PET, histology, characteristics, and survival in 332 patients with chronic lymphoid leukemia. *Blood* 123, 2783–2790.

Fallah-Arani, F., Schweighoffer, E., Vanes, L., and Tybulewicz, V.L.J. (2008). Redundant role for Zap70 in B cell development and activation. *Eur. J. Immunol.* 38, 1721–1733.

Fan, L., Miao, Y., Wu, Y.-J., Wang, Y., Guo, R., Wang, L., Shen, A.-L., Chen, Y.-Y., Xu, W., and Li, J.-Y. (2015). Expression patterns of CD200 and CD148 in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders and their potential value in differential diagnosis. *Leuk. Lymphoma* 56, 3329–3335.

Fioredda, F., Calvillo, M., Bonanomi, S., Coliva, T., Tucci, F., Farruggia, P., Pillon, M., Martire, B., Ghilardi, R., Ramenghi, U., et al. (2011). Congenital and acquired neutropenia consensus guidelines on diagnosis from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *Pediatr. Blood Cancer* 57, 10–17.

Fischer, A., Picard, C., Chemin, K., Dogniaux, S., le Deist, F., and Hivroz, C. (2010). ZAP70: a master regulator of adaptive immunity. *Semin. Immunopathol.* 32, 107–116.

Fischer, M., Klein, U., and Küppers, R. (1997). Molecular single-cell analysis reveals that CD5-positive peripheral blood B cells in healthy humans are characterized by rearranged V κ genes lacking somatic mutation. *J. Clin. Invest.* 100, 1667–1676.

Foon, K.A., Boyiadzis, M., Land, S.R., Marks, S., Raptis, A., Pietragallo, L., Meisner, D., Laman, A., Sulecki, M., Butchko, A., et al. (2009). 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.

Fu, R., Guo, C., Wang, S., Huang, Y., Jin, O., Hu, H., Chen, J., Xu, B., Zhou, M., Zhao, J., et al. (2017). Podocyte Activation of NLRP3 Inflammasomes Contributes to the Development of Proteinuria in Lupus Nephritis. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 69, 1636–1646.

Galletti, J., Cañones, C., Morande, P., Borge, M., Oppedo, P., Geffner, J., Bezares, R., Gamberale, R., and Giordano, M. (2008). Chronic lymphocytic leukemia cells bind and present the erythrocyte protein band 3: possible role as initiators of autoimmune hemolytic anemia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 3674–3683.

- Galton, D.A., Goldman, J.M., Wiltshaw, E., Catovsky, D., Henry, K., and Goldenberg, G.J. (1974). Prolymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 27, 7–23.
- García-Muñoz, R., Galiacho, V.R., and Llorente, L. (2012). Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann. Hematol.* 91, 981–996.
- Gelfand, E.W., Weinberg, K., Mazer, B.D., Kadlecsek, T.A., and Weiss, A. (1995). Absence of ZAP-70 prevents signaling through the antigen receptor on peripheral blood T cells but not on thymocytes. *J. Exp. Med.* 182, 1057–1065.
- Gelkop, S., Babichev, Y., and Isakov, N. (2001). T cell activation induces direct binding of the Crk adapter protein to the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (p85) via a complex mechanism involving the Cbl protein. *J. Biol. Chem.* 276, 36174–36182.
- Gladkikh, A.A., Potashnikova, D.M., Tatarskiy, V., Yastrebova, M., Khamidullina, A., Barteneva, N., and Vorobjev, I. (2017). Comparison of the mRNA expression profile of B-cell receptor components in normal CD5-high B-lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia: a key role of ZAP70. *Cancer Med.*
- Gobessi, S., Bennardo, S., Longo, P.G., Doe, B., and Efremov, D.G. (2011). Development of a Transgenic Mouse Model to Study the Role of ZAP-70 in the Development and Progression of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 118, 2830–2830.
- Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P.G., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2007). ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* 109, 2032–2039.
- Gong, Q., White, L., Johnson, R., White, M., Negishi, I., Thomas, M., and Chan, A.C. (1997). Restoration of thymocyte development and function in zap-70^{-/-} mice by the Syk protein tyrosine kinase. *Immunity* 7, 369–377.
- Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435, 590–597.
- Grandjenette, C., Kennel, A., Faure, G.C., Béné, M.C., and Feugier, P. (2007). Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 92, 1279–1281.
- Griffin, D.O., Holodick, N.E., and Rothstein, T.L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70⁻. *J. Exp. Med.* 208, 67–80.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Guièze, R., and Wu, C.J. (2015). Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 126, 445–453.
- Hallek, M. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk

stratification, and treatment. *Am. J. Hematol.* 92, 946–965.

Hallek, M., Wanders, L., Ostwald, M., Busch, R., Senekowitsch, R., Stern, S., Schick, H.D., Kuhn-Hallek, I., and Emmerich, B. (1996). Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk. Lymphoma* 22, 439–447.

Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R., et al. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111, 5446–5456.

Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A.M., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., von Grünhagen, U., et al. (2010). 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.

Hamblin, T.J., Oscier, D.G., and Young, B.J. (1986). Autoimmunity in chronic lymphocytic leukaemia. *J. Clin. Pathol.* 39, 713–716.

Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. (1999). Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1848–1854.

Hamblin, T.J., Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Thomas, P.W., Stevenson, F.K., and Oscier, D.G. (2002). CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 99, 1023–1029.

Hamblin, T.J., Davis, Z.A., and Oscier, D.G. (2008). Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated chronic lymphocytic leukaemia – long-term follow up of patients with different percentages of mutations. *Br. J. Haematol.* 140, 320–323.

Han, L., Yang, J., Wang, X., Li, D., Lv, L., and Li, B. (2015). Th17 cells in autoimmune diseases. *Front. Med.* 9, 10–19.

Hao, Y., Li, H., Li, Y., Lyu, M., Zhang, D., Fu, R., Guan, Y., Wang, S., Sun, B., Dou, X., et al. (2017). Decreased TLR4 expression on monocytes may cause regulatory T cells abnormality in patients with primary immune thrombocytopenia. *Autoimmunity* 50, 283–292.

Hatada, M.H., Lu, X., Laird, E.R., Green, J., Morgenstern, J.P., Lou, M., Marr, C.S., Phillips, T.B., Ram, M.K., and Theriault, K. (1995). Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 377, 32–38.

He, Y., Zhao, Y., Zhu, M., Wu, Q., and Ruan, C. (2013). Detection of autoantibodies against platelet glycoproteins in patients with immune thrombocytopenic purpura by flow cytometric immunobead array. *Clin. Chim. Acta* 415, 176–180.

Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., et al. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in

chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 117, 563–574.

Herzenberg, L.A., and Tung, J.W. (2006). B cell lineages: documented at last! *Nat. Immunol.* 7, 225–226.

Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 195–205.

Hesslein, D.G.T., Palacios, E.H., Sun, J.C., Beilke, J.N., Watson, S.R., Weiss, A., and Lanier, L.L. (2011). Differential requirements for CD45 in NK-cell function reveal distinct roles for Syk-family kinases. *Blood* 117, 3087–3095.

Hewamana, S., Alghazal, S., Lin, T.T., Clement, M., Jenkins, C., Guzman, M.L., Jordan, C.T., Neelakantan, S., Crooks, P.A., Burnett, A.K., et al. (2008). The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. *Blood* 111, 4681–4689.

Hobeika, E., Thiemann, S., Storch, B., Jumaa, H., Nielsen, P.J., Pelanda, R., and Reth, M. (2006). Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13789–13794.

Hodgson, K., Ferrer, G., Montserrat, E., and Moreno, C. (2011). Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review. *Haematologica* 96, 752–761.

Hogg, N., Patzak, I., and Willenbrock, F. (2011). The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 416–426.

Hoogeboom, R., van Kessel, K.P.M., Hochstenbach, F., Wormhoudt, T.A., Reinten, R.J.A., Wagner, K., Kater, A.P., Guikema, J.E.J., Bende, R.J., and van Noesel, C.J.M. (2013). A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J. Exp. Med.* 210, 59–70.

Howlader, Noone, Garshell, Miller, and Altekruse (2014). *Cancer Statistics Review (CSR), 1975-2011.*

Hrvatin, S., Deng, F., O'Donnell, C.W., Gifford, D.K., and Melton, D.A. (2014). MARIS: method for analyzing RNA following intracellular sorting. *PLoS One* 9, e89459.

Hsu, L.-Y., Cheng, D.A., Chen, Y., Liang, H.-E., and Weiss, A. (2017). Destabilizing the autoinhibitory conformation of Zap70 induces up-regulation of inhibitory receptors and T cell unresponsiveness. *J. Exp. Med.* 214, 833–849.

Infantino, S., Benz, B., Waldmann, T., Jung, M., Schneider, R., and Reth, M. (2010). Arginine methylation of the B cell antigen receptor promotes differentiation. *J. Exp. Med.* 207, 711–719.

International CLL-IPI working group (2016). An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 17, 779–790.

Ito, S., Fujiwara, S.-I., Mashima, K., Umino, K., Minakata, D., Nakano, H., Yamasaki, R., Kawasaki, Y., Sugimoto, M., Ashizawa, M., et al. (2017). Development of acute myeloid leukemia in patients with untreated chronic lymphocytic leukemia. *Ann.*

Hematol. 96, 719–724.

Ivanova, E., and Carpino, N. (2016). Negative regulation of TCR signaling by ubiquitination of Zap-70 Lys-217. *Mol. Immunol.* 73, 19–28.

Jenkins, M.R., Stinchcombe, J.C., Au-Yeung, B.B., Asano, Y., Ritter, A.T., Weiss, A., and Griffiths, G.M. (2014). Distinct structural and catalytic roles for Zap70 in formation of the immunological synapse in CTL. *ELife* 3, e01310.

Jiang, A., Craxton, A., Kurosaki, T., and Clark, E.A. (1998). Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Exp. Med.* 188, 1297–1306.

Jirmanova, L., Giardino Torchia, M.L., Sarma, N.D., Mittelstadt, P.R., and Ashwell, J.D. (2011). Lack of the T cell-specific alternative p38 activation pathway reduces autoimmunity and inflammation. *Blood* 118, 3280–3289.

Kadlecek, T.A., van Oers, N.S., Lefrancois, L., Olson, S., Finlay, D., Chu, D.H., Connolly, K., Killeen, N., and Weiss, A. (1998). Differential requirements for ZAP-70 in TCR signaling and T cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 4688–4694.

Katz, Z.B., Novotná, L., Blount, A., and Lillemeier, B.F. (2017). A cycle of Zap70 kinase activation and release from the TCR amplifies and disperses antigenic stimuli. *Nat. Immunol.* 18, 86–95.

Kay, S., Herishanu, Y., Pick, M., Rogowski, O., Baron, S., Naparstek, E., Polliack, A., and Deutsch, V.R. (2006). Quantitative flow cytometry of ZAP-70 levels in chronic lymphocytic leukemia using molecules of equivalent soluble fluorochrome. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70, 218–226.

Kikushige, Y., Ishikawa, F., Miyamoto, T., Shima, T., Urata, S., Yoshimoto, G., Mori, Y., Iino, T., Yamauchi, T., Eto, T., et al. (2011). Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 20, 246–259.

Kirkham, P.M., Mortari, F., Newton, J.A., and Schroeder, H.W. (1992). Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding. *EMBO J.* 11, 603–609.

Kleeberg, U.R., Linde, H., Günther, G., Tessen, H.-W., and Kersting, M. (2016). Bendamustine-Rituximab Combination Is a Safe and Effective, Ambulatory Treatment for Elderly Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia: Retrospective Real-world Analysis by Age from a German Registry and Review of the Literature. *Anticancer Res.* 36, 2827–2838.

Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., et al. (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.* 194, 1625–1638.

Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., et al. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia.

Cancer Cell 17, 28–40.

Kobayashi, R., Picchio, G., Kirven, M., Meisenholder, G., Baird, S., Carson, D.A., Mosier, D.E., and Kipps, T.J. (1992). Transfer of human chronic lymphocytic leukemia to mice with severe combined immune deficiency. *Leuk. Res.* 16, 1013–1023.

Koehrer, S., Keating, M.J., and Wierda, W.G. (2010). Eltrombopag, a second-generation thrombopoietin receptor agonist, for chronic lymphocytic leukemia-associated ITP. *Leukemia* 24, 1096–1098.

Königsberger, S., Prodöhl, J., Stegner, D., Weis, V., Andreas, M., Stehling, M., Schumacher, T., Böhmer, R., Thielmann, I., van Eeuwijk, J.M.M., et al. (2012). Altered BCR signalling quality predisposes to autoimmune disease and a pre-diabetic state. *EMBO J.* 31, 3363–3374.

Kostareli, E., Gounari, M., Janus, A., Murray, F., Brochet, X., Giudicelli, V., Pospisilova, S., Oscier, D., Foroni, L., di Celle, P.F., et al. (2012). Antigen receptor stereotypy across B-cell lymphoproliferations: the case of IGHV4-59/IGKV3-20 receptors with rheumatoid factor activity. *Leukemia* 26, 1127–1131.

Kosugi, A., Sakakura, J., Yasuda, K., Ogata, M., and Hamaoka, T. (2001). Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts. *Immunity* 14, 669–680.

Kumaran, S., Grucza, R.A., and Waksman, G. (2003). The tandem Src homology 2 domain of the Syk kinase: a molecular device that adapts to interphosphotyrosine distances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14828–14833.

Küppers, R., Zhao, M., Rajewsky, K., and Hansmann, M.L. (1993). Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 143, 230.

Kuroyama, H., Ikeda, T., Kasai, M., Yamasaki, S., Tatsumi, M., Utsuyama, M., Saito, T., and Hirokawa, K. (2004). Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated KI ZAPnase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 935–941.

Kuwana, M., Kurata, Y., Fujimura, K., Fujisawa, K., Wada, H., Nagasawa, T., Nomura, S., Kojima, T., Yagi, H., and Ikeda, Y. (2006). Preliminary laboratory based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura: evaluation by multi-center prospective study. *J. Thromb. Haemost. JTH* 4, 1936–1943.

Lad, D.P., Varma, S., Varma, N., Sachdeva, M.U.S., Bose, P., and Malhotra, P. (2013). Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: their role in disease progression and autoimmune cytopenias. *Leuk. Lymphoma* 54, 1012–1019.

Lad, D.P., Varma, S., Varma, N., Sachdeva, M.U.S., Bose, P., and Malhotra, P. (2015). Regulatory T-cell and T-helper 17 balance in chronic lymphocytic leukemia progression and autoimmune cytopenias. *Leuk. Lymphoma* 56, 2424–2428.

Lam, K.P., and Rajewsky, K. (1999). B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J. Exp. Med.* 190, 471–477.

Lamy, T., Moignet, A., and Loughran, T.P. (2017). LGL leukemia: from pathogenesis

to treatment. *Blood* 129, 1082–1094.

Landau, D.A., Carter, S.L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M.S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., et al. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152, 714–726.

Landau, D.A., Clement, K., Ziller, M.J., Boyle, P., Fan, J., Gu, H., Stevenson, K., Sougnez, C., Wang, L., Li, S., et al. (2014). Locally disordered methylation forms the basis of intratumor methylome variation in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 26, 813–825.

Landau, D.A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A.N., Stewart, C., Reiter, J.G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Böttcher, S., et al. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 526, 525–530.

Landgren, O., Rapkin, J.S., Caporaso, N.E., Mellemkjaer, L., Gridley, G., Goldin, L.R., and Engels, E.A. (2007). Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109, 2198–2201.

Landgren, O., Albitar, M., Ma, W., Abbasi, F., Hayes, R.B., Ghia, P., Marti, G.E., and Caporaso, N.E. (2009). B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 360, 659–667.

Lanemo Myhrinder, A., Hellqvist, E., Sidorova, E., Söderberg, A., Baxendale, H., Dahle, C., Willander, K., Tobin, G., Bäckman, E., Söderberg, O., et al. (2008). A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* 111, 3838–3848.

Langerak, A.W., Davi, F., Ghia, P., Hadzidimitriou, A., Murray, F., Potter, K.N., Rosenquist, R., Stamatopoulos, K., and Belessi, C. (2011). Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia* 25, 979–984.

Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 9, 495–502.

Latour, S., Chow, L.M., and Veillette, A. (1996). Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 22782–22790.

Laurenti, L., Petlickovski, A., Rumi, C., Gobessi, S., Piccioni, P., Tarnani, M., Puggioni, P., Marietti, S., Sica, S., Leone, G., et al. (2005). Comparison of ZAP-70/Syk mRNA levels with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 90, 1533–1540.

Laurenti, L., Vannata, B., Innocenti, I., Autore, F., Santini, F., Sica, S., and Efremov, D.G. (2013). The use of monoclonal antibodies in the treatment of autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 5, e2013027.

Lavin, M.F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 759–769.

Letestu, R., Rawstron, A., Ghia, P., Villamor, N., Boeckx, N., Leuven, N.B., Boettcher, S., Buhl, A.M., Duerig, J., Ibbotson, R., et al. (2006). Evaluation of ZAP-70 expression

by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70, 309–314.

Li, Y., Li, H., and Weigert, M. (2002). Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J. Exp. Med.* 195, 181–188.

Li, S., Moffett, H.F., Lu, J., Werner, L., Zhang, H., Ritz, J., Neuberg, D., Wucherpfennig, K.W., Brown, J.R., and Novina, C.D. (2011). MicroRNA expression profiling identifies activated B cell status in chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One* 6, e16956.

Li, Y., Wang, Y., Wang, Z., Yi, D., and Ma, S. (2015). Racial differences in three major NHL subtypes: descriptive epidemiology. *Cancer Epidemiol.* 39, 8–13.

Lieby, P., Poindron, V., Roussi, S., Klein, C., Knapp, A.-M., Garaud, J.-C., Cerutti, M., Martin, T., and Pasquali, J.-L. (2004). Pathogenic antiphospholipid antibody: an antigen-selected needle in a haystack. *Blood* 104, 1711–1715.

Liu, Q., Wang, Y.-P., Liu, Q., Zhao, Q., Chen, X.-M., Xue, X.-H., Zhou, L.-N., Ding, Y., Tang, X.-M., Zhao, X.-D., et al. (2017). Novel compound heterozygous mutations in ZAP70 in a Chinese patient with leaky severe combined immunodeficiency disorder. *Immunogenetics* 69, 199–209.

Lu, L., and Osmond, D.G. (2000). Apoptosis and its modulation during B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Immunol. Rev.* 175, 158–174.

Madakashira, B.P., and Sadler, K.C. (2017). DNA Methylation, Nuclear Organization, and Cancer. *Front. Genet.* 8, 76.

Magnan, A., Di Bartolo, V., Mura, A.M., Boyer, C., Richelme, M., Lin, Y.L., Roure, A., Gillet, A., Arrieumerlou, C., Acuto, O., et al. (2001). T cell development and T cell responses in mice with mutations affecting tyrosines 292 or 315 of the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *J. Exp. Med.* 194, 491–505.

Malavasi, F., Deaglio, S., Damle, R., Cutrona, G., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2011). CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* 118, 3470–3478.

Marcucci, F., and Mele, A. (2011). Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities. *Blood* 117, 1792–1798.

Marczynke, M., Groeger, K., and Seitz, O. (2017). Selective binders of the tandem SH2 domains in Syk and ZAP-70 kinases by DNA-programmed spatial screening. *Bioconjug. Chem.*

Matsuda, F., Shin, E.K., Nagaoka, H., Matsumura, R., Haino, M., Fukita, Y., Takaishi, S., Imai, T., Riley, J.H., and Anand, R. (1993). Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Nat. Genet.* 3, 88–94.

Matutes, E., and Polliack, A. (2000). Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* 4, 22–47.

Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Garcia Marco, J., Houlihan, A., Que,

- T.H., and Catovsky, D. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 8, 1640–1645.
- Maura, F., Visco, C., Falisi, E., Reda, G., Fabris, S., Agnelli, L., Tuana, G., Lionetti, M., Guercini, N., Novella, E., et al. (2013). B-cell receptor configuration and adverse cytogenetics are associated with autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 88, 32–36.
- Mauro, F.R., Foa, R., Cerretti, R., Giannarelli, D., Coluzzi, S., Mandelli, F., and Girelli, G. (2000). Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 95, 2786–2792.
- McMillan, R. (2003). Antiplatelet antibodies in chronic adult immune thrombocytopenic purpura: assays and epitopes. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 25 *Suppl 1*, S57-61.
- Means, R.T. (2016). Pure red cell aplasia. *Blood* 128, 2504–2509.
- Meffre, E., Schaefer, A., Wardemann, H., Wilson, P., Davis, E., and Nussenzweig, M.C. (2004). Surrogate light chain expressing human peripheral B cells produce self-reactive antibodies. *J. Exp. Med.* 199, 145–150.
- Meinl, E., Lengenfelder, D., Blank, N., Pirzer, R., Barata, L., and Hivroz, C. (2000). Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 3578–3583.
- Melichar, H.J., Ross, J.O., Herzmark, P., Hogquist, K.A., and Robey, E.A. (2013). Distinct temporal patterns of T cell receptor signaling during positive versus negative selection in situ. *Sci. Signal.* 6, ra92.
- Melo, J.V., Catovsky, D., Gregory, W.M., and Galton, D.A. (1987). The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. IV. Analysis of survival and prognostic features. *Br. J. Haematol.* 65, 23–29.
- Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gauld, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L.J., and Cambier, J.C. (2006). Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* 25, 953–962.
- Messmer, B.T. (2004). Multiple Distinct Sets of Stereotyped Antigen Receptors Indicate a Role for Antigen in Promoting Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Exp. Med.* 200, 519–525.
- Michelutti, A., Gremese, E., Morassi, F., Petricca, L., Arena, V., Tolusso, B., Alivernini, S., Peluso, G., Bosello, S.L., and Ferraccioli, G. (2011). B-cell subsets in the joint compartments of seropositive and seronegative rheumatoid arthritis (RA) and no-RA arthritides express memory markers and ZAP70 and characterize the aggregate pattern irrespectively of the autoantibody status. *Mol. Med.* 17, 901.
- Mikhailik, A., Ford, B., Keller, J., Chen, Y., Nassar, N., and Carpino, N. (2007). A phosphatase activity of Sts-1 contributes to the suppression of TCR signaling. *Mol. Cell* 27, 486–497.
- Mills, K.H.G. (2011). TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 807–822.

- Mirzaei, H., Fathollahzadeh, S., Khanmohammadi, R., Darijani, M., Momeni, F., Masoudifar, A., Goodarzi, M., Mardanshah, O., Stenvang, J., Jaafari, M.R., et al. (2018). State of the art in microRNA as diagnostic and therapeutic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *J. Cell. Physiol.* 233, 888–900.
- Molica, S., Reverter, J.C., Alberti, A., and Montserrat, E. (1990). Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance. *Eur. J. Haematol.* 44, 277–281.
- Molica, S., Giannarelli, D., Mirabelli, R., Levato, L., Kay, N.E., and Shanafelt, T.D. (2017). Chronic lymphocytic leukemia international prognostic index (CLL-IPI): a systematic review and meta-analysis. *Blood.*
- Morande, P.E., Borge, M., Abreu, C., Galletti, J., Zanetti, S.R., Nannini, P., Bezares, R.F., Pantano, S., Dighiero, G., Oppezzo, P., et al. (2015). Surface localization of high-mobility group nucleosome-binding protein 2 on leukemic B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia is related to secondary autoimmune hemolytic anemia. *Leuk. Lymphoma* 56, 1115–1122.
- Moreau, E.J., Matutes, E., A'Hern, R.P., Morilla, A.M., Morilla, R.M., Owusu-Ankomah, K.A., Seon, B.K., and Catovsky, D. (1997). Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am. J. Clin. Pathol.* 108, 378–382.
- Moreno, C., Hodgson, K., Ferrer, G., Elena, M., Filella, X., Pereira, A., Baumann, T., and Montserrat, E. (2010). Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance. *Blood* 116, 4771–4776.
- Morrison, V.A. (2010). Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 23, 145–153.
- Murray, F., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Tobin, G., Boudjogra, M., Scielzo, C., Laoutaris, N., Karlsson, K., Baran-Marzsak, F., Tsaftaris, A., et al. (2008). Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 111, 1524–1533.
- Muzio, M., Scielzo, C., Bertilaccio, M.T.S., Frenquelli, M., Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2009). Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 144, 507–516.
- Narducci, M.G., Pescarmona, E., Lazzeri, C., Signoretti, S., Lavinia, A.M., Remotti, D., Scala, E., Baroni, C.D., Stoppacciaro, A., Croce, C.M., et al. (2000). Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues. *Cancer Res.* 60, 2095–2100.
- Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A.C., and Loh, D.Y. (1995a). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376, 435–438.
- Neunert, C., Lim, W., Crowther, M., Cohen, A., Solberg, L., Crowther, M.A., and American Society of Hematology (2011). The American Society of Hematology 2011

evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 117, 4190–4207.

Nitschke, L. (2009). CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. *Immunol. Rev.* 230, 128–143.

Nolz, J.C., Tschumper, R.C., Pittner, B.T., Darce, J.R., Kay, N.E., and Jelinek, D.F. (2005). ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia* 19, 1018–1024.

Ntoufa, S., Vilia, M.G., Stamatopoulos, K., Ghia, P., and Muzio, M. (2016). Toll-like receptors signaling: A complex network for NF- κ B activation in B-cell lymphoid malignancies. *Semin. Cancer Biol.* 39, 15–25.

Oakes, C.C., Claus, R., Gu, L., Assenov, Y., Hüllein, J., Zucknick, M., Bieg, M., Brocks, D., Bogatyrova, O., Schmidt, C.R., et al. (2014). Evolution of DNA methylation is linked to genetic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Discov.* 4, 348–361.

van Oers, N.S., Killeen, N., and Weiss, A. (1994). ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity* 1, 675–685.

Ojha, J., Ayres, J., Secreto, C., Tschumper, R., Rabe, K., Van Dyke, D., Slager, S., Shanafelt, T., Fonseca, R., Kay, N.E., et al. (2015). Deep sequencing identifies genetic heterogeneity and recurrent convergent evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 125, 492–498.

Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P.W., Hamblin, T.J., Staudt, L.M., and Oscier, D.G. (2004). ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* 363, 105–111.

Oscier, D.G., Rose-Zerilli, M.J.J., Winkelmann, N., Gonzalez de Castro, D., Gomez, B., Forster, J., Parker, H., Parker, A., Gardiner, A., Collins, A., et al. (2013). The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 121, 468–475.

Ottinger, E.A., Botfield, M.C., and Shoelson, S.E. (1998). Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 729–735.

Oya, K., Wang, J., Watanabe, Y., Koga, R., and Watanabe, T. (2003). Appearance of the LAT protein at an early stage of B-cell development and its possible role. *Immunology* 109, 351–359.

Packham, G., Krysov, S., Allen, A., Savelyeva, N., Steele, A.J., Forconi, F., and Stevenson, F.K. (2014). The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica* 99, 1138–1148.

Palacios, E.H., and Weiss, A. (2007). Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *J. Exp. Med.* 204, 1703–1715.

Pan, J.W.Y., Cook, L.S., Schwartz, S.M., and Weis, N.S. (2002). Incidence of leukemia in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* 13, 791–795.

- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., et al. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 11816–11821.
- Patten, P.E., Buggins, A.G., Richards, J., Wotherspoon, A., Salisbury, J., Mufti, G.J., Hamblin, T.J., and Devereux, S. (2008). CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* *111*, 5173–5181.
- Pelosi, M., Di Bartolo, V., Mounier, V., Mège, D., Pascussi, J.M., Dufour, E., Blondel, A., and Acuto, O. (1999). Tyrosine 319 in the interdomain B of ZAP-70 is a binding site for the Src homology 2 domain of Lck. *J. Biol. Chem.* *274*, 14229–14237.
- Perry, F.E., Barker, R.N., Mazza, G., Day, M.J., Wells, A.D., Shen, C.R., Schofield, A.E., and Elson, C.J. (1996). Autoreactive T cell specificity in autoimmune hemolytic anemia of the NZB mouse. *Eur. J. Immunol.* *26*, 136–141.
- Petlickovski, A., Laurenti, L., Li, X., Marietti, S., Chiusolo, P., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2005). Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* *105*, 4820–4827.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 767–777.
- Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S.T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 161–196.
- Plas, D.R., Johnson, R., Pingel, J.T., Matthews, R.J., Dalton, M., Roy, G., Chan, A.C., and Thomas, M.L. (1996). Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science* *272*, 1173–1176.
- Plaza, J.A., Comfere, N.I., Gibson, L.E., Colgan, M., Davis, D.M.R., Pittelkow, M.R., and Colgan, J.P. (2009). Unusual cutaneous manifestations of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Am. Acad. Dermatol.* *60*, 772–780.
- Poliani, P.L., Fontana, E., Roifman, C.M., and Notarangelo, L.D. (2013). ζ Chain-associated protein of 70 kDa (ZAP70) deficiency in human subjects is associated with abnormalities of thymic stromal cells: Implications for T-cell tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 597-600.e1-2.
- Pontikoglou, C., Kalpadakis, C., and Papadaki, H.A. (2011). Pathophysiologic mechanisms and management of neutropenia associated with large granular lymphocytic leukemia. *Expert Rev. Hematol.* *4*, 317–328.
- Ponzoni, M., Doglioni, C., and Caligaris-Cappio, F. (2011). Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment. *Semin. Diagn. Pathol.* *28*, 161–166.
- Pozzo, F., Bittolo, T., Arruga, F., Bulian, P., Macor, P., Tissino, E., Gizdic, B., Rossi, F.M., Bomben, R., Zucchetto, A., et al. (2016). NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. *Leukemia* *30*, 182–189.
- Pritchard, N.R., and Smith, K.G. (2003). B cell inhibitory receptors and autoimmunity.

Immunology 108, 263–273.

Puente, X.S., Beà, S., Valdés-Mas, R., Villamor, N., Gutiérrez-Abril, J., Martín-Subero, J.I., Munar, M., Rubio-Pérez, C., Jares, P., Aymerich, M., et al. (2015). Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 526, 519–524.

Qian, D., Mollenauer, M.N., and Weiss, A. (1996). Dominant-negative zeta-associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* 183, 611–620.

Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordóñez, G.R., Jares, P., Bassaganyas, L., Ramsay, A.J., Beà, S., Pinyol, M., Martínez-Trillos, A., et al. (2011). Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 44, 47–52.

Quinquenel, A., Al Nawakil, C., Baran-Marszak, F., Eclache, V., Letestu, R., Khalloufi, M., Boubaya, M., Le Roy, C., Varin-Blank, N., Delmer, A., et al. (2015). Old DAT and new data: positive direct antiglobulin test identifies a subgroup with poor outcome among chronic lymphocytic leukemia stage A patients. *Am. J. Hematol.* 90, E5-8.

Raanani, P., Gafter-Gvili, A., Paul, M., Ben-Bassat, I., Leibovici, L., and Shpilberg, O. (2008). Immunoglobulin prophylaxis in hematological malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006501.

Rai, K.R. (1987). A critical analysis of staging in CLL. *Gale RP Rai KRed Chronic Lymphocytic Leuk. Recent Prog. Future Dir. N. Y. Alan R Liss* 253–264.

Raponi, S., Della Starza, I., De Propriis, M.S., Del Giudice, I., Mauro, F.R., Marinelli, M., Di Maio, V., Piciocchi, A., Foà, R., and Guarini, A. (2014). 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.

Rassenti, L.Z., Huynh, L., Toy, T.L., Chen, L., Keating, M.J., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Flinn, I.W., Rai, K.R., Byrd, J.C., et al. (2004). 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.

Rassenti, L.Z., Jain, S., Keating, M.J., Wierda, W.G., Grever, M.R., Byrd, J.C., Kay, N.E., Brown, J.R., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., et al. (2008). Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 112, 1923–1930.

Rawstron, A.C., Yuille, M.R., Fuller, J., Cullen, M., Kennedy, B., Richards, S.J., Jack, A.S., Matutes, E., Catovsky, D., Hillmen, P., et al. (2002). Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 100, 2289–2290.

Rawstron, A.C., Bennett, F.L., O'Connor, S.J.M., Kwok, M., Fenton, J.A.L., Plummer, M., de Tute, R., Owen, R.G., Richards, S.J., Jack, A.S., et al. (2008). Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 359, 575–583.

Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal, E., Terol, M.J., Van den Steen, P.E., Hernández del Cerro, M., Roderfeld, M., Roeb, E., Opdenakker, G., García-Marco, J.A., and García-Pardo, A. (2010). Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* 17, 160–172.

- Reth, M. (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.* *3*, 1129–1134.
- Richardson, S.J., Matthews, C., Catherwood, M.A., Alexander, H.D., Carey, B.S., Farrugia, J., Gardiner, A., Mould, S., Oscier, D., Copplestone, J.A., et al. (2006). ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* *107*, 3584–3592.
- Riches, J.C., Ramsay, A.G., and Gribben, J.G. (2010). T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Semin. Cancer Biol.* *20*, 431–438.
- Rizzo, D., Bouvier, G., Youlyouz-Marfak, I., Guerin, E., Trimoreau, F., Bordessoule, D., Jaccard, A., Gachard, N., and Feuillard, J. (2013). T/B ratio does not reflect levels of ZAP70 expression in clonal CLL B-cells due to ZAP70 overexpression in patient T-cells. *Cytometry B Clin. Cytom.* *84*, 125–132.
- Rogers, K.A., and Woyach, J.A. (2016). Secondary autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* *43*, 300–310.
- Roifman, C.M., Dadi, H., Somech, R., Nahum, A., and Sharfe, N. (2010). Characterization of ζ -associated protein, 70 kd (ZAP70)-deficient human lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 1226-1233.e1.
- Rolli, V., Gallwitz, M., Wossning, T., Flemming, A., Schamel, W.W.A., Zürn, C., and Reth, M. (2002). Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol. Cell* *10*, 1057–1069.
- Roncagalli, R., Hauri, S., Fiore, F., Liang, Y., Chen, Z., Sansoni, A., Kanduri, K., Joly, R., Malzac, A., Lähdesmäki, H., et al. (2014). Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. *Nat. Immunol.* *15*, 384–392.
- Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., Tabilio, A., Di Ianni, M., Fettucciari, K., Bartoli, A., Coaccioli, S., Screpanti, I., and Marconi, P. (2009). Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* *113*, 856–865.
- Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., et al. (2001). Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* *194*, 1639–1648.
- Rossi, D. (2016). Richter's syndrome: Novel and promising therapeutic alternatives. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *29*, 30–39.
- Rossi, D., Cerri, M., Capello, D., Deambrogi, C., Rossi, F.M., Zucchetto, A., De Paoli, L., Cresta, S., Rasi, S., Spina, V., et al. (2008). Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br. J. Haematol.* *142*, 202–215.
- Rossi, D., Spina, V., Cerri, M., Rasi, S., Deambrogi, C., De Paoli, L., Laurenti, L., Maffei, R., Forconi, F., Bertoni, F., et al. (2009a). Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 4415–4422.

Rossi, D., Lobetti Bodoni, C., Genuardi, E., Monitillo, L., Drandi, D., Cerri, M., Deambrogi, C., Ricca, I., Rocci, A., Ferrero, S., et al. (2009b). Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 23, 1062–1072.

Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., Del Giudice, I., Fabbri, G., Bruscaggin, A., et al. (2012a). Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119, 2854–2862.

Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Fangazio, M., Monti, S., Greco, M., Ciardullo, C., Famà, R., Cresta, S., Bruscaggin, A., et al. (2012b). Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br. J. Haematol.* 158, 426–429.

Rossi, F.M., Del Principe, M.I., Rossi, D., Irno Consalvo, M., Luciano, F., Zucchetto, A., Bulian, P., Bomben, R., Dal Bo, M., Fangazio, M., et al. (2010). Prognostic impact of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia: mean fluorescence intensity T/B ratio versus percentage of positive cells. *J. Transl. Med.* 8, 23.

Rossignol, J., Michallet, A.-S., Oberic, L., Picard, M., Garon, A., Willekens, C., Dulery, R., Leleu, X., Cazin, B., and Ysebaert, L. (2011). Rituximab-cyclophosphamide-dexamethasone combination in the management of autoimmune cytopenias associated with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 25, 473–478.

Saini, M., Sinclair, C., Marshall, D., Tolaini, M., Sakaguchi, S., and Seddon, B. (2010). Regulation of Zap70 expression during thymocyte development enables temporal separation of CD4 and CD8 repertoire selection at different signaling thresholds. *Sci. Signal.* 3, ra23.

Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., et al. (2003). Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 426, 454–460.

Sakaguchi, S., Benham, H., Cope, A.P., and Thomas, R. (2012). T-cell receptor signaling and the pathogenesis of autoimmune arthritis: insights from mouse and man. *Immunol. Cell Biol.* 90, 277–287.

Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Guszczynski, T., Copeland, T.D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A.J., and Ashwell, J.D. (2005). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat. Immunol.* 6, 390–395.

San Luis, B., Sondgeroth, B., Nassar, N., and Carpino, N. (2011). Sts-2 is a phosphatase that negatively regulates zeta-associated protein (ZAP)-70 and T cell receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 286, 15943–15954.

Sarfati, M., Chevret, S., Chastang, C., Biron, G., Stryckmans, P., Delespesse, G., Binet, J.L., Merle-Beral, H., and Bron, D. (1996). Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 88, 4259–4264.

Sasaki, Y., Derudder, E., Hobeika, E., Pelanda, R., Reth, M., Rajewsky, K., and

Schmidt-Supprian, M. (2006). Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. *Immunity* 24, 729–739.

Scarfò, L., Ferreri, A.J.M., and Ghia, P. (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 104, 169–182.

Schickel, J.-N., Pasquali, J.-L., Soley, A., Knapp, A.-M., Decossas, M., Kern, A., Fauny, J.-D., Marcellin, L., Korganow, A.-S., Martin, T., et al. (2012). Carabin deficiency in B cells increases BCR-TLR9 costimulation-induced autoimmunity. *EMBO Mol. Med.* 4, 1261–1275.

Schim van der Loeff, I., Hsu, L.-Y., Saini, M., Weiss, A., and Seddon, B. (2014). Zap70 is essential for long-term survival of naive CD8 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 2873–2880.

Schuh, K., Avots, A., Tony, H.P., Serfling, E., and Kneitz, C. (1996). Nuclear NF-ATp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients. *Leuk. Lymphoma* 23, 583–592.

Schweighoffer, E., Vanes, L., Mathiot, A., Nakamura, T., and Tybulewicz, V.L.J. (2003). Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity* 18, 523–533.

Scielzo, C., Camporeale, A., Geuna, M., Alessio, M., Poggi, A., Zocchi, M.R., Chilosi, M., Caligaris-Cappio, F., and Ghia, P. (2006). ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia* 20, 689–695.

Sehn, L.H., Goy, A., Offner, F.C., Martinelli, G., Caballero, M.D., Gadeberg, O., Baetz, T., Zelenetz, A.D., Gaidano, G., Fayad, L.E., et al. (2015). Randomized Phase II Trial Comparing Obinutuzumab (GA101) With Rituximab in Patients With Relapsed CD20+ Indolent B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: Final Analysis of the GAUSS Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 3467–3474.

Seifert, M., and Kuppers, R. (2009). Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J. Exp. Med.* 206, 2659–2669.

Seifert, M., Sellmann, L., Bloehdorn, J., Wein, F., Stilgenbauer, S., Dürig, J., and Küppers, R. (2012). Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 209, 2183–2198.

Shankey, T.V., Forman, M., Scibelli, P., Cobb, J., Smith, C.M., Mills, R., Holdaway, K., Bernal-Hoyos, E., Van Der Heiden, M., Popma, J., et al. (2006). An optimized whole blood method for flow cytometric measurement of ZAP-70 protein expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70, 259–269.

Shirkani, A., Shahrooei, M., Azizi, G., Rokni-Zadeh, H., Abolhassani, H., Farrokhi, S., Frans, G., Bossuyt, X., and Aghamohammadi, A. (2017). Novel Mutation of ZAP-70-related Combined Immunodeficiency: First Case from the National Iranian Registry and Review of the Literature. *Immunol. Invest.* 46, 70–79.

Shlomchik, M.J., Aucoin, A.H., Pisetsky, D.S., and Weigert, M.G. (1987). Structure and

function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 9150–9154.

Shvidel, L., Tadmor, T., Braester, A., Bairey, O., Rahimi-Levene, N., Herishanu, Y., Klepfish, A., Shtalrid, M., Berrebi, A., Polliack, A., et al. (2013). Pathogenesis, prevalence, and prognostic significance of cytopenias in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a retrospective comparative study of 213 patients from a national CLL database of 1,518 cases. *Ann. Hematol.* 92, 661–667.

Siggs, O.M., Miosge, L.A., Yates, A.L., Kucharska, E.M., Sheahan, D., Brdicka, T., Weiss, A., Liston, A., and Goodnow, C.C. (2007). Opposing functions of the T cell receptor kinase ZAP-70 in immunity and tolerance differentially titrate in response to nucleotide substitutions. *Immunity* 27, 912–926.

Simoni, L., Delgado, V., Ruer-Laventie, J., Bouis, D., Soley, A., Heyer, V., Robert, I., Gies, V., Martin, T., Korganow, A.-S., et al. (2018). Trib1 Is Overexpressed in Systemic Lupus Erythematosus, While It Regulates Immunoglobulin Production in Murine B Cells. *Front. Immunol.* 9, 373.

Sinclair, C., Ono, M., and Seddon, B. (2015). A Zap70-dependent feedback circuit is essential for efficient selection of CD4 lineage thymocytes. *Immunol. Cell Biol.* 93, 406–416.

Skopelja-Gardner, S., Jones, J.D., Hamilton, B.J., Danilov, A.V., and Rigby, W.F.C. (2017). Role for ZAP-70 Signaling in the Differential Effector Functions of Rituximab and Obinutuzumab (GA101) in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 199, 1275–1282.

Slager, S.L., Benavente, Y., Blair, A., Vermeulen, R., Cerhan, J.R., Costantini, A.S., Monnereau, A., Nieters, A., Clavel, J., Call, T.G., et al. (2014). Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2014, 41–51.

Stamatopoulos, K., Agathangelidis, A., Rosenquist, R., and Ghia, P. (2017). Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 31, 282–291.

Stefanová, I., Dorfman, J.R., and Germain, R.N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420, 429–434.

Steininger, C., Widhopf, G.F., Ghia, E.M., Morello, C.S., Vanura, K., Sanders, R., Spector, D., Guiney, D., Jäger, U., and Kipps, T.J. (2012). Recombinant antibodies encoded by IGHV1-69 react with pUL32, a phosphoprotein of cytomegalovirus and B-cell superantigen. *Blood* 119, 2293–2301.

Stilgenbauer, S., Schnaiter, A., Paschka, P., Zenz, T., Rossi, M., Döhner, K., Bühler, A., Böttcher, S., Ritgen, M., Kneba, M., et al. (2014). Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* 123, 3247–3254.

Strati, P., Keating, M.J., O'Brien, S.M., Burger, J., Ferrajoli, A., Jain, N., Tambaro, F.P., Estrov, Z., Jorgensen, J., Challagundla, P., et al. (2014). Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood*

123, 3727–3732.

Su, Y., and Jumaa, H. (2003). LAT links the pre-BCR to calcium signaling. *Immunity* 19, 295–305.

Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390.

Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., and Kurosaki, T. (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J.* 13, 1341–1349.

Tambaro, F.P., Garcia-Manero, G., O'Brien, S.M., Faderl, S.H., Ferrajoli, A., Burger, J.A., Pierce, S., Wang, X., Do, K.-A., Kantarjian, H.M., et al. (2016). Outcomes for patients with chronic lymphocytic leukemia and acute leukemia or myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 30, 325–330.

Taylor, R.P., and Lindorfer, M.A. (2015). Fcγ-receptor-mediated trogocytosis impacts mAb-based therapies: historical precedence and recent developments. *Blood* 125, 762–766.

Teixeira Mendes, L.S., and Wotherspoon, A. (2017). Marginal zone lymphoma: Associated autoimmunity and auto-immune disorders. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 30, 65–76.

Thien, C.B.F., Scaife, R.M., Papadimitriou, J.M., Murphy, M.A., Bowtell, D.D.L., and Langdon, W.Y. (2003). A mouse with a loss-of-function mutation in the c-Cbl TKB domain shows perturbed thymocyte signaling without enhancing the activity of the ZAP-70 tyrosine kinase. *J. Exp. Med.* 197, 503–513.

Thien, M., Phan, T.G., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., and Brink, R. (2004). Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20, 785–798.

Thill, P.A., Weiss, A., and Chakraborty, A.K. (2016). Phosphorylation of a Tyrosine Residue on Zap70 by Lck and Its Subsequent Binding via an SH2 Domain May Be a Key Gatekeeper of T Cell Receptor Signaling In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 36, 2396–2402.

Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J. Immunol. Methods* 329, 112–124.

Tolusso, B., De Santis, M., Bosello, S., Gremese, E., Gobessi, S., Cuoghi, I., Totaro, M.C., Bigotti, G., Rumi, C., Efremov, D.G., et al. (2009). Synovial B cells of rheumatoid arthritis express ZAP-70 which increases the survival and correlates with the inflammatory and autoimmune phenotype. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 131, 98–108.

Tsimberidou, A.-M., Wen, S., McLaughlin, P., O'Brien, S., Wierda, W.G., Lerner, S., Strom, S., Freireich, E.J., Medeiros, L.J., Kantarjian, H.M., et al. (2009). Other malignancies in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 904–910.

- Turner, M., Mee, P.J., Costello, P.S., Williams, O., Price, A.A., Duddy, L.P., Furlong, M.T., Geahlen, R.L., and Tybulewicz, V.L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* *378*, 298–302.
- Turner, M., Gulbranson-Judge, A., Quinn, M.E., Walters, A.E., MacLennan, I.C., and Tybulewicz, V.L. (1997). Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J. Exp. Med.* *186*, 2013–2021.
- Turul, T., Tezcan, I., Artac, H., de Bruin-Versteeg, S., Barendregt, B.H., Reisli, I., Sanal, O., van Dongen, J.J.M., and van der Burg, M. (2009). Clinical heterogeneity can hamper the diagnosis of patients with ZAP70 deficiency. *Eur. J. Pediatr.* *168*, 87–93.
- Van Bockstaele, F., Verhasselt, B., and Philippé, J. (2009). Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Rev.* *23*, 25–47.
- Van Laethem, F., Tikhonova, A.N., Pobezinsky, L.A., Tai, X., Kimura, M.Y., Le Saout, C., Guinter, T.I., Adams, A., Sharrow, S.O., Bernhardt, G., et al. (2013). Lck availability during thymic selection determines the recognition specificity of the T cell repertoire. *Cell* *154*, 1326–1341.
- Vences-Catalán, F., and Santos-Argumedo, L. (2011). CD38 through the life of a murine B lymphocyte. *IUBMB Life* *63*, 840–846.
- Vila, J., Isaacs, J.D., and Anderson, A.E. (2009). Regulatory T cells and autoimmunity. *Curr. Opin. Hematol.* *16*, 274–279.
- Visco, C., Ruggeri, M., Laura Evangelista, M., Stasi, R., Zanotti, R., Giaretta, I., Ambrosetti, A., Madeo, D., Pizzolo, G., and Rodeghiero, F. (2008). Impact of immune thrombocytopenia on the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *111*, 1110–1116.
- Visco, C., Maura, F., Tuana, G., Agnelli, L., Lionetti, M., Fabris, S., Novella, E., Giaretta, I., Reda, G., Barcellini, W., et al. (2012). Immune Thrombocytopenia in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Is Associated with Stereotyped B-cell Receptors. *Clin. Cancer Res.* *18*, 1870–1878.
- Visco, C., Barcellini, W., Maura, F., Neri, A., Cortelezzi, A., and Rodeghiero, F. (2014a). Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* *89*, 1055–1062.
- Visco, C., Cortelezzi, A., Moretta, F., Falisi, E., Maura, F., Finotto, S., Barcellini, W., Ambrosetti, A., Neri, A., Ruggeri, M., et al. (2014b). Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia at disease presentation in the modern treatment era: is stage C always stage C? *Leuk. Lymphoma* *55*, 1261–1265.
- Visentin, A., Compagno, N., Cinetto, F., Imbergamo, S., Zambello, R., Piazza, F., Semenzato, G., Trentin, L., and Agostini, C. (2015). Clinical profile associated with infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. Protective role of immunoglobulin replacement therapy. *Haematologica* *100*, e515-518.
- Vroblova, V., Smolej, L., and Krejsek, J. (2012). Pitfalls and limitations of ZAP-70 detection in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Amst. Neth.* *17*, 268–274.
- Wadhwa, P.D., and Morrison, V.A. (2006). Infectious complications of chronic

lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* 33, 240–249.

Wagner, M., Oelsner, M., Moore, A., Götte, F., Kuhn, P.-H., Haferlach, T., Fiegl, M., Bogner, C., Baxter, E.J., Peschel, C., et al. (2016). Integration of innate into adaptive immune responses in ZAP-70-positive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 127, 436–448.

Wang, H., Kadlecsek, T.A., Au-Yeung, B.B., Goodfellow, H.E.S., Hsu, L.-Y., Freedman, T.S., and Weiss, A. (2010). ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002279.

Wang, H.Y., Altman, Y., Fang, D., Elly, C., Dai, Y., Shao, Y., and Liu, Y.C. (2001). Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70. *J. Biol. Chem.* 276, 26004–26011.

Wang, L., Bu, D., Yang, Y., Chen, X., and Zhu, X. (2004). Castleman's tumours and production of autoantibody in paraneoplastic pemphigus. *Lancet Lond. Engl.* 363, 525–531.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374–1377.

Watanabe, N., Nisitani, S., Ikuta, K., Suzuki, M., Chiba, T., and Honjo, T. (1999). Expression levels of B cell surface immunoglobulin regulate efficiency of allelic exclusion and size of autoreactive B-1 cell compartment. *J. Exp. Med.* 190, 461–469.

Watts, J.D., Affolter, M., Krebs, D.L., Wange, R.L., Samelson, L.E., and Aebersold, R. (1994). Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 269, 29520–29529.

Weiss, R.B., Freiman, J., Kweder, S.L., Diehl, L.F., and Byrd, J.C. (1998). Hemolytic anemia after fludarabine therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 16, 1885–1889.

Wen, L., Brill-Dashoff, J., Shinton, S.A., Asano, M., Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2005). Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen. *Immunity* 23, 297–308.

Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T.S., Wright, G., Davis, R.E., Henrickson, S.E., Zhao, H., Ibbotson, R.E., Orchard, J.A., Davis, Z., et al. (2003). ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101, 4944–4951.

Williams, B.L., Irvin, B.J., Sutor, S.L., Chini, C.C., Yacyshyn, E., Bubeck Wardenburg, J., Dalton, M., Chan, A.C., and Abraham, R.T. (1999). Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *EMBO J.* 18, 1832–1844.

Willis, F., Marsh, J.C., Bevan, D.H., Killick, S.B., Lucas, G., Griffiths, R., Ouwehand, W., Hale, G., Waldmann, H., and Gordon-Smith, E.C. (2001). The effect of treatment with Campath-1H in patients with autoimmune cytopenias. *Br. J. Haematol.* 114, 891–

898.

Xiao, C., Calado, D.P., Galler, G., Thai, T.-H., Patterson, H.C., Wang, J., Rajewsky, N., Bender, T.P., and Rajewsky, K. (2007). MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell* 131, 146–159.

Xu, L., Zhang, T., Liu, Z., Li, Q., Xu, Z., and Ren, T. (2012). Critical role of Th17 cells in development of autoimmune hemolytic anemia. *Exp. Hematol.* 40, 994-1004.e4.

Yan, Q., Barros, T., Visperas, P.R., Deindl, S., Kadlecsek, T.A., Weiss, A., and Kuriyan, J. (2013). Structural basis for activation of ZAP-70 by phosphorylation of the SH2-kinase linker. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2188–2201.

Yang, M., Chen, T., Li, X., Yu, Z., Tang, S., Wang, C., Gu, Y., Liu, Y., Xu, S., Li, W., et al. (2015). K33-linked polyubiquitination of Zap70 by Nrdp1 controls CD8(+) T cell activation. *Nat. Immunol.* 16, 1253–1262.

Yasuda, T., Sanjo, H., Pagès, G., Kawano, Y., Karasuyama, H., Pouysségur, J., Ogata, M., and Kurosaki, T. (2008). Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity* 28, 499–508.

Ye, X., Zhang, L., Wang, H., Chen, Y., Zhang, W., Zhu, R., Fang, C., Deng, A., and Qian, B. (2015). The role of IL-23/Th17 pathway in patients with primary immune thrombocytopenia. *PloS One* 10, e0117704.

Zanotti, R., Frattini, F., Ghia, P., Visco, C., Zamò, A., Perbellini, O., Stella, S., Facco, M., Giaretta, I., Chilosi, M., et al. (2010). ZAP-70 expression is associated with increased risk of autoimmune cytopenias in CLL patients. *Am. J. Hematol.* 85, 494–498.

Zent, C.S., Ding, W., Schwager, S.M., Reinalda, M.S., Hoyer, J.D., Jelinek, D.F., Tschumper, R.C., Bowen, D.A., Call, T.G., Shanafelt, T.D., et al. (2008). The prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. *Br. J. Haematol.* 141, 615–621.

Zenz, T., and Stilgenbauer, S. (2009). Therapy with the FCR regimen does not overcome chronic lymphocytic leukemia biology: aberrant p53 expression predicts response and survival. *Leuk. Lymphoma* 50, 1559–1561.

Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H., and Stilgenbauer, S. (2010a). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer.*

Zenz, T., Eichhorst, B., Busch, R., Denzel, T., Häbe, S., Winkler, D., Bühler, A., Edelmann, J., Bergmann, M., Hopfinger, G., et al. (2010b). TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 4473–4479.

Zhang, S., and Kipps, T.J. (2014). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annu. Rev. Pathol.* 9, 103–118.

Zhang, Z., Burrows, P.D., and Cooper, M.D. (2004). The molecular basis and biological significance of VH replacement. *Immunol. Rev.* 197, 231–242.

Zhao, Y., Zhu, M., Jiang, M., Zuo, B., Wu, Q., Ruan, C., and He, Y. (2015). An improved

flow cytometric immunobead array to detect autoantibodies in plasma from patients with immune thrombocytopenic purpura. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 438, 396–400.

Zhou, W., Yin, Y., Weinheimer, A.S., Kaur, N., Carpino, N., and French, J.B. (2017). Structural and functional characterization of the histidine phosphatase domains of human Sts-1 and Sts-2. *Biochemistry (Mosc.)*.

Zhu, X., and Zhang, B. (2007). Paraneoplastic pemphigus. *J. Dermatol.* 34, 503–511.

Zucchetto, A., Bomben, R., Dal Bo, M., Sonogo, P., Nanni, P., Rupolo, M., Bulian, P., Dal Maso, L., Del Poeta, G., Del Principe, M.I., et al. (2006). A scoring system based on the expression of six surface molecules allows the identification of three prognostic risk groups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Cell. Physiol.* 207, 354–363.

Zucchetto, A., Caldana, C., Benedetti, D., Tissino, E., Rossi, F.M., Hutterer, E., Pozzo, F., Bomben, R., Dal Bo, M., D'Arena, G., et al. (2013). CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood* 122, 3317–3321.

Zupo, S., Dono, M., Massara, R., Taborelli, G., Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (1994). Expression of CD5 and CD38 by human CD5⁺ B cells: requirement for special stimuli. *Eur. J. Immunol.* 24, 1426–1433.

Expression de ZAP-70 dans les lymphocytes B non tumoraux

Implications dans la rupture de tolérance et la transformation néoplasique

Résumé

L'expression de ZAP-70 dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est associée à une hypersignalisation du BCR et à la survenue de cytopénies auto-immunes (CAI). Les LB non tumoraux expriment aussi ZAP-70, expression corrélée à celle dans les LB tumoraux et aux CAI. Nous avons montré que ces LB non tumoraux ZAP-70⁺ sont polyclonaux, sans lien moléculaire entre eux ni avec le clone tumoral et qu'il n'existe pas de stéréotypie de leur BCR. Ces LB présentent par contre un enrichissement en BCR autoréactifs. Notre modèle murin knock in *Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{+/-}* a montré qu'une forte expression précoce de ZAP-70 dans les LB est associée à un avantage sélectif médullaire, un enrichissement en cellules potentiellement autoréactives de type zone marginale, à un blocage partiel de la maturation et de la différenciation périphérique, ainsi qu'au développement de caractéristiques de la LLC : hypogammaglobulinémie, enrichissement en auto-anticorps circulants, hyperactivation et prolifération cellulaires augmentées. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives impliquant ZAP-70 dans la compréhension du développement B et de la physiopathologie de la rupture de tolérance et de la transformation néoplasique.

Mots clés : leucémie lymphoïde chronique, ZAP-70, auto-immunité, lymphocyte B

Abstract

ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) is associated with BCR hypersignalling and autoimmune cytopenia (AIC) occurrence. Non tumoral B cells also express ZAP-70, which is correlated with those in tumoral B cells and AIC. We have shown that these non tumoral B cells ZAP-70⁺ are polyclonal, without molecular link between each other and tumoral B cells, and without BCR stereotypy. These cells are however enriched in autoreactive BCR. Our mouse model knock in *Zap-70^{+/-} / Mb1-Cre^{+/-}* revealed that a high and early ZAP-70 expression is associated with medullar selective advantage, enrichment in potential autoreactive B cells of marginal zone subtype, partial block for peripheral maturation and differentiation, along with some LLC characteristics: hypogammaglobulinemia, enrichment in circulating auto-antibodies, increase in cellular activation and proliferation. These results open new opportunities involving ZAP-70 in the understanding of B cell development and physiopathology of tolerance breakdown and neoplastic transformation.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, ZAP-70, autoimmunity, B lymphocyte