

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
ImmunoRhumathologie moléculaire, INSERM UMR_S1109

THÈSE présentée par : **Cédric SCHLEISS**

soutenue le : **21 décembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Anomalies des programmes de réponse lymphocytaire
après stimulation du récepteur à l'antigène
dans la leucémie lymphoïde chronique**

THÈSE dirigée par :
Mr GEORGEL Philippe

PU, Université de Strasbourg

THÈSE encadrée par :
Mr VALLAT Laurent

MCU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Mme BARAN-MARSZAK Fanny
Mr DELIC Jozo

PU-PH, Hôpital Avicenne (HU Paris)
DR, CEA Fontenay-aux-Roses

AUTRES MEMBRES DU JURY :
Mr MARTIN Thierry
Mme MARIOTTI-FERRANDIZ Encarnita

PU-PH, CNRS, Université de Strasbourg
MCU, INSERM U 959, La Pitié-
Salpêtrière, Paris

Remerciements

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs de ma thèse, le Pr **Fanny BARAN-MARSZAK** et le Dr **Jozo DELIC** pour leur examen de mon travail. Je remercie également les autres membres du jury, le Dr **Encarnita MARIOTTI-FERRANDIZ** et le Pr **Thierry MARTIN** pour le temps qu'ils m'ont consacré.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à mon encadrant, le Dr **Laurent VALLAT**. Je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet et de m'avoir fait confiance pour le mener à bien. Merci pour votre implication et le temps phénoménal passé sur ce travail. Je vous remercie d'autant plus pour l'ensemble des corrections apportées à mon manuscrit de thèse.

Je remercie également mon directeur de thèse, le Pr **Philippe GEORGEL**, pour sa confiance en me donnant l'opportunité de réaliser cette thèse et pour l'ensemble de ses conseils et corrections portant sur ce manuscrit de thèse.

Je remercie également le Pr **Siamak Bahram**, directeur de l'unité UMR_S1109, de m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je remercie l'ensemble des collaborateurs qui ont participé à ce travail et qui ont rendu l'ensemble de ce projet possible. Je pense particulièrement à l'ensemble des cliniciens et au Pr **Raoul Herbrecht** sans qui ce travail n'aurait jamais pu débuter et se poursuivre.

Merci également aux Dr **Frédéric BERTRAND** et Dr **Myriam MAUMY-BERTRAND** pour leur précieux apport sur le plan mathématique.

Ce travail n'aurait pas été ce qu'il est sans la collaboration et l'aide apportée par l'équipe protéomique du Dr **Christine CARAPITO**.

Ensuite je souhaite faire part de ma gratitude à **Ouria** pour l'aide précieuse qu'elle m'a apporté lors des trois premières années de ma thèse. Ton aide a grandement participé à l'avancement de ce projet.

Je remercie également **Alice MEYER** pour l'ensemble de son aide logistique et scientifique ainsi que pour les nombreux moments passés ensemble.

Merci à l'ensemble de **l'équipe de l'UMR_S1109** pour votre participation et votre soutien de près ou de loin tout au long de ma thèse. Je remercie plus particulièrement **Angélique, Antoine, Nicodème** et **Raphaël CARAPITO** pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté sur le côté technique.

Remerciements

Je remercie le jeune Docteur **Ilias Wassila** d'avoir été présente dans cette situation si particulière qu'ont été nos thèses... Nous avons su nous donner mutuellement du courage et tout cela nous a permis d'arriver au bout et de décrocher ce titre si longtemps attendu !

Un remerciement spécial et tout particulier à **Ghada**. Merci pour ta présence, pour tes conseils scientifiques et ton aide technique au début de ma thèse... Ta gentillesse et ta générosité apportent tellement de réconfort. Et surtout merci pour ton énorme soutien et cela même à plus de 800km !

Je tiens à remercier très chaleureusement le Dr **Béatrice URING-LAMBERT** pour son soutien immesurable ! Votre gentillesse, vos connaissances et votre disponibilité m'ont tellement apporté tout au long de ma thèse. Vos encouragements ont très certainement participé à l'aboutissement de ma thèse. Je vous remercie également pour le temps consacré à ma petite formation en cytométrie. Nous pouvons ENFIN dire que le jour tant attendu est arrivé, nous pouvons à présent « boire ce coup » et éteindre cette soif qui dure depuis un moment maintenant !
Je remercie également l'ensemble de votre équipe pour les services qu'ils m'ont rendu tout au long de ma thèse.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de **l'équipe U1113** et son directeur **Jean-Noël FREUND** pour m'avoir accueilli au sein de l'unité lors de la toute fin de ma thèse. Merci à vous tous pour votre accueil chaleureux. Je remercie également les Dr **Dominique GUENOT** et Dr **Manuela TAVIAN** pour votre soutien.

Yonca, je te remercie tout d'abord pour m'avoir fait confiance et m'avoir laissé te transmettre mes connaissances acquises lors de mon travail de thèse. Merci pour ton aide et pour avoir participé à la soumission de mon travail. Le flambeau est transmis, continue de faire avancer ce projet, rendez-vous dans un peu plus d'un an car ton tour viendra. En attendant, bon courage car une thèse n'est pas toujours facile.

Un merci chaleureux à **Nathalie**, pour l'ensemble de ton aide technique si précieuse en cette fin de thèse. Merci à toi de nous supporter (pas toujours facile) et surtout merci pour ton soutien qui n'a jamais connu de doute quant à l'issue de ce travail. N'oublie pas trop vite nos petites pause-café pauvres en saccharose ! Ces cafés ont été essentiels pour le moral et pour se changer les idées.

Un grand merci à **l'équipe de Technicien(nes) du service de génétique** pour leurs petits dépannages par-ci par-là. Mention spéciale à **Géraldine, Samea, Manu** et **Marie** pour ces pauses repas qui ont permis de me changer les idées et de graver pas mal de souvenirs, fou-rires et discussions inoubliables. Et parfois même à pas d'heure autour du bonne tartiflette (pas vrai Gégé et Sandra ?).

Remerciements

Dans un second temps, je tiens à remercier l'ensemble des membres de ma famille. **Maman, Papa, Mémé, Pépé, Laetitia, Serge, Florence, Jean-Luc, Lulu, Pierre, Joana** et sans oublier les petits bouts **Emma et Chloé**, même si vous ne le savez peut-être pas vous m'avez été d'une grande aide. Votre présence tout au long de ma thèse et votre soutien m'ont encouragé et mon aidé à arriver au bout de celle-ci !

Sur le plan personnel, je tiens également à remercier profondément **Maxence**. Ton expédition hors des frontières alsaciennes et cette période de ma thèse n'ont pas suffi à nous éloigner ! Un grand merci pour nos discussions, ton soutien et cette amitié indélébile qui ont permis de remettre la motivation et le moral à niveau tout au long de ces années. Tu es une personne qui sait trouver les mots qu'il faut quand il le faut... Cette nouvelle voie, que tu as choisi aujourd'hui, te correspond et profitera à beaucoup de monde sans aucun doute ! Un grand merci !

Enfin, je souhaite terminer ces remerciements par une des personnes qui m'est la plus chère et à laquelle je dois réellement l'aboutissement de ma thèse, ma femme. **Sandra**, grâce à toi j'y suis arrivé ! Ton soutien tout au long de ma thèse n'a jamais failli et a été tellement précieux. La thèse est une période difficile mais grâce à ta présence à mes côtés, ta compréhension et ta patience, tout cela est devenu possible. Je te dois beaucoup donc je te dis merci d'avoir cru en moi et tout simplement merci d'être toi.

Mes remerciements vont naturellement à l'ensemble des personnes non mentionnées et que j'ai pu rencontrer et côtoyer que ce soit de près ou de loin tout au long de cette thèse.

Résumé

Une cellule reçoit en permanence des signaux de son environnement. Cette stimulation induit une cascade de signalisation activant un programme génique et protéomique dynamique aboutissant à une réponse cellulaire adaptée. Dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), la stimulation du récepteur à l'antigène induit un programme et une réponse anormale à l'origine de la prolifération leucémique.

Notre objectif est de caractériser ce programme cellulaire pathologique. Pour cela, nous avons mis en place un modèle de stimulation afin de reproduire ex vivo cette stimulation du récepteur à l'antigène de cellules primaires issues de patients porteurs de LLC et d'activer ce programme cellulaire. Nous avons alors analysé la dynamique transcriptionnelle et protéomique activée dans ces cellules afin de caractériser les anomalies de ce programme.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la spécificité de ce programme prolifératif et de caractériser les gènes clés de ce programme tumoral. Ces gènes constituent de potentielles cibles thérapeutiques innovantes.

Mots- clés : Leucémie Lymphoïde Chronique ; Récepteur à l'antigène ; Prolifération lymphocytaire ; Réseaux de régulation transcriptionnelle et protéomique

Abstract

A cell constantly receives signals from its environment. This stimulation induces a signalling cascade activating a dynamic genic and proteomic program, leading to an adapted cellular response. In chronic lymphocytic leukemia (CLL), an antigen receptor stimulation induces a program and an abnormal response behind leukemic proliferation.

Our aim was to characterize the pathological cell program. To achieve this, we have implemented a stimulation model to reproduce ex vivo antigen receptor stimulation of primary cells from CLL patients and activate this cellular program. We then analyzed the transcriptional and proteomic dynamics activated in these cells in order to characterize the abnormalities of this program.

This study allows us to highlight the specificity of this proliferative program and to identify key genes of tumor program. These genes constitute potential new therapeutic targets.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemia; Antigen receptor; Lymphocytic proliferation; Transcriptional and proteomic regulatory networks.

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux	2
Liste des abréviations.....	3
Introduction.....	6
I. Le lymphocyte B	7
I.1. Développement du lymphocyte B	7
I.2. Activation du lymphocyte B	12
I.2.1. Activation Thymo-dépendante.....	12
I.2.2. Activation Thymo-indépendante.....	13
I.2.3. Récepteur à l'antigène du lymphocyte B (BCR).....	14
I.2.3.1. Mise en place de la diversité primaire des immunoglobulines de surface	14
I.2.3.2. Mise en place d'une diversité secondaire à la suite de la rencontre avec l'antigène	17
I.2.3.3. Signalisation induite par l'activation du BCR	20
I.2.3.4. Réponse à l'activation du BCR	24
I.3. Modèles d'étude de la prolifération du lymphocyte B physiologique ex vivo	26
I.3.1. Activation <i>ex vivo</i> du récepteur à l'antigène	26
I.3.2. Activation <i>ex vivo</i> par l'utilisation de signaux de co-stimulation	27
I.3.2.1. Activation par des cytokines produites par les LT	27
I.3.2.2. Activation par le récepteur à l'antigène associée aux cytokines T	30
I.3.2.3. Activation par le récepteur TLR9	31
I.3.3. Activation par utilisation de co-cultures	31
II. La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)	34
II.1. Caractéristiques de la LLC	34
II.1.1. Définition.....	34
II.1.2. Épidémiologie.....	34
II.1.3. Diagnostic de la maladie	35
II.1.4. Stade anatomo-cliniques.....	36
II.1.5. Complications.....	37
II.2. Les traitements de la LLC	39
II.2.1. Traitements chimiothérapeutiques.....	39
II.2.2. Anticorps monoclonaux : l'anti-CD20.....	40
II.2.3. Inhibiteurs sélectifs de protéines de la voie du BCR	40
II.2.4. Inhibiteurs de la protéine anti-apoptotique Bcl-2.....	41
II.2.5. Indication Thérapeutique	41
II.3. Facteurs biologiques pronostics d'évolutivité	44
II.3.1. Le temps de doublement des lymphocytes	44
II.3.2. Statut mutationnel de gènes codants de la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgVH)	44
II.3.3. Expression de la protéine ZAP-70	45
II.3.4. Expression du marqueur CD38.....	46
II.4. Physiopathologie de la LLC.....	47
II.4.1. Terrain génétique	47

II.4.2.	Anomalies génétiques	47
II.4.2.1.	Anomalies chromosomiques	47
II.4.2.2.	Mutations génétiques.....	49
II.4.2.3.	Anomalies épigénétiques	49
II.4.3.	Anomalies des progéniteurs.....	50
II.4.3.1.	Hypothèse d’anomalies de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la leucémogénèse	50
II.4.3.2.	« Side population »	51
II.4.4.	Cellule(s) d’origine.....	52
II.4.5.	Accumulation des cellules leucémiques.....	53
II.4.5.1.	Résistance à l’apoptose des lymphocytes B de LLC	53
II.4.5.2.	Prolifération des lymphocytes B de LLC.....	54
II.4.5.3.	Rôle du microenvironnement	55
II.4.6.	Rôle du BCR dans la leucémogénèse.....	56
II.4.6.1.	Présence d’une stimulation antigénique chronique.....	56
II.4.6.2.	Signalisation et réponse cellulaire anormale des LB-LLC.....	57
II.4.7.	Modèles murins de la LLC.....	60
II.5.	Modèles d’étude de la prolifération des LB-LLC ex vivo.....	62
II.5.1.	Activation <i>ex vivo</i> du récepteur à l’antigène du B-LLC	62
II.5.2.	Activation <i>ex vivo</i> par l’utilisation de signaux de co-stimulation du LB-LLC.....	63
II.5.2.1.	Activation du LB-LLC par des cytokines produites par les LT	63
II.5.2.2.	Activation du LB-LLC par le récepteur à l’antigène associée aux cytokines T.....	65
II.5.2.3.	Activation du LB-LLC par le récepteur TLR9.....	66
II.5.3.	Activation du LB-LLC par l’utilisation de co-cultures.....	67
II.5.3.1.	Co-culture de cellules souches de moelle osseuse (BMSC)	67
II.5.3.2.	Co-culture de lymphocytes T activés	68
II.5.3.3.	Co-culture de cellules fibroblastiques	68
III.	Réponse transcriptionnelle et protéomique des LB-LLC après activation du BCR	70
III.1.	Analyse transcriptionnelle et protéomique	70
III.2.	Reconstruction des réseaux d’interactions de gènes.....	73
	Objectifs du travail de Thèse	76
	Résultats	79
	Manuscrit 1 : BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation ex vivo.....	80
	Manuscrit 2 : A core proliferative program induced by B-cell receptor stimulation in chronic lymphocytic leukemia	128
	Conclusions – Discussion	193
	Bibliographie	198
	Annexe	220
	Manuscrit : MICA is expressed at early stages of lymphoproliferation independently of the replication-induced DNA damages	221
	Résumé.....	258

Liste des figures

<i>Figure 1 : Différents stades de développement du LB et gènes clés responsables (adaptée de (Murphy and Weaver, 2017)).....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 2 : Réarrangements des chaînes lourdes et légères et expressions protéiques au cours des stades de développement du LB (adaptée de (Murphy and Weaver, 2017)).</i>	<i>10</i>
<i>Figure 3 : Structure du BCR (adaptée de (Berry et al., 2011)).</i>	<i>15</i>
<i>Figure 4 : Étapes de réarrangement des exons V(D)J des gènes codant pour les chaînes lourdes ou légères de l'immunoglobuline (adaptée de (Murphy and Weaver, 2017)).</i>	<i>17</i>
<i>Figure 5 : Représentation simplifiée d'un centre germinatif (adaptée de (Heesters et al., 2014)).</i>	<i>18</i>
<i>Figure 6 : Voies de signalisation activées suite à une stimulation du BCR et sa régulation (Adaptée de (Kanehisa et al., 2017; Murphy and Weaver, 2017)).</i>	<i>21</i>
<i>Figure 7 : Voies de signalisation activées communes avec le BCR suite à une stimulation du CD40 dans le LB. ..</i>	<i>24</i>
<i>Figure 8 : Facteurs biologiques pronostics de la LLC (adaptée de (Chiorazzi et al., 2005)).</i>	<i>46</i>
<i>Figure 9 : Représentation schématique du développement de la LLC humaine dans un modèle murin de xénogreffe (Kikushige et al., 2011).....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 10 : Voies de signalisation activées suite à la stimulation du BCR d'un LB-LLC exprimant la protéine ZAP-70 (adaptée de (Zhang and Kipps, 2014))</i>	<i>59</i>

Liste des tableaux

Tableau 1 : Rôle des cytokines dans la régulation de l'expression des différents isotypes d'immunoglobuline chez l'homme (adapté de (Avery et al., 2008a; Male et al., 2006)). 19

Tableau 2 : Marqueurs biologiques participant à l'établissement du score de Matutes (Matutes et al., 1994). . 36

Tableau 3 : Système de classification du stade anatomo-clinique selon Binet (Binet et al., 1981). 36

Liste des abréviations

ADCC	<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i>	CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	CpG	dinucléotide Cytosine-Phosphate-Guanine
AID	<i>Activation-Induced cytidine Deaminase</i>	CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
AP1	<i>Activated-Protein 1</i>	DA	Différentiellement Abondant
APRIL	<i>A Proliferation-Inducing Ligand</i>	DAG	Diacylglycérol
ATM	Ataxie Téléangiectasie Muté	DAPK1	<i>Death-Associated Protein Kinase 1</i>
BAFF	<i>B-cell Activating Factor</i>	DE	Différentiellement Exprimé
Bcl-2	<i>B-cell Lymphoma 2</i>	DLEU	<i>Deleted in Lymphocytic Leukemia</i>
BCR	<i>B-cell Receptor</i>	E2A	<i>Immunoglobulin enhancer-binding factor E12/E47</i>
BIRC3	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 3</i>	EBF	<i>Early B cell Factor</i>
BLK	<i>BLK Proto-Oncogene</i>	EDGE	<i>Extraction of Differential Gene Expression</i>
BLNK	<i>B Cell Linker</i>	Exon C	Exon Constant
BMSC	<i>Bone Marrow Stromal Cell</i>	Exon DH	Exon de Diversité de la chaîne lourde
BrdU	Bromodésoxyuridine	Exon JH	Exon de Jonction de la chaîne lourde
BTK	<i>Bruton's Tyrosine Kinase</i>	Exon JL	Exon de Jonction de la chaîne légère
Ca²⁺	Calcium	Exon S	Exon Switch
Calm	Calmoduline	Exon VH	Exon Variable de la chaîne lourde
Caln	Calcineurine	Exon VL	Exon Variable de la chaîne légère
casp8	Caspase 8	FDR	<i>False Discovery Rate</i>
CD40L	CD40 Ligand	FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
CDR	<i>Complementary Determining Regions</i>	FLT3	<i>Fms-Like Tyrosine kinase 3</i>
CFSE	<i>CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester</i>	FYN	<i>FYN Proto-Oncogene</i>
CFSEdim	<i>CFSE diminué</i>	GTP	Guanosine Tri-Phosphate
Chaîne H/IgH	Chaîne Lourde de l'Immunoglobuline	HMEC	<i>Human Mammary Epithelial Cells</i>
Chaîne L/IgL	Chaîne Légère de l'Immunoglobuline	HVR	<i>HyperVariable Region</i>
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>	Ig (M/G/A/D/E)	Immunoglobuline (M/G/A/D/E)
CMH II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II	IgVH	Région Variable de la chaîne Lourde des Immunoglobulines

IL-(4/6/...)	Interleukine-(4/6/...)	NM	Non Muté
IL-4R	Récepteur à l'IL-4	NOTCH1	<i>Notch Homolog 1</i>
IFN	Interféron	NZB	Souris <i>New-Zealand Black</i>
IP3	Inositol-triphosphate	PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymérase
IRF4	<i>Interferon Regulatory Factor 4</i>	PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>	PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i>	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
KLHL6	<i>Kelch-like 6</i>	PKC	Protéine Kinase C
LB	Lymphocyte B	PLCγ	Phospholipase C Gamma
LB-GC	Lymphocyte B du Centre Germinatif	RAG1/2	<i>Recombination-Activating Genes- 1</i>
LB-LLC	Lymphocyte B issu de patient porteur de LLC	Ras/MAPK	<i>Ras/Mitogen Activated Protein Kinase</i>
LIMMA	<i>LInear Models for MicroArrays data</i>	RB1	Gène du Rétinoblastome
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique	RFC	Retuximab/Fludarabine/cyclophosphamide
LPS	Lipopolysaccharide	RSS	<i>Recombination Signal Sequences</i>
LT	Lymphocyte T	SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
LTh	Lymphocyte T Helper	SF3B1	<i>Splicing Factor 3B subunit 1</i>
LYN	<i>LYN Proto-Oncogene</i>	SH2	<i>Src Homology 2</i>
M	Muté	SP	<i>Side-Population</i>
MBL	<i>Monoclonal B-cell Lymphocytosis</i>	STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
MCL1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>	STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
MICA	<i>MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A</i>	SYK	<i>Spleen Associated Tyrosine Kinase</i>
miRNA	Micro-ARN	TAK1	<i>Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1</i>
MYD88	<i>MYeloid Differentiation primary response gene 88</i>	TCL1	<i>T-Cell Leukemia 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-Kappa B</i>	TCR	<i>T cell receptor</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>	TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>	TLR	<i>Toll-Like Récepteur</i>
NIK	<i>Nuclear Factor κB-Inducing Kinase</i>	TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
NK	cellules <i>Natural Killer</i>	TRAFF	<i>TNF receptor associated factors</i>
NKG2D	<i>Natural-killer receptor Group 2 member D</i>	XPO1	Exportin 1
NLC	<i>Nurse-Like Cell</i>	ZAP-70	<i>Zeta-chain-Associated Protein kinase</i>

Introduction

I. Le lymphocyte B

Le lymphocyte B (LB) est une cellule de l'immunité adaptative participant à la réponse aux pathogènes et par conséquent à la défense de l'organisme. En effet, ces cellules sont responsables de la réponse humorale par leur capacité à produire des anticorps. En conditions physiologiques, la proportion de LB représente environ 10% des lymphocytes totaux du sang périphérique chez l'Homme.

La spécificité de reconnaissance antigénique des LB repose sur la présence du récepteur spécifique de l'antigène appelé le *B-Cell Receptor* (BCR) composé d'une immunoglobuline de surface.

Le rôle primordial des LB est de participer à la réponse immunitaire. Cette protection contre différents pathogènes est réalisée par différents mécanismes. Tout d'abord, la principale particularité du LB est sa capacité à produire des immunoglobulines (anticorps) spécifiques d'un antigène. Dans un premier temps, les LB expriment et peuvent sécréter une immunoglobuline d'isotype M (IgM). Après différents mécanismes que nous allons aborder par la suite, ces cellules sécrètent d'autres isotypes d'immunoglobulines ([Murphy and Weaver, 2017](#)) dont l'immunoglobuline G (IgG) qui est l'isotype principal présente dans le sérum, l'immunoglobuline A (IgA) présente essentiellement au niveau des muqueuses et des sécrétions, et enfin l'IgE et l'IgD qui à eux deux représentent moins de 1% des anticorps sériques.

Le second rôle attribué aux LB est la participation à la réponse cellulaire *via* l'activation d'autres populations cellulaires immunitaires grâce à leur aptitude à présenter un peptide d'un antigène reconnu par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II). Cela classe les LB parmi les cellules présentatrices d'antigènes.

I.1. Développement du lymphocyte B

Le processus qui aboutit à la formation et au développement des lymphocytes est appelé la lymphopoïèse. Chez l'Homme, la lymphopoïèse B se déroule exclusivement dans la moelle osseuse. Au cours de ce processus, se met en place la diversité du répertoire antigénique qui va permettre une réponse immunitaire adaptative pour répondre aux divers pathogènes. Chaque lymphocyte présente une immunoglobuline spécifique d'un antigène unique.

Le LB est issu d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP) lui-même dérivé d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) ([Busslinger, 2004](#)). Cette cellule souche multipotente est commune à l'ensemble des cellules de l'immunité puisque celle-ci conduit soit au CLP (progéniteur commun des

cellules lymphoïdes) pour la ligné lymphoïde (LB ; LT ; cellule *Natural killer* (NK)), soit au Progéniteur Myéloïde Commun (CMP) précurseur des autres cellules sanguines (macrophages, érythrocytes, mégacaryocytes...).

Dans le microenvironnement de la moelle osseuse, les cellules stromales permettent d'orienter la CSH vers la voie lymphoïde (CLP). Cette orientation est guidée par l'expression de gènes clés (Figure 1). L'entrée dans la voie lymphoïde est liée à l'activation de la tyrosine kinase de surface *Fms-Like* (FLT3) et l'expression du facteur de transcription PU.1 (Busslinger, 2004). L'expression de PU.1 associée à Ikaros entraîne l'expression d'un autre facteur de transcription E2A (*immunoglobulin enhancer-binding factor E12/E47*) qui va lui-même entraîner l'expression du facteur précoce des LB (EBF) (Maeda et al., 2007). L'expression de ces derniers facteurs de transcription marque l'entrée dans le développement spécifique de la lignée B.

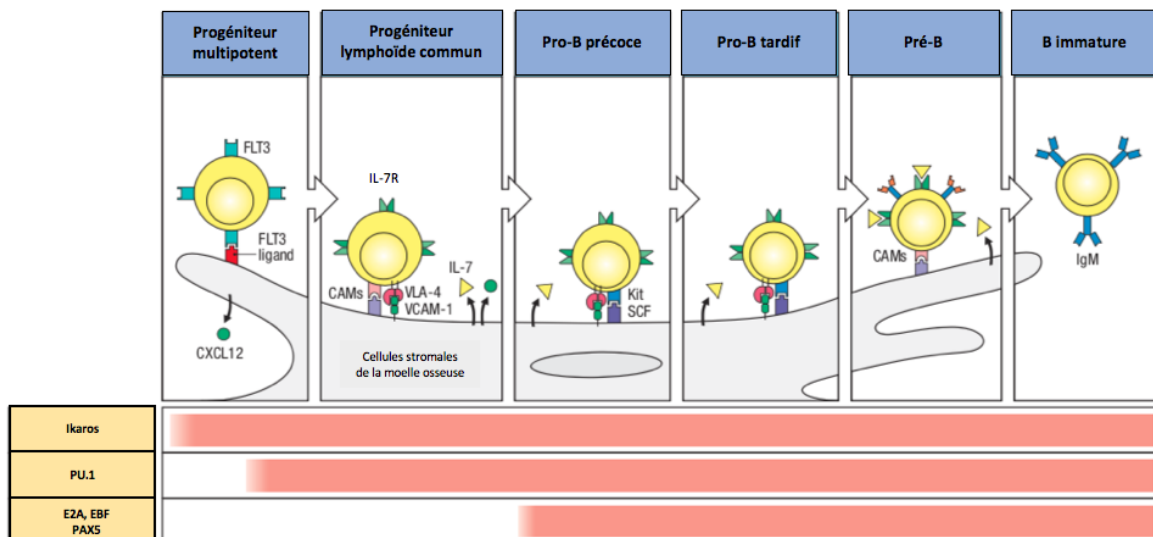


Figure 1: Différents stades de développement du LB et gènes clés responsables (adaptée de (Murphy and Weaver, 2017)).

Le développement du LB passe par différents stades qui contribuent à la formation du BCR. En effet, celui-ci est formé progressivement et son assemblage produit un LB immature porteur d'un BCR fonctionnel. Le progéniteur B passe par 4 étapes de développement majeures marquées par l'expression de nombreuses protéines (Figure 2) : le stade pro-B précoce, pro-B tardif, pré-B et le stade immature (Kurosaki et al., 2010).

- Stade Pro-B précoce

Une fois engagé dans la voie lymphoïde et orienté vers le LB, le CLP entre dans un premier stade de développement, le stade Pro-B-précoce qui marque le début de la formation du BCR et

l'augmentation des deux facteurs de transcription EBF et E2A ([Maeda et al., 2007](#)). La formation du BCR passe par un réarrangement d'exons Variable (V), de Diversité (D) et de Jonction (J) ([Fugmann et al., 2000](#); [Schatz, 2004](#)) et ces facteurs vont permettre l'expression de protéines responsables du réarrangement du locus des gènes D-J de la chaîne lourde (H).

- Stade Pro-B tardif

Le stade Pro-B tardif est marqué par l'expression du facteur de transcription PAX5 qui induit l'expression du corécepteur CD19 spécifique du LB. La protéine PAX5, associée à d'autres facteurs de transcription comme la protéine *Signal Transducer and Activator of Transcription 5* (STAT5), induit la mise en place de l'hétérodimère CD79 α /CD79 β , un composé indispensable à la signalisation du BCR ([Bertolino et al., 2005](#); [Fuxa et al., 2004](#)). Le réarrangement de gènes se poursuit par le réarrangement V-DJ codant la chaîne lourde μ de l'immunoglobuline de surface.

La protéine *B Cell Linker* (BLNK) participant à la signalisation du BCR induit le passage au stade pré-B.

- Stade Pré-B

Au stade pré-B est mis en place un pré-BCR ([Kudo and Melchers, 1987](#); [Tsubata and Reth, 1990](#)) permettant la sélection positive des pré-B fonctionnels. Ce Pré-BCR est formé par l'association de deux chaînes lourdes précédemment réarrangées et des pseudo-chaînes légères formées par un domaine $\lambda 5$ et d'un domaine VpreB. Les cellules vont commencer à exprimer un second marqueur spécifique des LB, le CD20.

La signalisation, du pré-BCR associé à l'hétérodimère CD79 α /CD79 β , par les protéines de la *Spleen Associated Tyrosine Kinase* (SYK) et le proto-oncogène LYN (LYN), est à l'origine d'une expansion clonale.

L'importance d'une autre protéine participant à la signalisation, la Tyrosine Kinase de Bruton (BTK), a également été démontrée puisqu'une mutation dans cette protéine entraîne un blocage du développement du LB avec une absence de transition vers le B immature ([Maas and Hendriks, 2001](#)).

- Stade B immature

Ce stade est marqué par le réarrangement des chaînes légères (L) (κ ou λ) remplaçant les pseudo-chaînes légères.

Ces cellules expriment à leur surface une IgM et l'hétérodimère CD79 α /CD79 β formant un BCR fonctionnel. Phénotypiquement, les LB immatures naïfs sont donc définis comme des cellules CD19⁺ CD20⁺ IgM⁺.

Ces cellules sont alors soumises à une seconde étape de sélection (sélection négative) afin d'éliminer les LB auto-réactifs et permettre la tolérance du soi. Cette sélection est réalisée au niveau de la moelle

osseuse avec l'aide des cellules stromales exprimant des peptides du soi. La reconnaissance de l'antigène du soi par le BCR, avec une forte affinité, entraîne des modifications de la chaîne légère qui déclenche un mécanisme d'apoptose afin d'éliminer le clone auto-réactif. Au contraire, si la reconnaissance a lieu avec une faible affinité, le mécanisme d'anergie se met en place et se traduit par une diminution de l'expression du récepteur de surface, une augmentation du signal de corécepteurs inhibiteurs et par conséquent une diminution de la capacité à transduire le signal.

Les LB matures et naïfs, porteurs d'IgM et d'IgD, quittent la moelle osseuse pour rejoindre la circulation et les organes lymphoïdes secondaires.

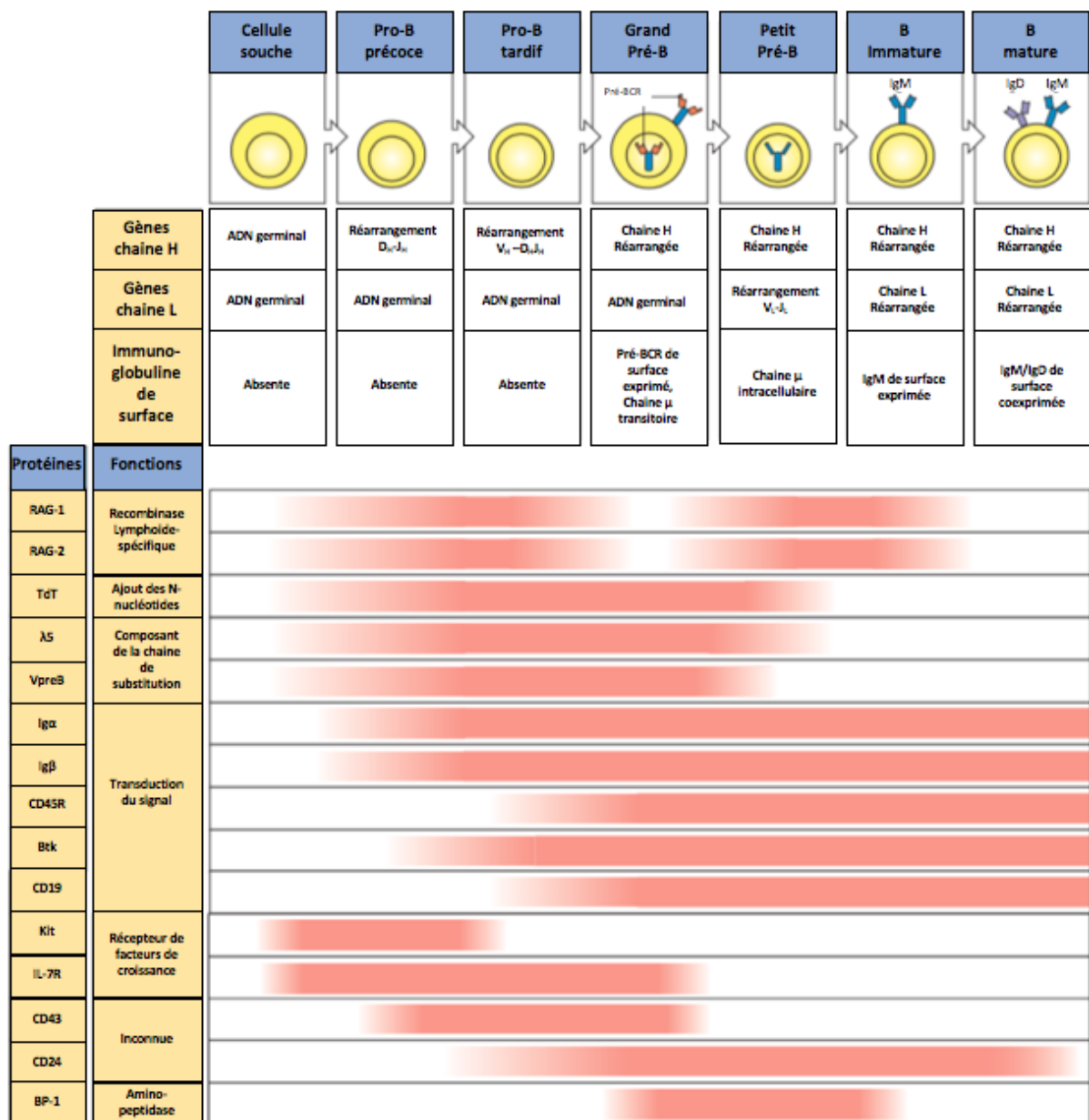


Figure 2 : Réarrangements des chaînes lourdes et légères et expressions protéiques au cours des stades de développement du LB (adaptée de (Murphy and Weaver, 2017)).

I.2. Activation du lymphocyte B

Les LB naïfs parcourent l'organisme et les organes lymphoïdes secondaires jusqu'à la rencontre avec leur antigène ([Okada and Cyster, 2006](#)).

Il existe deux types d'activation des LB en fonction de la nature de l'antigène reconnu : l'activation thymo-dépendante, qui fait intervenir des LT ([Parker, 1993](#)) et permet la reconnaissance d'antigènes de type protéique, et l'activation thymo-indépendante, ne nécessitant pas l'intervention des LT ([Mond et al., 1995](#)).

I.2.1. Activation Thymo-dépendante

L'activation thymo-dépendante s'effectue essentiellement au niveau de la zone T des organes lymphoïdes secondaires. L'implication du LT aboutit à la production d'anticorps de grande affinité dirigés contre des antigènes protéiques.

Le processus débute avec la reconnaissance de l'épitope antigénique par le BCR suivie d'une endocytose du complexe formé par le BCR et l'antigène. L'antigène protéique reconnu et internalisé est dégradé en peptide au niveau de l'endosome dans le but d'être présenté à la surface du LB via le CHM II ([Batista and Harwood, 2009](#)).

L'interaction avec un LT helper (LTh), lui-même préalablement activé par le même antigène/épitope permet de délivrer un second signal d'activation au LB. Cette interaction se fait grâce à la présence du complexe CMH II/peptide à la surface du LB qui sera reconnu par le récepteur à l'antigène des LT, le TCR. Le rapprochement entre le LB et le LT va également permettre l'interaction avec d'autres récepteurs apportant des signaux de co-stimulation. Parmi ces différents signaux, on retrouve notamment l'interaction entre le CD40, à la surface des LB et son ligand le CD40L, à la surface des LT. Cette interaction va entraîner l'activation de la voie non-canonique du *facteur nucléaire kappa B* (NF- κ B) et ainsi induire la survie cellulaire et la prolifération. Des cytokines sécrétées par le LT comme l'IL-4, l'IL-6 ou encore l'IL-21 entraînent l'activation de STAT3 permettant une amplification de la prolifération et une différenciation.

Différents corécepteurs permettent une régulation de cette signalisation et particulièrement les récepteurs CD19, CD21 et CD81.

Les LB activés migrent dans la zone B des organes lymphoïdes secondaires pour former des centres germinatifs, permettant aux LB d'effectuer leur maturation secondaire. Ces centres germinatifs sont constitués de 2 zones : une zone sombre et une zone claire ([Allen et al., 2007](#); [MacLennan, 1994](#)).

Dans la zone sombre, les LB (appelés centroblastes) prolifèrent et acquièrent des hypermutations somatiques dans les régions variables des gènes codant les immunoglobulines permettant d'améliorer l'affinité de ses immunoglobulines.

Dans la zone claire, les LB (appelés centrocytes) interagissent avec des cellules folliculaires dendritiques et des LTh permettant de sélectionner les LB avec un BCR de haute affinité et d'induire la commutation de classe. Les LB sortant des centres germinatifs se différencient en plasmocytes (sécrèteur d'anticorps) ou évoluent en LB mémoire (permettant une réponse rapide en cas de nouvelle reconnaissance du même antigène protéique).

I.2.2. Activation Thymo-indépendante

Contrairement à la reconnaissance d'antigènes protéiques thymo-dépendante, l'activation du LB après la reconnaissance d'antigènes saccharidiques comme le Lipopolysaccharide (LPS) (activateurs polyclonaux) ou la flagelline (molécules à motifs répétitifs) est thymo-indépendante.

Le second signal nécessaire à l'activation du LB est donné par l'antigène lui-même lors d'une activation thymo-indépendante par l'interaction avec le *Toll-Like Récepteur 4* (TLR4) pour le LPS, le TLR9 pour le CpG ou encore l'oligomérisation des immunoglobulines de surface par reconnaissance de motifs répétés (polysaccharides des parois bactériennes).

L'activation thymo-indépendante est sous-tendue par deux mécanismes différents ([Mond et al., 1995](#)):

- L'activation thymo-indépendante de type 1 : l'antigène est reconnu par un BCR polyspécifique.

Comme exemple, on peut citer le LPS ou l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) microbien qui activent un TLR présent à la surface des LB. Cette activation va générer des LB polyclonaux permettant une réponse rapide à divers agents pathogènes sans modification d'affinité du LB ni de différenciation en LB mémoire.

- L'activation thymo-indépendante de type 2 : induite lors de la reconnaissance de molécules possédant une répétition d'épitopes, comme par exemple le polysaccharide des parois bactériennes. Le LB de la zone marginale est activé suite à l'activation d'un grand nombre de ses BCR à sa surface. Une co-activation par les cellules dendritiques et la sécrétion de Facteur Activateur des LB (BAFF) procure un second signal d'activation.

Cette activation permet une réponse rapide face à aux infections bactériennes et les IgM produites activent le système du complément et favorisent la phagocytose afin d'éliminer les bactéries pathogènes.

I.2.3. Récepteur à l'antigène du lymphocyte B (BCR)

Le BCR est une immunoglobuline de surface qui permet la reconnaissance des différents antigènes. Une grande diversité de répertoire antigénique permet la reconnaissance de plusieurs millions d'épitopes différents.

I.2.3.1. Mise en place de la diversité primaire des immunoglobulines de surface

Le BCR est constitué d'un complexe comprenant une immunoglobuline formée de 2 chaînes lourdes (IgH) et 2 chaînes légères (IgL) identiques ainsi que d'un hétérodimère CD79 α /CD79 β permettant la transmission du signal ([Kurosaki et al., 2010](#); [Pleiman et al., 1994](#)) (Figure 3).

Chaque chaîne lourde et légère est constituée de 2 régions distinctes : une région constante et une région variable. Des ponts disulfures permettent l'assemblage des 2 chaînes lourdes entre-elles ainsi que l'assemblage des chaînes légères aux chaînes lourdes.

La région constante, également appelée le Fragment Cristallisable (Fc) constitue la région effectrice de l'immunoglobuline.

La région variable, spécifique à chaque LB, permet la reconnaissance d'un grand nombre d'antigènes.

L'immunoglobuline qui forme le BCR est ancrée à la membrane grâce à un domaine transmembranaire de la chaîne lourde.

Chez l'Homme, les gènes codant pour les chaînes lourdes sont situés sur le chromosome 14 et les gènes codant pour les chaînes légères (deux loci) sont eux situés sur le chromosome 22 pour les gènes de la chaîne λ , et au niveau du chromosome 2 pour les gènes de la chaîne κ .

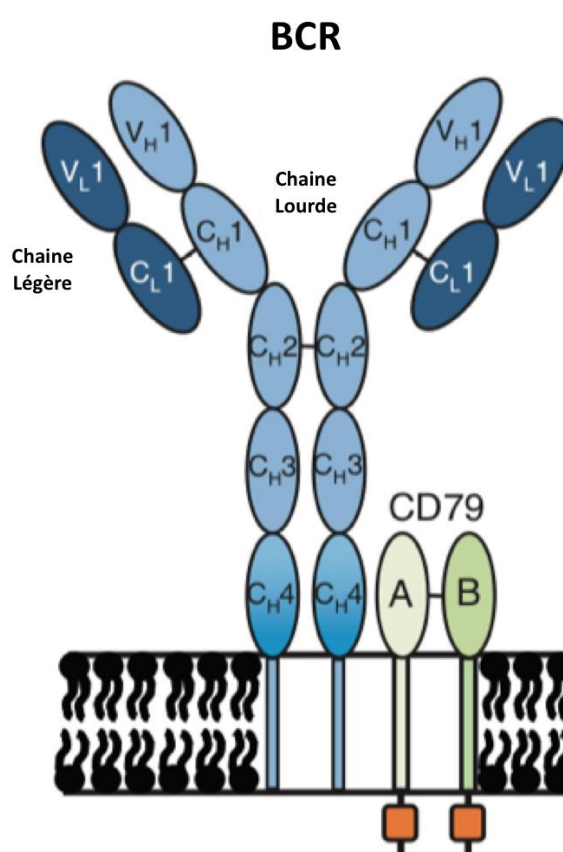


Figure 3 : Structure du BCR (adaptée de [Berry et al., 2011](#)).

Le réarrangement aléatoire de gènes codant pour différents segments protéiques : exon V, exon D et exon J crée une diversité combinatoire générant la région variable des chaînes lourdes d'immunoglobuline ([Schatz, 2004](#)).

Le réarrangement de gènes codant pour les segments VJ permet de créer la diversité combinatoire des gènes codant les régions variables des chaînes légères d'immunoglobuline.

La combinaison des régions variables des chaînes lourdes avec les régions variables des chaînes légères, situées à l'extrémité N-terminale des immunoglobulines, forme le site de reconnaissance et de fixation de l'antigène. Cette variabilité participe à la diversité de reconnaissance et est accentuée par la présence de régions hypervariables à la fois au niveau des chaînes lourdes et au niveau des chaînes légères. La comparaison des séquences de la région Variable de différentes immunoglobulines montre la présence de trois séquences hypervariables (HVR) (ou *Complementary determining regions* (CDR 1, 2, et 3)). Les CDR forment des structures en boucle. Entre ces régions, on trouve les régions de structure conservée ou régions *Framework* (FR) qui vont déterminer la structure spatiale du domaine variable.

La mise en place du BCR se déroule tout au long de la maturation du LB dans la moelle osseuse. La formation du BCR passe par 2 grandes étapes : 1/ la formation des chaînes lourdes de l'immunoglobuline et 2/ la formation des chaînes légères. La formation de ces chaînes passe par l'assemblage de segments/exons qui se produit par recombinaison somatique (recombinaison VDJ) (figure 4). Celle-ci est guidée par des séquences d'ADN non codantes et conservées nommées « Séquences Signal de Recombinaison » (RSS) ([Fugmann et al., 2000](#)).

La formation de la chaîne lourde se déroule lors du stade pro-B. La région variable de cette chaîne lourde se forme par rapprochement d'un segment D_H avec un segment J_H . Ensuite, il y a une association du segment DJ avec un segment V_H . Ce segment assemblé donne, à la suite d'un épissage de son ARN messager suivi de sa traduction, la chaîne lourde qui compose l'IgM ou l'IgD.

La chaîne légère, quant à elle, est mise en place plus tardivement au stade pré-B avec des mécanismes similaires, à l'exception de l'absence d'un exon D (présence uniquement des segments V_L et J_L).

Le rapprochement des différents segments, grâce aux séquences RSS présentes en 5' ou 3' de chaque exon, va permettre d'associer les différents segments VDJ pour la chaîne lourde et VJ pour la chaîne légère.

Les différents réarrangements géniques permettent de générer la diversité combinatoire ([Hozumi and Tonegawa, 1976](#)). Cette diversité est totalement aléatoire. En effet, les chaînes variables sont constituées par l'assemblage de différents segments (segment V, (D) et J). Or le grand nombre de segments V, D et J présents permet de multiplier les combinaisons possibles.

Deux enzymes (RAG1 et RAG2) jouent un rôle important dans ce processus. Ces enzymes reconnaissent les séquences RSS et permettent leur rapprochement ([Oettinger et al., 1990](#)), puis leur clivage grâce à leur activité endonucléase. Cela entraîne la formation d'une épingle à cheveux. Par la suite, l'action de la protéine ARTEMIS associée à la TdT entraîne l'insertion de nucléotides (région N-nucléotides) permettant ensuite la liaison de chaque extrémité *via* l'ADN ligase. Cette action de la TdT, amplifie la diversité des immunoglobulines en créant la diversité jonctionnelle. Cette protéine va entraîner l'ajout de nucléotides de façon aléatoire entre les exons, ce qui va former des jonctions entre les segments V(D)J imprécises ([Weigert et al., 1980](#)).

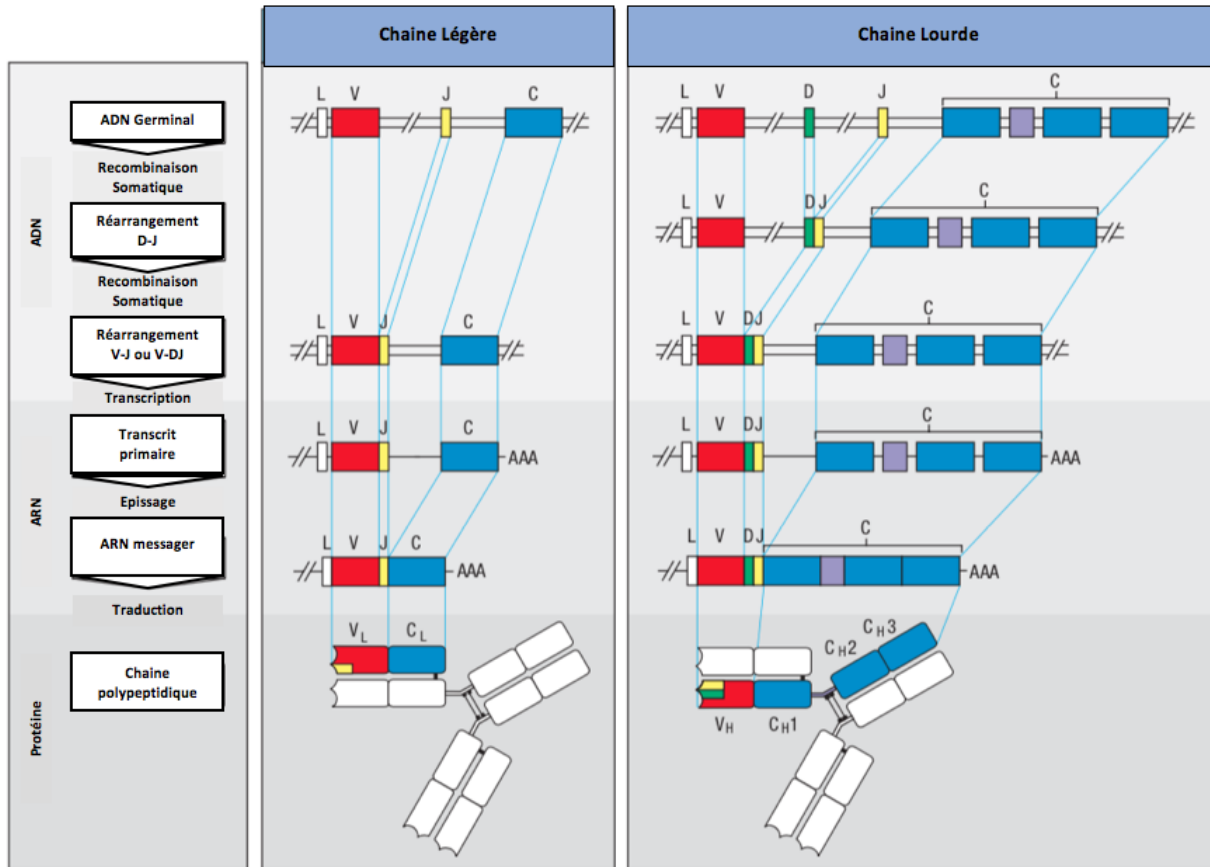


Figure 4 : Étapes de réarrangement des exons V(D)J des gènes codant pour les chaînes lourdes ou légères de l'Immunoglobuline (adaptée de (Murphy and Weaver, 2017)).

1.2.3.2. Mise en place d'une diversité secondaire à la suite de la rencontre avec l'antigène

Le LB naïf mature quitte la moelle osseuse et circule dans l'organisme et notamment dans les organes lymphoïdes secondaires. La rencontre avec un antigène va entraîner l'activation du LB et une diversité secondaire des immunoglobulines qui s'ajoute à la diversité combinatoire et jonctionnelle. En effet, à la suite de la rencontre avec un antigène spécifique, deux mécanismes vont se dérouler : l'hypermutation somatique et de la commutation de classe, permettant une maturation secondaire d'affinité (Li et al., 2004).

Ces mécanismes se déroulent dans les organes lymphoïdes secondaires et plus précisément dans les centres germinatifs formés de deux zones en fonction de leur apparence histologique : une zone sombre et une zone claire (Allen et al., 2007; MacLennan, 1994) (Figure 5).

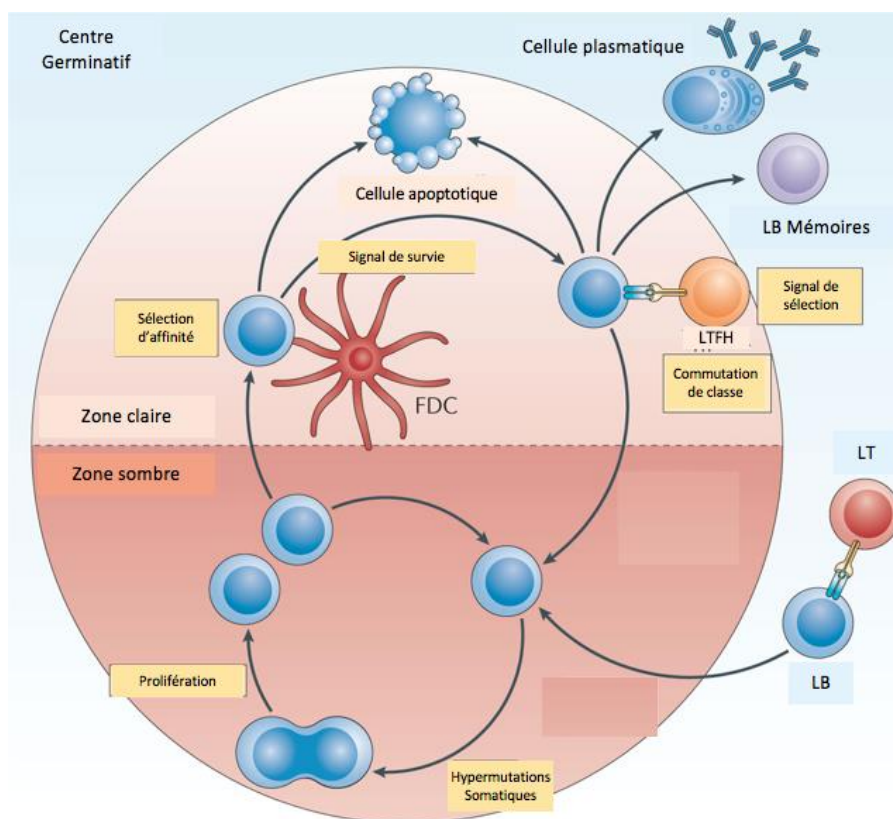


Figure 5 : Représentation simplifiée d'un centre germinatif (adaptée de ([Heesters et al., 2014](#))).

Les hypermutations somatiques permettent d'améliorer l'affinité de l'immunoglobuline à l'antigène en apportant des modifications au niveau de leur région variable. Cette maturation d'affinité survient plus précisément dans la zone sombre des centres germinatifs. Les hypermutations somatiques résultent de l'insertion ou de la délétion d'acides aminés (mutations ponctuelles) au niveau des régions variables des immunoglobulines et plus particulièrement au niveau des exons VDJ et des régions CDR ([Hozumi and Tonegawa, 1976](#)).

L'interaction entre le CD40 et le CD40L des LT CD4 ou LTFH va induire l'expression de l'enzyme Cytidine désaminase Induite par l'Activation (AID). Cette enzyme, exprimée spécifiquement dans les LB, au niveau des centres germinatifs, est un acteur essentiel dans le déroulement de l'hypermutation somatique ([Muramatsu et al., 2000](#)). AID induit des mutations par déamination des cytidines de l'ADN et l'apparition d'une uracile provoquant un mésappariement. Celui-ci sera réparé par un des deux mécanismes de réparation qui sont la réparation par excision de base ou la réparation par mésappariement ([Odegard and Schatz, 2006](#)).

Ces mutations, qui se déroulent au hasard, peuvent avoir deux conséquences :

- Soit elles sont délétères et induisent une perte de capacité de reconnaissance de l'antigène. Cette diminution d'affinité pour l'antigène entraîne une sélection négative et une mort cellulaire par apoptose dans la zone claire du centre germinatif.
- Soit elles sont positives et augmentent l'affinité pour l'antigène. Dans ce cas, un signal de survie sera donné au LB puisqu'il y a une amélioration de la spécificité du LB.

La commutation de classe ou commutation isotypique permet une diversité fonctionnelle des immunoglobulines. Celle-ci permet la synthèse de nouveaux isotypes d'immunoglobulines (IgG, IgA et IgE), en fonction du pathogène et de sa localisation.

La commutation isotypique repose sur le remplacement des gènes codant la région constante C μ par un autre locus se situant en aval : C γ pour IgG, C α pour IgA et C ϵ pour IgE.

L'enzyme AID possède un rôle important dans ce mécanisme d'épissage. Une mutation du gène codant AID (souris déficientes) induit une prédominance IgM (hyper-IgM) et une absence d'IgG ([Muramatsu et al., 2000](#)).

Le réarrangement et la recombinaison d'ADN non-homologue sont guidés par le rapprochement de segments répétitifs, les exons Switch (S). Ces régions sont situées sur des introns en amont de chaque exon C des différents isotypes ([Chaudhuri and Alt, 2004](#); [Manis et al., 2002](#)).

Ce mécanisme de commutation se déroule dans la zone claire du centre germinatif. Les cytokines sécrétées par les LTh vont être déterminantes dans la formation préférentielle d'un isotype particulier. Ce mécanisme n'est donc pas aléatoire. Les cytokines présentes vont orienter le processus en activant différents promoteurs et favoriser ainsi la formation d'un isotype par rapport à un autre. Par exemple, l'IL-4 va permettre l'activation de STAT6 entraînant le recrutement du promoteur I γ 1 en amont du segment S γ 1 et ainsi favoriser la production d'IgG1 tout en levant l'inhibition du promoteur I ϵ en amont du segment S ϵ pour également permettre la production d'IgE ([Xu et al., 2012](#)).

Cytokines	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE	IgGA
IL-4	Induction		Inhibition	Induction	Induction	
IL-5						Induction
IFN- γ	Inhibition		Induction		Inhibition	
TGF- β			Inhibition			Induction
IL-10	Induction		Induction			
IL-21	Induction		Induction			

Tableau 1 : Rôle des cytokines dans la régulation de l'expression des différents isotypes d'immunoglobuline chez l'homme (adapté de ([Avery et al., 2008a](#); [Male et al., 2006](#))).

1.2.3.3. Signalisation induite par l'activation du BCR

Une fois l'antigène spécifique reconnu, on assiste à une mise en place d'une cascade de signalisation avec une activation de différentes voies en aval du BCR (Figure 6). En règle générale, l'activation d'un récepteur est permise grâce à une ou des enzymes appelée(s) protéines kinases. Ces protéines kinases vont être essentielles dans le mécanisme de la phosphorylation. La liaison du récepteur avec son antigène va activer la protéine kinase associée, entraînant l'activation d'autres protéines et ainsi une propagation du signal. La signalisation obtenue dépend essentiellement de l'affinité du récepteur pour l'antigène.

Le récepteur BCR doit s'associer à des tyrosines kinases intracellulaires pour permettre la propagation du signal car il ne possède pas d'activité enzymatique propre. Les interactions entre les différents acteurs sont essentiellement permises par la présence de domaines d'interactions sur chaque acteur et notamment la présence de domaine *Src homology 2* (SH2). Ces domaines vont spécifiquement reconnaître les tyrosines phosphorylées et ainsi permettre la propagation du signal ([Lim and Pawson, 2010](#)).

A la surface du LB, l'immunoglobuline est associée à deux molécules de signalisation CD79 α (Ig α) et CD79 β (Ig β) qui permettent à l'immunoglobuline d'être transportée à la surface et qui ont également un rôle dans l'activation du signal du BCR ([Kurosaki et al., 2010](#); [Pleiman et al., 1994](#)). Cet hétérodimère a la particularité de contenir des Motifs d'Activation des récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine (ITAM) ([Cambier et al., 1994](#); [Kurosaki, 2000](#); [Weiss and Littman, 1994](#)). Ces motifs ITAM contiennent des résidus tyrosines qui sont phosphorylés et reconnus par un site SH2 permettant le recrutement d'autres protéines de la cascade.

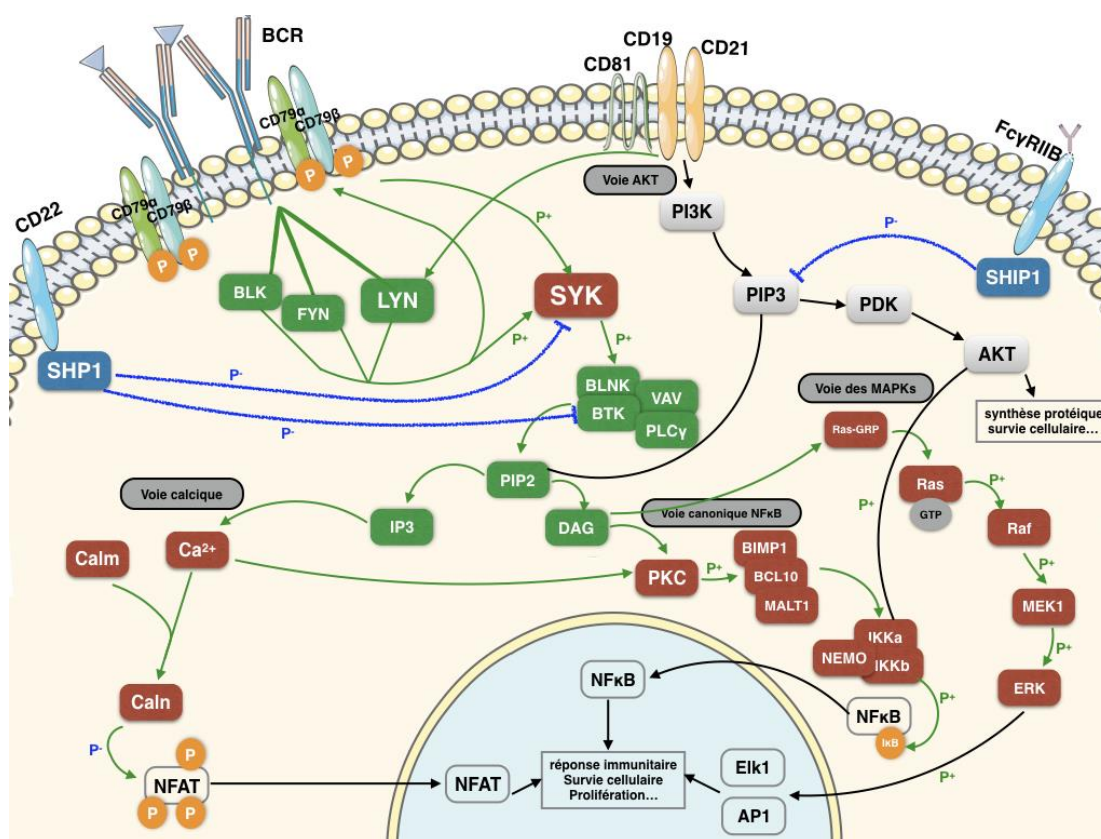


Figure 6 : Voies de signalisation activées suite à une stimulation du BCR et sa régulation (Adaptée de ([Kanehisa et al., 2017](#); [Murphy and Weaver, 2017](#))).

Au niveau cytoplasmique, trois kinases de la famille *SRC* : *BLK Proto-Oncogene* (BLK) ; *FYN Proto-Oncogene* (FYN) et LYN, sont associées au BCR à l'état basal. Lors de la reconnaissance d'un antigène, l'activation et l'oligomérisation des BCR activent ces différentes kinases. Elles sont ensuite responsables de la phosphorylation des motifs ITAM de l'hétérodimère CD79 α /CD79 β ([Kurosaki et al., 2010](#); [Pleiman et al., 1994](#)).

La phosphorylation des motifs ITAM permet le recrutement d'une tyrosine kinase essentielle, la molécule *Spleen Associated Tyrosine Kinase* (SYK) qui contient deux domaines SH2. Cette interaction est suffisante pour activer SYK, entraînant ainsi l'activation d'un autre complexe formé par *B Cell Linker* (BLNK), *Bruton's Tyrosine Kinase* (BTK) et *Phospholipase C Gamma* (PLC γ) ([Fu et al., 1998](#); [Kurosaki et al., 2010](#); [Pappu et al., 1999](#)). Ce complexe est formé grâce au recrutement de BLNK, qui est une protéine chaperonne.

Par des mécanismes toujours liés à la phosphorylation et aux domaines SH2, la protéine BTK est activée spécifiquement dans les lymphocytes B. Celle-ci a un effet activateur sur la protéine PLC γ qui hydrolyse le Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2), permettant la formation du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol-triphosphate (IP3) ([Yang et al., 2012](#)).

A la surface du LB se situe un complexe de protéines formé par le CD19, le CD21 et le CD81 ([Tedder et al., 1997](#)) qui va renforcer et amplifier la signalisation du BCR. Dans un premier temps, ce corécepteur (notamment le CD19) intervient sur la kinase LYN en levant son auto-inhibition ([Fujimoto et al., 2000](#)). Cette voie participe également au recrutement de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui agit sur le PIP3 pour former du PIP2 ([Aiba et al., 2008](#)). Le recrutement de PI3K permet également l'activation de la voie AKT/mTOR, connue pour son implication dans la survie cellulaire, la synthèse protéique mais également dans la régulation du cycle cellulaire ([Hay and Sonenberg, 2004](#); [Song et al., 2005](#)).

Après activation du BCR et l'hydrolyse du PIP2, deux composés, le DAG et l'IP3, sont formés et trois voies principales de signalisation sont activées :

- La **voie du calcium** aboutissant à la mobilisation du facteur de transcription *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) ([Hogan et al., 2003](#)). La stimulation du BCR induit une forte augmentation de la concentration de calcium (Ca^{2+}) cellulaire provenant soit des réserves du réticulum endoplasmique soit du milieu extracellulaire. La calmoduline (Calm) va alors capter le Ca^{2+} présent dans le cytosol et aura pour cible la calcineurine (Caln). La Caln, qui est une phosphatase, entraîne la déphosphorylation de NFAT et permet au facteur de transcription de migrer dans le noyau ([Crabtree and Olson, 2002](#)).
- La **voie nuclear factor-kappa B (NF- κ B)**. La Protéine Kinase C (PKC) mobilise le facteur de transcription NF- κ B. Ce facteur est un complexe formé de différentes sous-unités retenues au niveau cytoplasmique par liaison avec l'inhibiteur I κ B. Dans la signalisation du BCR, son activation suit la voie canonique qui comprend l'activation du complexe IKK constitué des protéines IKK α , IKK β et NEMO qui va à son tour phosphoryler I κ B. La phosphorylation de ce dernier induit sa propre dégradation ([Hacker and Karin, 2006](#)). Le facteur NF- κ B est alors libre de « translocer » vers le noyau où il va exercer son rôle d'activateur transcriptionnel ([Sommer et al., 2005](#)).
- La **voie Ras/Mitogen Activated Protein Kinase (Ras/MAPK)**. Cette voie de signalisation passant par la PLC γ et le DAG permet d'activer le proto-oncogène RAS grâce à sa liaison au Guanosine Tri-Phosphate (GTP) qui entraîne la phosphorylation de sa cible, la kinase RAF qui à son tour permet la phosphorylation de MEK1 (MAP2K) pour aboutir à la phosphorylation du facteur de transcription ERK. Ce dernier va ensuite se localiser dans le noyau ([Imamura et al., 2009](#)). Ce facteur de transcription cible le complexe *Activated-Protein 1* (AP1), composé des facteurs de transcription FOS et JUN, ou d'autres comme ELK1 ([Dong et al., 2002](#)).

Parallèlement, la présence de régulateurs négatifs est très importante pour réguler cette réponse immunitaire. Ces récepteurs inhibiteurs sont des protéines transmembranaires qui possèdent des Motifs d'Inhibition des récepteurs Immuns basés sur la Tyrosine (ITIM) ([Vivier and Daeron,](#)

1997) comme BTLA, CD22, CD5 et FC γ RIIB ([Berland and Wortis, 2002](#); [Liu et al., 2010](#); [Pritchard and Smith, 2003](#)). Ces motifs présents au niveau de la partie cytoplasmique de récepteurs permettent, lorsqu'ils sont phosphorylés, le recrutement (grâce au domaine SH2 comme pour les ITAM) de phosphatases inhibitrices (SHP-1, SHIP-1 et PTPN22) ([Nitschke and Tsubata, 2004](#); [Walker and Smith, 2008](#)).

Lors d'une reconnaissance d'antigène thymo-dépendant, il existe un second signal qui est produit par l'interaction entre le LT et le LB. Ce second signal peut résulter de l'interaction CD28/CD80 mais surtout de l'interaction avec un récepteur de la famille des TNF, le CD40 situé à la surface du LB et de son ligand le CD40L situé à la surface du LT. La stimulation de ce récepteur en association avec l'activation du BCR entraîne une amplification de la signalisation en aval du BCR grâce à l'activation de tyrosines kinases comme BLNK/BTK ([Ying et al., 2011](#)). Une activation préférentielle de la voie des MAPK conduit au facteur de transcription ERK. La signalisation du récepteur CD40 passe par des molécules adaptatrices appelées Facteurs associés au Récepteur du TNF (TRAF). Ces molécules vont permettre d'activer des voies communes avec le BCR comme la voie PI3K/AKT ; la voie canonique de NF- κ B via la protéine *Transforming growth factor beta-activated kinase 1* (TAK1) qui agit directement sur le complexe IKK ([Elgueta et al., 2009](#); [Rickert et al., 2011](#); [Senhaji et al., 2015](#)). L'activation de la voie non canonique de NF- κ B via la protéine *Nuclear Factor κ B-inducing Kinase* (NIK) est également décrite ([Homig-Holzel et al., 2008](#)) (Figure 7).

Cette interaction va également entraîner une production d'interleukines (IL) par le LT et ainsi amplifier l'activation et participer par conséquent au cycle cellulaire, à la prolifération et à la différenciation du LB.

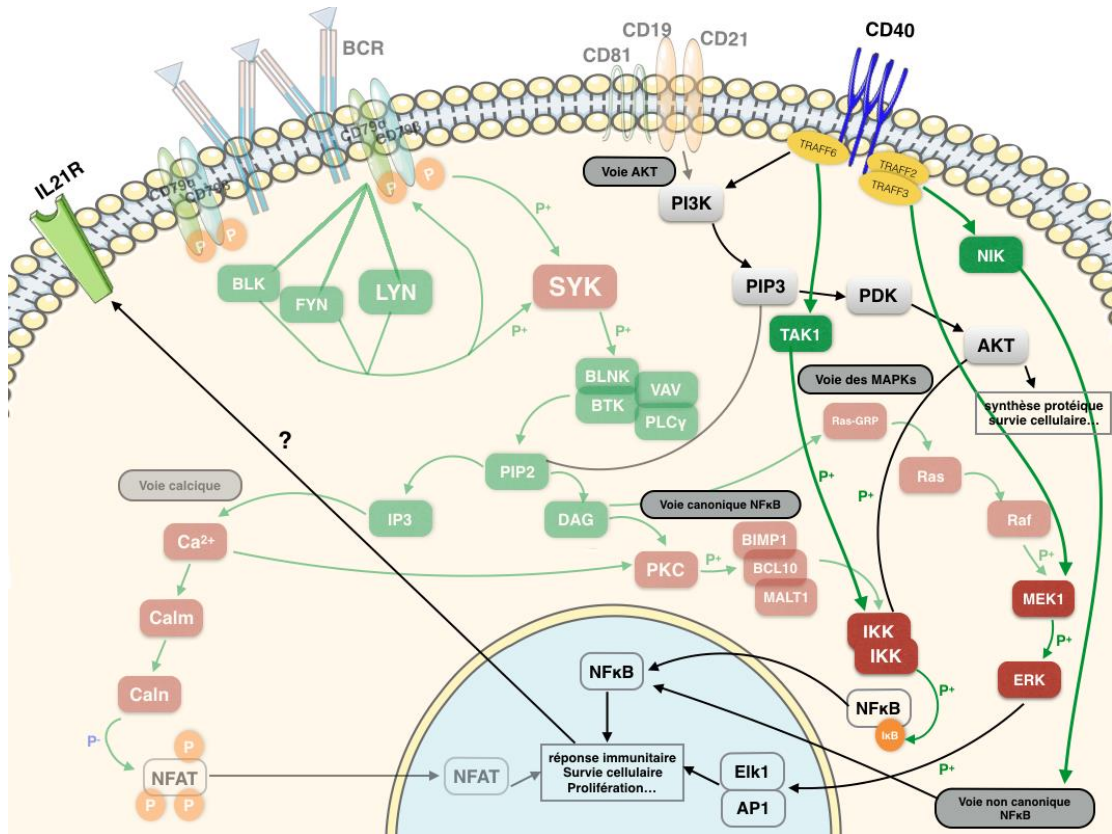


Figure 7 : Voies de signalisation activées communes avec le BCR suite à une stimulation du CD40 dans le LB.

1.2.3.4. Réponse à l'activation du BCR

Les derniers évènements de la signalisation du BCR sont des facteurs de transcription comme NFAT, NF- κ B et le complexe AP1. Une fois ces facteurs activés, ils vont subir une translocation nucléaire nécessaire à la transcription de nombreux gènes permettant une réponse adéquate à la stimulation initiale. La réponse obtenue et la signalisation engendrée varient selon qu'il s'agit d'une stimulation rapide et transitoire ou longue et persistante du BCR (Damdinsuren et al., 2010).

Après une translocation dans le noyau, le facteur NF- κ B va interagir avec des séquences cibles sur l'ADN de 9/10 paires de bases appelées sites κ B. La diversité des sites d'interactions fait de ce facteur un régulateur transcriptionnel de centaines de gènes et des médiateurs centraux dans le bon déroulement de la réponse immunitaire (Chen and Ghosh, 1999; Hayden and Ghosh, 2012; Pahl, 1999; Perkins, 2012). Les gènes cibles du facteur NF- κ B sont très variés et participent à la production de cytokines/chimiokines ou d'immuno-récepteurs comme le CD40 (Hinz et al., 2001) mais interviennent aussi dans la survie cellulaire en favorisant l'expression de gènes anti-apoptotiques comme le gène de la protéine du Lymphome à cellules B-2 (*Bcl-2*) (Catz and Johnson, 2001) et *Bcl-X_L*, dans la

différenciation et la prolifération secondaire à l'induction de proto-oncogènes comme *MYC* ([Duyao et al., 1990](#)), *TP53* ([Schumm et al., 2006](#)) et dans la régulation du cycle cellulaire par diverses cyclines ([Ledoux and Perkins, 2014](#)).

L'activation du facteur de transcription NFAT, par la voie calcique, est possible suite à sa déphosphorylation permettant sa translocation nucléaire. Ce facteur induit directement l'expression de cytokines comme le TNF α et régule des gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose et l'angiogénèse. Des études utilisant des souris n'exprimant pas la protéine NFAT ont montré l'importance de ce facteur dans la régulation du cycle cellulaire, et ce à différentes étapes du cycle avec son action sur diverses cyclines, ainsi que dans la régulation de l'apoptose ([Mognol et al., 2016](#)).

Il a été décrit une forte coopération avec un autre facteur de transcription activé par la signalisation du BCR, le complexe AP1 formé par les facteurs Fos et Jun ([Rao et al., 1997](#)). Ce complexe AP1 régule des gènes participant à de nombreux processus comme la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose avec à la fois une action sur des gènes pro et anti-apoptotiques ([Ameyar et al., 2003](#); [Shaulian and Karin, 2002](#))

I.3. Modèles d'étude de la prolifération du lymphocyte B physiologique *ex vivo*

La reconnaissance de l'antigène par le BCR entraîne son activation puis la transduction de signaux aboutissant à différentes réponses de survie cellulaire, de prolifération et de différenciation.

De nombreuses études ont établi que sans stimulation, les LB en culture *ex vivo* ne prolifèrent pas et ne se différencient pas ([Blanchard et al., 1997](#)) mais entrent dans le processus d'apoptose, responsable d'une mortalité cellulaire pouvant atteindre 40 à 50% après 3 à 4 jours de culture ([Parker, 1993](#)). Cela suggère qu'un contact et/ou une stimulation de la cellule semble essentiel à la survie du LB.

Les LB naïfs entrent en apoptose plus tardivement avec moins de 10% de mortalité après 24h contre 40% pour les LB mémoires ([Wagner et al., 2000](#)).

Cependant, il a été démontré que même en l'absence de rencontre avec l'antigène, le BCR peut transmettre un signal tonique qui améliore la survie cellulaire ([Monroe, 2006](#)). Chez la souris, des auteurs ont montré que la délétion du BCR menait de façon certaine à une mortalité cellulaire ([Lam et al., 1997](#)). Ce signal tonique est transmis grâce à l'hétérodimère CD79 α /CD79 β ([Kraus et al., 2004](#)) et la voie PI3K/AKT semble indispensable ([Srinivasan et al., 2009](#)).

Un grand nombre de modèles ont été proposés pour permettre d'assurer la survie cellulaire ou l'activation *ex vivo* du LB. En fonction du modèle de stimulation utilisé, l'activation des LB permet fréquemment d'améliorer la survie cellulaire ou d'induire une prolifération cellulaire ou une différenciation.

I.3.1. Activation *ex vivo* du récepteur à l'antigène

L'intensité de l'activation du BCR détermine l'engagement de la cellule vers une prolifération, une anergie ou une apoptose ([Casola et al., 2004](#)).

L'activation du BCR *ex vivo* peut être effectuée à l'aide d'anticorps solubles ou immobilisés.

L'anticorps anti-IgM (F(ab')₂) soluble est utilisé couramment dans la littérature pour la stimulation *ex vivo* des LB. Une concentration de 10 μ g/ml n'entraîne aucune prolifération des LB sains après 3 jours de culture ([Blanchard et al., 1997](#); [McKenzie et al., 1993](#)) ni un début d'activité de la télomérase, reflet du processus de prolifération ([Igarashi and Sakaguchi, 1997](#)).

Dans des modèles murins, la stimulation à l'aide d'anti-IgM seul entraîne l'apoptose confirmant les résultats observés chez l'homme ([Yoshida et al., 2000](#)).

L'utilisation d'anticorps anti-IgM immobilisé avec l'aide de billes de saccharose accentuerait l'effet de l'engagement du BCR en favorisant l'oligomérisation des récepteurs de surface, mais les résultats sur la prolifération sont contradictoires. Deux équipes n'ont pas mis en évidence de prolifération cellulaire, à l'aide de cette stimulation, après 3 jours de mise en culture ([Armitage et al., 1995](#); [Wagner et al., 2000](#)). Cependant, malgré l'absence de prolifération, une autre équipe a observé une légère agrégation de cellules B sous forme de grappes (formation de clusters) pouvant suggérer une division cellulaire ([Bjorck et al., 1992](#)).

Enfin, une seule équipe a démontré l'induction d'une prolifération cellulaire, par l'utilisation de thymidine tritiée, avec des concentrations comparables d'anti-IgM immobilisé, accompagnée de la présence d'une forte activité télomérase ([Igarashi and Sakaguchi, 1997](#)).

I.3.2. Activation *ex vivo* par l'utilisation de signaux de co-stimulation

Différents modèles induisent une collaboration lymphocytaire B et T helper folliculaire (TFH) à l'aide de cytokines d'origine T.

I.3.2.1. Activation par des cytokines produites par les LT

Une des interactions connue et essentielle dans l'activation du LB physiologique *in vivo* est l'interaction avec le récepteur CD40. Le CD40 est un récepteur de la famille du TNF, présent à la surface du LB et interagissant avec son ligand, le CD40L (CD154), exprimé à la surface des LT activés. La liaison CD40-CD40L est une co-stimulation permettant l'activation du LB ([Grewal and Flavell, 1998](#)).

L'activation de ce récepteur active les voies NF- κ B et ERK ayant un rôle dans la survie, la prolifération et la différenciation du LB ([Graham et al., 2010](#)).

Les données décrivant l'action du CD40L soluble sur le LB sain *ex vivo* présentées dans la littérature sont contradictoires. Certaines études montrent l'absence de prolifération, malgré l'utilisation d'une gamme de concentration allant jusqu'à 250 μ g/ml ([Berglund et al., 2013](#); [Jeppson et al., 1998](#); [Recher et al., 2011](#)), tandis que d'autres équipes ont réussi à mettre en évidence une induction modérée de la prolifération après 5 jours de culture ([Gutzeit et al., 2014](#); [Punnonen et al., 1997](#)). De plus cette prolifération concernerait essentiellement les LB mémoires ([Good et al., 2006](#); [Tangye et al., 2003](#)).

La collaboration du LB avec le LTh ne passe pas uniquement par cette interaction CD40/CD40L et permet également la sécrétion de différentes cytokines qui vont interagir avec le LB.

Parmi ces cytokines produites, l'interleukine-4 (IL-4), qui se fixe sur le récepteur IL-4R, induit l'activation de la voie Jak/STAT6 ([Aguilar-Hernandez et al., 2016](#); [Paludan, 1998](#)).

Les modèles de stimulation utilisant l'IL-4 isolément pour activer des LB sains confirment l'absence d'induction de prolifération ([Bjorck et al., 1992](#); [Jeppson et al., 1998](#); [Rakhmanov et al., 2014](#)), ou d'entrée dans le cycle cellulaire ([Blanchard et al., 1997](#)) et cela quelle que soit la concentration testée. Néanmoins, cette interleukine permet d'améliorer la survie cellulaire des LB et notamment des LB naïfs qui présentent un plus grand nombre de récepteurs à l'IL-4 ([Wagner et al., 2000](#)).

L'IL-10 est une autre interleukine produite par les LTh qui a également été testée dans des modèles de stimulation *ex vivo* de LB physiologique. L'IL-10, reconnue par son récepteur IL-10R, est une interleukine qui contribue à la régulation et à la différenciation de nombreuses cellules hématopoïétiques ([Moore et al., 2001](#)). Il a été montré que l'utilisation isolée de l'IL-10 induit une diminution d'apoptose uniquement chez les B mémoires, mais que cet avantage de survie disparaît rapidement après 3 jours de culture ([Wagner et al., 2000](#)).

D'autres interleukines n'entraînent aucune prolifération des LB sains lors de leur utilisation de façon isolée. Cela a été démontré pour l'IL-2 ([Armitage et al., 1995](#); [Emmrich et al., 1985](#)) ; l'IL-15 ([Armitage et al., 1995](#)) et l'IL-21 ([Gutzeit et al., 2014](#); [Rakhmanov et al., 2014](#)).

L'IL-21 est une interleukine pléiotrope qui agit sur de nombreuses cellules ([Spolski and Leonard, 2014](#)). L'activation de son récepteur va induire un signal activant la voie JAK/STAT1-3-5 dans le LB. Sur le LB, l'IL-21 participe à la fois à la prolifération (en association avec le CD40L), à l'apoptose (si utilisée seule ou associée à un ligand du TLR9) et à la différenciation ([Mehta et al., 2003](#); [Ozaki et al., 2004](#); [Parrish-Novak et al., 2000](#); [Spolski and Leonard, 2014](#))

Plusieurs modèles associent une utilisation simultanée du CD40L soluble avec des interleukines produites par le LTh.

Bien qu'une équipe ait démontré, sur des souris CD154^{-/-}, que la signalisation induite par le CD40 n'est pas indispensable à la prolifération cellulaire ([Graham et al., 2010](#)), de nombreuses études *ex vivo* montrent que l'activation du récepteur au CD40L associée à des interleukines (notamment l'IL-4) induit une prolifération dès le deuxième jour après la stimulation ([Jeppson et al., 1998](#)). Grâce à un marquage au *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE), une équipe a mis en évidence une prolifération atteignant 50% après 6 jours de culture ([Olsen et al., 2015](#)). Au-delà de son potentiel prolifératif sur les LB sains, ce modèle avait déjà permis de montrer une forte activation de la voie

NF- κ B, mais également une forte sécrétion d'IgE démontrant donc son rôle dans le déclenchement de la différenciation et la commutation de classe ([Jeppson et al., 1998](#)).

L'association du CD40L avec l'IL-2 ne permet qu'une prolifération modérée et bien plus faible par rapport au CD40L associé à l'IL-4 ([Punnonen et al., 1997](#)).

L'apport de l'IL-10 dans un modèle associant le CD40L permet d'augmenter la prolifération ([Punnonen et al., 1997](#); [Recher et al., 2011](#)). Cette cytokine permet d'obtenir une prolifération à la fois dans les LB mémoires avec 85% de cellules présentant une diminution du CFSE (CFSEdim) et dans les LB naïfs avec 65% de CFSEdim après 6 jours de culture ([Tangye et al., 2003](#)). L'équipe de Good a confirmé cette réponse des LB mémoires avec l'induction de 4 générations cellulaires après 6 jours ([Good et al., 2006](#)).

L'IL-21, en association avec le CD40L, induit une forte prolifération de LB sains avec en moyenne plus de 75% de cellules qui peuvent réaliser jusqu'à 7 divisions cellulaires ([Gutzeit et al., 2014](#); [Kamburova et al., 2012](#)). De plus, on retrouve une corrélation entre la réponse proliférative et la concentration d'IL-21 utilisée ([Berglund et al., 2013](#)) aussi bien sur les LB naïfs que mémoires. La réponse obtenue dans ce modèle de stimulation repose sur l'activation du LB par le CD40L qui augmente l'expression du récepteur à l'IL-21 à la fois sur les LB naïfs et sur les LB mémoires ([Good et al., 2006](#)). Cette division cellulaire est associée à une commutation isotypique avec une faible sécrétion d'IgE ([Avery et al., 2008b](#); [Recher et al., 2011](#)).

Enfin, des modèles combinant plusieurs cytokines associées à l'activation du CD40L ont été proposés. La combinaison CD40L + IL-10 + IL-2 montre un avantage prolifératif uniquement pour des B mémoires avec plus de 90% de prolifération après 5 jours ([Tangye et al., 2003](#)). L'ajout de l'IL-2 à la combinaison CD40L + IL-21 ([Berglund et al., 2013](#)) n'apporte aucune amélioration dans la prolifération cellulaire obtenue. Toutefois, la présence de l'IL-2 favorise la différenciation avec l'augmentation de la génération de plasmablastes.

Le modèle combinant CD40L + IL-4 + IL-21 permet d'obtenir une prolifération de la totalité de la population après 9 jours de stimulation ([Rakhmanov et al., 2014](#)). Cette stimulation serait accompagnée d'une commutation isotypique importante avec une forte corrélation entre le nombre de divisions cellulaires et la quantité d'IgE sécrétée ([Avery et al., 2008b](#)).

1.3.2.2. Activation par le récepteur à l'antigène associée aux cytokines T

L'association de l'activation du BCR et de la collaboration avec le LTh permet de reproduire *ex vivo* une double activation du LB.

L'activation du BCR, associée à une interaction entre CD40/CD40L, induit une légère prolifération, objectivée à l'aide de thymidine tritiée, après 3 jours de stimulation *ex vivo* ainsi qu'une forte activité télomérase ([Igarashi and Sakaguchi, 1997](#)) à la fois des LB naïfs et des LB mémoires ([Zhang et al., 2010](#)). Cependant, une autre équipe n'a pas réussi à reproduire ces résultats et a conclu à l'absence de prolifération avec ce modèle ([Wagner et al., 2000](#)).

L'activation du BCR, associée à l'utilisation d'IL-4, met en évidence l'induction d'une prolifération B *ex vivo* après 3 jours ([McKenzie et al., 1993](#); [O'Garra et al., 1988](#)) avec une proportion de cellules en phase S s'élevant à 45%. L'activation des LB sains à l'aide de ce cocktail permet l'induction de la cycline D3 ainsi qu'une augmentation de la cycline cdk6 qui toutes deux, participent à la prolifération et au cycle cellulaire ([Blanchard et al., 1997](#)). Les résultats obtenus sont identiques avec l'utilisation d'anti-IgM immobilisé où l'effet synergique de l'IL-4 permet une induction forte de la prolifération ([Bjorck et al., 1992](#); [Defrance et al., 1994](#); [Parrish-Novak et al., 2000](#)).

L'association de l'activation du BCR et de l'IL-13 entraîne une très faible prolifération bien en deçà de l'association avec l'IL-4 ([McKenzie et al., 1993](#)).

La plus forte prolifération comprenant une activation du BCR est obtenue par une stimulation l'associant à l'utilisation de CD40L et d'IL-4. Ce modèle entraîne dès le 2^{ème} jour de stimulation une forte prolifération *ex vivo* au cours de laquelle les cyclines D3/ckd6 jouent un rôle important ([Wagner et al., 1998](#)). La réponse est sensiblement identique entre les LB naïfs et les LB mémoires ([Wagner et al., 2000](#)). L'ajout de l'IL-21 à cette combinaison aurait un effet négatif sur la réponse proliférative puisqu'on observe une absence totale de prolifération ([Parrish-Novak et al., 2000](#)).

La combinaison anti-IgM, CD40L et IL-10 ne semble agir que sur les LB mémoires ([Wagner et al., 2000](#)).

Deux interleukines ont montré des capacités permettant de dépasser le stade de la prolifération se traduisant par une induction de la différenciation des LB en plasmocytes accompagnée d'une sécrétion d'immunoglobulines. Il s'agit de l'IL-15 ([Armitage et al., 1995](#)) et de l'IL-2 ([Le Gallou et al., 2012](#)).

1.3.2.3. Activation par le récepteur TLR9

Les TLR sont des récepteurs reconnaissant des motifs (ou « pattern » moléculaires). L'expression de nombreux récepteurs TLR à la surface des LB joue un rôle dans la régulation de l'immunité adaptative ([Iwasaki and Medzhitov, 2010](#)). L'ADN hypométhylé aux îlots Cytosine-phosphate-Guanine (CpG ADN), ligand du TLR9, agit sur le cycle cellulaire et donc sur la prolifération du LB ([Good et al., 2006](#); [Peng, 2005](#)).

L'activation de la voie TLR9-MYD88 ([O'Neill and Bowie, 2007](#)) entraîne une forte prolifération des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). La population en prolifération est essentiellement constituée des cellules CD19+ et permet d'observer 7 à 8 générations en 5 jours ([Gujer et al., 2011](#)). On retrouve à nouveau un avantage prolifératif pour les LB mémoires avec plus de 50% de prolifération (déterminée en CFSE) ainsi que 7 générations après 4 jours ([Good et al., 2009](#)).

Il a été démontré que l'expression du gène codant TLR9 est renforcée à la suite d'une activation du BCR ou du récepteur CD40 du LB ([Bourke et al., 2003](#)).

L'activation à la fois de la voie du BCR et de la voie du TLR9 associée à de l'IL-2 et de l'IL-10 entraîne une prolifération (98% CFSEdim) ([Frolich et al., 2012](#)) suivie d'une différenciation ([Le Gallou et al., 2012](#)).

On retrouve également l'apport important du CpG ADN qui, combiné à CD40L induit une prolifération trois fois supérieure par rapport à celle qui est obtenue par l'activation CD40L isolé ([Recher et al., 2011](#)).

1.3.3. Activation par utilisation de co-cultures

Les modèles de stimulation *ex vivo* de LB sains en co-culture avec d'autres cellules permettent de se rapprocher des conditions physiologiques d'activation en reproduisant les interactions retrouvées *in vivo*. Néanmoins, l'utilisation d'autres types cellulaires pour stimuler les LB comporte l'inconvénient important de la présence de nombreuses interactions continues et variées, ce qui ne permet pas de contrôler les voies de signalisation activées.

La co-culture de LB en présence de cellules de type fibroblastique utilise des fibroblastes murins (L cells) exprimant le CD32 à sa surface. Ces modèles mettent en présence ces fibroblastes transfectés et irradiés de souris exprimant FcγRII/CDw32 (Cellules CD32-L).

La première mise en évidence d'une prolifération *ex vivo* de LB repose sur l'utilisation de ce modèle. En 1991, l'équipe de Banchereau présente la première étude montrant l'induction d'une prolifération de cellules B après stimulation de LB humains *ex vivo* par les cellules CD32-L associée à

une activation du CD40 ([Banchereau et al., 1991](#)). A l'aide de thymidine tritiée, ils ont mis en évidence une prolifération à court terme lors de la stimulation du récepteur CD40 des LB. Avec des conditions similaires, McKenzie et son équipe ont confirmé l'apparition d'une légère prolifération ([McKenzie et al., 1993](#)). Une autre étude a montré une perte de ce rôle prolifératif du CD40L dès lors que sa concentration est diminuée (0,5µg/ml contre 1µg/ml) ([Schilizzi et al., 1997](#)).

L'activation du CD40 semble indispensable pour obtenir une prolifération. En effet, la stimulation des LB avec les cellules CD32-L associées à l'IL-4 soluble n'entraîne aucune prolifération contrairement à la co-culture CD32-L associées à l'IL-4 + CD40L où l'on observe une forte prolifération presque 20 fois supérieure après 10 jours de culture ([Banchereau et al., 1991](#)). Ce modèle très utilisé confirme le potentiel prolifératif du CD40L ([Galibert et al., 1994](#); [Galibert et al., 1995](#); [Rousset et al., 1992](#); [Schilizzi et al., 1997](#)).

Ce modèle a inspiré directement le modèle de McKenzie et son équipe qui associe l'utilisation d'IL-4 et des cellules CD32-L exprimant directement le CD40L par transfection. La réponse obtenue est semblable avec l'observation d'une prolifération ([McKenzie et al., 1993](#)).

La co-culture de LB avec les cellules CD32-L + CD40L a également été testée avec d'autres interleukines comme l'IL-10. L'utilisation de l'IL-10 induit une prolifération similaire à l'utilisation de l'IL-4, accompagnée cette fois-ci d'une sécrétion d'IgG, d'IgA et d'IgM montrant la présence de LB commutés ([Rousset et al., 1992](#); [Schilizzi et al., 1997](#)). En association avec une activation du BCR, l'IL-10 permet l'initiation de la réplication de l'ADN du LB activé. On observe finalement un effet additif de l'IL-4 et de l'IL-10 dans l'augmentation de la survie cellulaire. De plus, la présence de commutation montre que l'IL-10 permet une amélioration de la réponse humorale avec une adaptation aux pathogènes.

L'utilisation de l'IL-2, en association avec ces fibroblastes murins et le CD40L n'entraîne aucune prolifération. Néanmoins, on retrouve la production des trois immunoglobulines (IgM, IgG, IgA) montrant une induction de la commutation de classe ([Rousset et al., 1992](#); [Schilizzi et al., 1997](#)).

L'association du modèle contenant les cellules CD32-L exprimant le CD40L avec l'IL-13 permet d'observer une prolifération comparable à celle obtenue avec l'IL-4 ([McKenzie et al., 1993](#)) ; contrairement à l'utilisation de cette interleukine sans l'utilisation de co-culture.

D'autres types de fibroblastes permettent d'obtenir des résultats similaires. Parmi ces fibroblastes, on retrouve notamment les cellules fibroblastiques CV1-EBNA ou les 3T3 transfectés ([Decker et al., 2000](#); [Spriggs et al., 1992](#)).

A noter que l'utilisation du CD40L, qu'il soit murin ou humain, montre des résultats comparables ([Spriggs et al., 1992](#)).

Neron et son équipe ont publié d'importantes études sur la différence de réponse des B mémoires et LB naïfs dans un modèle de co-culture composée de fibroblastes murins exprimant le CD40L (CD154+) associée à une stimulation avec l'IL-4. Ces différentes études mettent en évidence une différenciation rapide des LB mémoires avec une production d'IgG suivie d'une mortalité cellulaire, alors que les LB naïfs présentent une expansion rapide suivie d'une différenciation cellulaire.

Ces auteurs ont également confirmé l'importance de la liaison CD40-CD40L qui détermine le taux de prolifération et de différenciation. Le modèle utilisant des co-cultures montre un maintien et une survie des LB pouvant atteindre 15 jours ([Fecteau and Neron, 2003](#); [Neron et al., 2005](#); [Neron et al., 2011](#)).

II. La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

II.1. Caractéristiques de la LLC

II.1.1. Définition

La LLC est une hémopathie maligne chronique caractérisée par une accumulation de LB monoclonaux matures (supérieur à 5G/L) dans le sang, la moelle osseuse ou autres organes lymphoïdes ([Chiorazzi et al., 2005](#)).

II.1.2. Épidémiologie

La LLC est la leucémie la plus fréquente dans les pays occidentaux, représentant près de 30% des leucémies. Selon l'Institut de Veille Sanitaire, on dénombre près de 4 500 nouveaux cas par an en France en 2012 ([Le Guyader-Peyrou et al., 2016](#)).

La maladie touche principalement les personnes âgées de plus de 50 ans avec un âge médian de 75 ans. La majorité des personnes atteintes sont de sexe masculin avec un sex-ratio de deux hommes pour 1 femme ([Dores et al., 2007](#)).

La LLC peut être précédée d'un état pré-leucémique. En effet, cette pathologie dériverait de la Lymphocytose Monoclonale B (MBL) ([Landgren et al., 2009](#)). La MBL est définie par une forme asymptomatique caractérisée par une augmentation du nombre de lymphocytes ne dépassant pas le seuil de 5G/L. Cet état pré-leucémique est également défini par une expansion oligoclonale ou monoclonale ([Lanasa et al., 2010](#)) présentant des caractères phénotypiques de la LLC, notamment des anomalies chromosomiques ([Rawstron et al., 2008](#); [Rawstron et al., 2002](#); [Zenz et al., 2010](#)). La progression de la MBL vers la LLC est liée à une accumulation de lésions génétiques et épigénétiques ([Rawstron et al., 2008](#); [Strati and Shanafelt, 2015](#)). A partir de l'état pré-leucémique de la MBL, seule une petite fraction de patients évolue vers le stade LLC. La fréquence d'évolution d'une MBL vers une LLC est inférieure à 1% par an ([Rawstron et al., 2008](#)).

Par ailleurs, il est à noter que plus de 3% de la population générale est porteuse de lymphocytes B présentant un phénotype du lymphocyte B de LLC ([Rawstron et al., 2002](#)).

II.1.3. Diagnostic de la maladie

Le diagnostic de la LLC repose sur un hémogramme, un frottis sanguin et une analyse immunophénotypique.

Celui-ci est suspecté devant une lymphocytose supérieure à 5G/L (soit 5.10^9 ly/litre de sang) suite à la réalisation d'un hémogramme. Cette augmentation du nombre de lymphocytes persiste sur une période supérieure à 3 mois ([Dighiero and Hamblin, 2008](#); [Hallek et al., 2008](#)).

Le frottis sanguin met en évidence une population morphologiquement homogène constituée de petits lymphocytes matures possédant un rapport nucléo-cytoplasmique élevé.

Le diagnostic, suggérant le développement d'une LLC, est affirmé par une analyse immunophénotypique. La cytométrie en flux étudie la présence et l'absence de différentes molécules :

- La présence de la molécule **CD5**, initialement décrite sur les LT mais également retrouvée sur une sous-population de LB Naïfs et à la surface de LB régulateur ([Bikah et al., 1998](#); [Lee et al., 2011](#)). Le récepteur CD5 est un co-régulateur négatif de la voie du BCR *via* son ligand CD72. Il permet une atténuation de la signalisation mise en place à la suite de la reconnaissance de l'antigène par le BCR obligeant ainsi un certain seuil de stimulation pour activer le lymphocyte ([Berland and Wortis, 2002](#)).
- La présence du récepteur **CD23**, ou récepteur pour le fragment Fc des IgE (FcεRII), participe physiologiquement à la régulation de la sécrétion d'IgE.
- La **négativité du marqueur FMC7**. Ce marqueur est présent sur les lymphocytes B sains physiologiques.
- Une **faible expression des immunoglobulines de surface** composant le BCR avec la présence d'une **monotypie kappa ou lambda** associée à une **diminution d'expression du corécepteur du BCR (CD79β)** ([Dighiero and Hamblin, 2008](#); [Klein et al., 2001](#); [Matutes et al., 1994](#); [Oppezzo and Dighiero, 2013](#)).

Ces cinq caractères phénotypiques permettent de définir le score du Royal Marsden Hospital ou score de Matutes ([Matutes et al., 1994](#)). Chacun de ces caractères immunophénotypiques vaut 1 point (5 points maximum). Le diagnostic de LLC est confirmé si le score est supérieur ou égal à 4.

Marqueur	1 point	0 point
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
Ig de surface	Faible expression	Moyenne ou Forte expression
CD79β	Faible expression	Moyenne ou Forte expression

Tableau 2 : Marqueurs biologiques participant à l'établissement du score de Matutes ([Matutes et al., 1994](#)).

II.1.4. Stade anatomo-cliniques

La LLC évolue en différents stades cliniques. Actuellement, différents systèmes de classification permettent d'évaluer le stade clinique et définit ainsi des groupes pronostics participant aux choix thérapeutiques ([Hallek, 2017](#); [Hallek et al., 2008](#)).

En France, le système de classification le plus utilisé est la classification de Binet qui définit trois stades (stade A, B et C). Ces trois stades de Binet sont déterminés en fonction du nombre d'aires ganglionnaires atteintes (Tableau 3) et de la présence éventuelle de cytopénies associées ([Binet et al., 1981](#)). Le Stade A correspond à un stade initial et concerne plus de 60% des patients au diagnostic. Il est défini par moins de trois aires ganglionnaires atteintes. Le stade B, stade intermédiaire, représente 30% des patients et est déterminé par l'atteinte d'au minimum 3 aires ganglionnaires. Le stade C est retrouvé chez moins de 10% des patients. Ce stade évolué de la maladie est caractérisé par une cytopénie (anémie et/ou thrombopénie). La médiane de survie des patients diminue avec l'évolution du stade, elle est de 2 ans pour le stade C, de 7 ans pour le stade B et est identique à la population générale pour le stade A.

Stade	Aires Ganglionnaires atteintes	Pathologies associées
A	Inférieur à 3	-
B	Supérieur ou égal 3	-
C	Supérieur ou égal 3	Anémie et/ou Thrombopénie

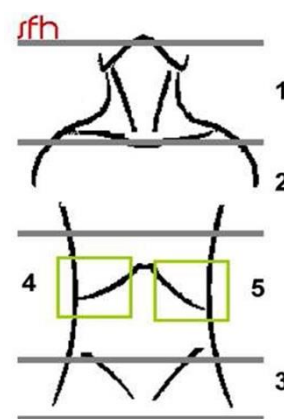


Tableau 3 : Système de classification du stade anatomo-clinique selon Binet ([Binet et al., 1981](#)).

La classification de Rai, essentiellement utilisée dans les pays anglo-saxons comporte cinq stades (de 0 à 4). Les patients classés parmi le stade 0, présentent une lymphocytose supérieure à 5G/L (31% des patients avec une médiane de survie supérieure à 10 ans). Les stades supérieurs sont déterminés en fonction de la pathologie associée. Les stades intermédiaires correspondent au stade 0 associé à une adénopathie pour le stade I (35% des patients ; médiane de survie à 9 ans) ou associé à une splénomégalie ou une hépatomégalie pour le stade II (26% des patients ; médiane de survie à 5 ans). Les stades III et IV sont considérés comme des stades de mauvais pronostic. Le stade III est associé à une anémie et le stade IV est associé à une thrombopénie. Ces deux derniers stades représentent moins de 6% des patients qui possèdent alors une médiane de survie inférieure à 2 ans ([Rai et al., 1975](#)).

II.1.5. Complications

La LLC est une maladie très hétérogène comportant des formes indolentes, avec une survie de plus de 10 ans, et des formes agressives ayant une survie de 5 et 7 ans ([Eichhorst et al., 2015](#); [Hamblin et al., 2002](#); [Leporrier et al., 2001](#)). La survie à 10 ans est d'environ 75% chez un sujet jeune contre 50% chez un patient de plus de 75 ans ([Pulte et al., 2016](#)).

Différentes complications peuvent survenir lors de l'évolution de la LLC. La diminution de lymphocytes B résiduels sains lors de l'invasion médullaire induit une hypogammaglobulinémie responsable d'un déficit immunitaire. Des complications infectieuses, de nature virale ou microbienne, secondaires à ces déficits surviennent chez plus de 50% des patients notamment lors des stades avancés de la pathologie. Ces complications infectieuses augmentent la mortalité de la LLC.

Une autre cause fréquente de complications est due à la présence de cytopénies auto-immunes. Elles se traduisent par l'apparition d'une anémie, c'est-à-dire par une diminution du nombre de globules rouges, et/ou par l'apparition d'une thrombopénie, correspondant à une diminution du nombre de plaquettes sanguines. Les cytopénies sont observées chez environ 15% des patients ([Kalil and Cheson, 1999](#)) et sont souvent d'origine auto-immune avec la sécrétion d'auto-anticorps. La présence de cytopénies associées à la lymphocytose aggrave le pronostic.

Dans certains cas, une transformation en lymphome de haut-grade ([Rossi et al., 2008](#); [Rossi et al., 2018](#)) appelé syndrome de Richter peut survenir. Cette complication se présente avec une incidence de 5 à 10% ([Jain and O'Brien, 2012](#); [Solh et al., 2013](#)) et les patients ont une médiane de survie qui chute à 4 mois. Des analyses génomiques ont démontré une corrélation entre le clone retrouvé dans le syndrome de Richter et le clone initial de la LLC. L'accumulation de lésions génétiques pourrait expliquer la transformation. Différents gènes présentent des mutations

supplémentaires dans le syndrome de Richter, notamment des gènes associés au cycle cellulaire (CDKN2A/B) ou encore des gènes connus dans la pathogénèse de la LLC comme les gènes *TP53* et *Notch Homolog 1 (NOTCH1)* ([Fabbri et al., 2013](#)).

Enfin, dans la LLC, le risque de développer un autre cancer, notamment un cancer cutané, est plus élevé que dans la population générale.

II.2. Les traitements de la LLC

II.2.1. Traitements chimiothérapeutiques

Les chimiothérapies utilisées dans la LLC comportent trois agents, les agents alkylants, les analogues de purines et la Bendamustine.

Les agents alkylants ont été, pendant de nombreuses années, utilisés en première intention chez les patients souffrant de LLC. Les deux principales molécules sont le chlorambucil et la cyclophosphamide ([CollaborativeGroup, 1999](#)). Cependant, ces traitements sont peu efficaces en monothérapie avec un faible taux de rémission complète et l'apparition d'effets secondaires.

Au niveau des analogues de purine, on trouve la fludarabine, la pentostatine et la cladribine. En monothérapie, quelques études ont montré de meilleures réponses globales comparées aux agents alkylants ainsi qu'un meilleur taux de rémission ([Rai et al., 2000](#)).

Enfin, la bendamustine, qui est une molécule bi-fonctionnelle avec à la fois des propriétés d'agents alkylants et à la fois des propriétés anti-métaboliques. Utilisée dans le traitement de différents cancers, sa comparaison avec le chlorambucil montre une meilleure réponse globale mais montre également une absence d'amélioration de la survie et une forte toxicité ([Knauf et al., 2009](#)).

La bendamustine a démontré son efficacité dans les traitements de seconde ligne avec une amélioration de la réponse globale et du taux de réponse clinique ([Niederle et al., 2013](#)).

Dans le but d'améliorer leur efficacité, des combinaisons de chimiothérapies ont été testées et permettent d'utiliser de façon complémentaire les différents mécanismes d'action. Plusieurs études *in vitro* ont montré l'efficacité de l'association d'un analogue de purine, la Fludarabine avec d'autres agents comme la prednisone (corticostéroïde) ([Keating et al., 1998](#)) ou encore la cyclophosphamide (autre agent alkylant) ([Bellosillo et al., 1999](#); [Catovsky et al., 2007](#); [O'Brien et al., 2001b](#)). Ces agents permettent d'induire une apoptose en agissant sur l'ADN polymérase. Actuellement, le traitement chimiothérapeutique proposé aux patients avec un état général conservé repose sur une association de Fludarabine et de Cyclophosphamide permettant ainsi une synergie de la cytotoxicité.

II.2.2. Anticorps monoclonaux : l'anti-CD20

Des anticorps monoclonaux, comme l'anti-CD20, sont également utilisés. Le CD20 est un marqueur spécifique du lymphocyte B.

Plusieurs anticorps dirigés contre le CD20 sont disponibles : le Rituximab ([O'Brien et al., 2001a](#)) ou encore l'Ofatumumab qui est proposé aux patients réfractaires à la Fludarabine ([Wierda et al., 2010](#)). L'Obinutuzumab (GA101) montre de meilleurs résultats dans le taux d'apoptose engendré que le Rituximab. Cette mortalité plus importante est la conséquence d'une augmentation de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

Au total, le traitement de référence actuel pour des patients avec un état général conservé repose sur l'association de chimiothérapie avec des anticorps monoclonaux. Ce traitement de référence est constitué de Fludarabine, de Cyclophosphamide et de Rituximab (FCR) ([Hallek et al., 2018](#)).

II.2.3. Inhibiteurs sélectifs de protéines de la voie du BCR

Le développement d'inhibiteurs de protéines de la voie du BCR fait partie des plus grandes avancées de ces dernières années dans le traitement de cette pathologie.

Parmi les différentes protéines de la cascade de signalisation du BCR, deux sont actuellement ciblées ; il s'agit de la protéine BTK et de la PI3K, toutes deux connues pour être constitutivement activées dans la LLC ([Ringshausen et al., 2002](#); [Woyach et al., 2014a](#)).

Le premier inhibiteur de la voie du BCR retrouvé dans la littérature est l'Ibrutinib. Ce dernier a pour cible la protéine BTK et entraîne son inhibition. Cette voie importante dans la signalisation du BCR participe essentiellement à la survie cellulaire *via* la molécule NF- κ B. L'utilisation de cet inhibiteur entraîne une augmentation d'apoptose des LB ainsi qu'une diminution de la prolifération *in vitro* ([Herman et al., 2011](#)). Plusieurs études font état de rémissions chez les patients LLC réfractaires ou en récurrence ([Advani et al., 2013](#); [Byrd et al., 2013](#); [Hendriks et al., 2014](#)).

Cependant, des résistances à l'Ibrutinib ont été décrites. Une étude comparant des exomes avant et après traitement a mis en évidence différentes mutations, notamment au niveau de BTK, pouvant être en cause dans cette résistance. Ces mutations seraient responsables d'une diminution d'affinité de l'Ibrutinib. Chez ces patients réfractaires, on retrouve également des mutations activatrices au niveau de PLC γ 2 permettant une activation du BCR indépendante de BTK ([Woyach et al., 2014b](#)).

Une autre molécule inhibitrice de la voie BCR a également été découverte, l'Idelalisib. Cette fois, l'inhibiteur cible sélectivement l'isoforme δ de la protéine PI3K. Cette protéine est impliquée

dans la voie Akt et participe de ce fait à la signalisation du BCR. Elle possède un rôle à la fois dans la survie cellulaire et dans la prolifération. L'Idelalisib est décrite comme une molécule induisant spécifiquement une apoptose des LB chez les patients LLC en agissant sur le chimiotactisme et sur la sécrétion de chimiokines après activation du BCR ([Hoellenriegel et al., 2011](#)). Ce traitement a montré une amélioration de la survie globale chez des patients réfractaires aux traitements classiques ainsi que chez des patients porteurs d'une délétion 17p ([Brown et al., 2014](#)).

II.2.4. Inhibiteurs de la protéine anti-apoptotique Bcl-2

L'intérêt des recherches de ces dernières années porte sur des molécules capables de restaurer la fonction d'apoptose dans ces cellules cancéreuses. La protéine Bcl-2, qui est surexprimée dans les LB-LLC et de nombreux lymphomes, pourrait participer au défaut d'apoptose de ces cellules *in vivo* ([Marschitz et al., 2000](#)).

Le traitement développé pour interférer dans ce processus d'apoptose est la molécule ABT-199 (Venetoclax). Son efficacité est démontrée dans l'induction de l'apoptose de B-LLC *in vitro* grâce à une inhibition spécifique de la protéine Bcl-2. Cette molécule est dirigée spécifiquement contre la protéine Bcl-2 tout en épargnant les autres protéines de la famille Bcl-2 comme BCL-X_L qui était en cause dans le développement de thrombocytopenies. Son efficacité est indépendante de la présence d'une délétion 17p (mutation/perde TP53) ([Anderson et al., 2016](#); [Roberts et al., 2016](#); [Souers et al., 2013](#)).

II.2.5. Indication Thérapeutique

L'indication de traitement d'un patient porteur de la LLC repose sur le stade anatomo-clinique (stade de Binet/Rai) ainsi que sur l'évolutivité de la maladie.

La prise de décision pour débuter le traitement repose sur un guide du groupe de travail international sur la LLC (iwCLL) ([Hallek et al., 2018](#); [Hallek et al., 2008](#)).

Ce guide définit deux règles :

- Un patient porteur d'une LLC asymptomatique et non évolutive, classé en stade A (classification de Binet) ou en stade 0 (classification de Rai), ne présente pas d'indication de traitement et sera placé sous surveillance. A ce stade, l'utilisation d'un traitement précoce n'apporte aucun bénéfice sur la survie globale.
- Un patient porteur d'une LLC de stade intermédiaire ou avancé (Binet stade B et C ; Rai I à IV) ou de forme évolutive, se voit proposer la mise en place d'un traitement.

Une LLC évolutive est définie par divers caractères jugés comme agressifs ([Hallek et al., 2018](#)).

Parmi ces caractéristiques, on retrouve :

- Une insuffisance médullaire avec apparition ou aggravation de l'anémie ou de la thrombocytopenie,
- une splénomégalie évolutive (rate supérieure à 6cm),
- des adénopathies évolutives (nœuds lymphatiques supérieur à 10cm),
- une lymphocytose multipliée par 2 ou plus dans une période de 2 mois,
- l'apparition de complications auto-immunes,
- la prise en compte de l'état général du patient (perte de poids, fatigue importante ou forte fièvre).

Lorsque la décision thérapeutique est prise, le choix du traitement repose sur plusieurs critères. Le premier critère prend en compte la condition physique et l'âge du patient.

Le deuxième critère est la présence d'anomalies chromosomiques comme la délétion ou mutation du gène *TP53*. L'absence de la protéine TP53 va être prédictive de résistance et contre-indique de ce fait les traitements à base d'agents alkylants ou d'analogues de purine induisant l'apoptose par lésion d'ADN. Leur utilisation entraînerait alors des lésions d'ADN supplémentaires sans apoptose pouvant induire une accélération de la leucémie.

Aujourd'hui, une avancée thérapeutique en LLC a été obtenue par la combinaison de différents traitements. La combinaison de traitement permet souvent une synergie de l'efficacité mais également d'éviter le développement de résistances.

En cas d'absence de del17p ou d'absence de mutation de *TP53* (*TP53* fonctionnelle), le traitement sera composé d'une combinaison de chimiothérapies associant la Fludarabine, le cyclophosphamide et un anti-CD20 (Rituximab) (FCR) ([Hallek et al., 2010](#)). Un protocole combinant du Bendamustine et du Rituximab est parfois utilisé ([Fischer et al., 2012](#); [Fischer et al., 2011](#)). Si le patient présente un état général fragilisé, il sera traité avec un seul de ces deux agents de chimiothérapie associé au Rituximab ou à un inhibiteur du BCR.

En cas de délétion 17p ou de mutation de *TP53*, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de la voie BCR combiné éventuellement à un anti-CD20 (Rituximab) est recommandée. En cas d'état général fragile, le patient est traité soit par Rituximab, soit par un inhibiteur du BCR ([Hallek, 2017](#)).

Malgré ces traitements, un fort taux de rechute est observé, ce qui fait encore aujourd'hui de la LLC une maladie incurable.

En cas de rechute tardive, au-delà d'une période de 3 ans après le traitement de première ligne, le patient se voit proposer un traitement semblable au premier (traitement de référence).

En cas de rechute rapide, survenant avant les 3 ans, le patient se voit proposer un nouveau traitement différent de celui utilisé en première ligne ([Hallek, 2017](#)). Dans de très rares cas, un traitement par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques pourra être proposé ([Dreger et al., 2007](#); [Sutton et al., 1998](#)).

II.3. Facteurs biologiques pronostics d'évolutivité

II.3.1. Le temps de doublement des lymphocytes

Le temps de doublement des lymphocytes correspond au nombre de mois nécessaires pour que le nombre absolu de lymphocytes sanguins soit multiplié par deux, ce qui reflète l'évolutivité de la leucémie. En effet, différentes études ont permis de classer les patients en 2 catégories. Un temps de doublement des lymphocytes inférieur à 12 mois traduit une forme évolutive de la maladie et est de mauvais pronostic. Cette forme évolutive entraîne une chute de la médiane de survie à moins de 5 ans ([Montserrat et al., 1986](#)). *A contrario*, si la population lymphocytaire est doublée en plus de 12 mois, on décrira la LLC comme étant une forme stable.

Ce facteur ne peut être utilisé seul pour faire un pronostic de la maladie. En effet, le temps nécessaire à sa détermination est long et dans le cas d'une LLC évolutive, la prise de décision sera de ce fait trop tardive.

II.3.2. Statut mutationnel de gènes codants de la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgVH)

Pour rappel, le BCR est une immunoglobuline composée de deux IgH et deux IgL. Cette IgH contient une région variable (IgVH). Ces régions variables sont, elles même, constituées de trois régions Hyper-Variantes (les CDR) permettant une grande spécificité antigénique.

En condition physiologique, la rencontre du LB avec son antigène et d'un LT spécifique du même antigène induit une maturation secondaire d'affinité dans le centre germinatif. Cette maturation comprend des hypermutations somatiques qui consistent en l'insertion de mutations ponctuelles ([Hozumi and Tonegawa, 1976](#)). Ces hypermutations ont lieu dans ces régions de l'IgVH (région CDR3), et leur présence permet de distinguer les LB ayant rencontrés un antigène (post-GC) des LB naïfs n'ayant pas rencontrés d'antigène (pré-GC).

La détection de ces hypermutations est réalisée par séquençage du gène de l'IgVH codant cette région CDR3 qui est comparée à une séquence germinale de référence. Si l'homologie entre les deux séquences est supérieure à 98%, la séquence est définie comme non mutée (NM) alors qu'en cas d'une homologie inférieure à 98%, la séquence est considérée comme mutée (M) ([Schroeder and Dighiero, 1994](#)).

L'analyse du statut mutationnel chez les patients porteurs de LLC permet de distinguer deux groupes en fonction de la présence de mutations dans l'IgVH. Ce facteur biologique, qui est stable tout au long de la maladie, est corrélé à la survie, ce qui en fait le principal facteur pronostic ([Schroeder and Dighiero, 1994](#)).

Dans la LLC, la présence de mutations est associée à une maladie indolente et un pronostic favorable avec une médiane de survie de 25 ans alors que les patients présentant des IgVH NM auront un pronostic défavorable avec une médiane de survie inférieure à 8 ans ([Hamblin et al., 1999](#)). La répartition des patients en fonction de ce facteur biologique est de 60% de patients M et de 40% de patients NM.

Des analyses du profil d'expression génique ont montré l'existence d'une signature transcriptionnelle particulière et spécifique de la LLC par comparaison à d'autres lymphoproliférations. Un nombre restreint de gènes sont différenciellement exprimés entre la forme NM et M de LLC. En 2001, une équipe a réussi à déterminer un groupe de 23 gènes différenciellement exprimés en fonction de l'état mutationnel ([Klein et al., 2001](#)). Parmi ces gènes, on retrouve notamment le gène codant la protéine *zeta-chain-associated protein kinase* (ZAP-70) ([Rosenwald et al., 2001](#); [Wiestner et al., 2003](#)).

II.3.3. Expression de la protéine ZAP-70

La protéine ZAP-70 est une tyrosine kinase décrite initialement dans la signalisation du récepteur des LT (TCR). Elle a depuis été retrouvée dans différentes sous-populations de LB avec des niveaux d'expression variables suivant le stade de maturation. En comparaison des LT, la protéine est exprimée avec une moindre intensité par les LB naïfs, les LB du centre germinatif (LB-GC), des LB mémoires, les LB CD5+ de sang de cordon ombilical ([Cutrona et al., 2006](#); [Nolz et al., 2005](#); [Scielzo et al., 2006](#)).

La protéine ZAP-70 est surexprimée par un sous-groupe de patient LLC. Une corrélation entre l'expression de la protéine ZAP-70 et le statut mutationnel a été confirmée dans la LLC ([Rosenwald et al., 2001](#)). L'expression de cette protéine est 5 fois supérieure chez les patients porteurs de LLC NM par rapport aux patients M, permettant ainsi de prédire le statut mutationnel des patients dans 93% des cas ([Wiestner et al., 2003](#)).

Des études de survie ont montré que la présence de ZAP-70 associée à l'absence de mutations des gènes codants l'IgVH est un signe de mauvais pronostic ([Chen et al., 2002](#); [Rassenti et al., 2004](#)).

Cependant, de nombreuses difficultés ont été rencontrées pour standardiser la quantification de son expression en pratique quotidienne ([Letestu et al., 2006](#)). L'analyse de l'état mutationnel des IgVH reste à ce jour le facteur pronostic de référence dans cette leucémie.

II.3.4. Expression du marqueur CD38

Le CD38 est une glycoprotéine membranaire exprimée à la surface de différentes cellules et notamment sur les LT et les LB activés. Il participe à l'interaction cellule-cellule, à la migration cellulaire et est considéré comme un transducteur de signal. Sa liaison avec son ligand, le CD31 ([Deaglio et al., 1998](#)) augmente la survie cellulaire en inhibant l'apoptose dans le centre germinatif grâce à l'induction d'un faible flux calcique ([Deaglio et al., 2007](#)) et induit une sécrétion d'IL-2 ([Lund et al., 1996](#)).

Les LB exprimant un taux de CD38 supérieur à 30% sont corrélés avec une absence de mutation des IgVH dans 64% des cas de LLC ([Damle et al., 1999](#)). L'association de l'expression du marqueur CD38 avec l'absence de mutation dans l'IgVH suggère un mauvais pronostic ([Damle et al., 1999](#); [Del Poeta et al., 2001](#); [Hamblin et al., 2002](#)). Le CD38 a donc un intérêt pronostic pour évaluer la survie globale du patient ([Del Poeta et al., 2001](#); [Morabito et al., 2001](#)).

Des études ont cependant démontré une variation de son expression au cours de la maladie, ce qui remet en cause son intérêt ([Ghia et al., 2003](#)).

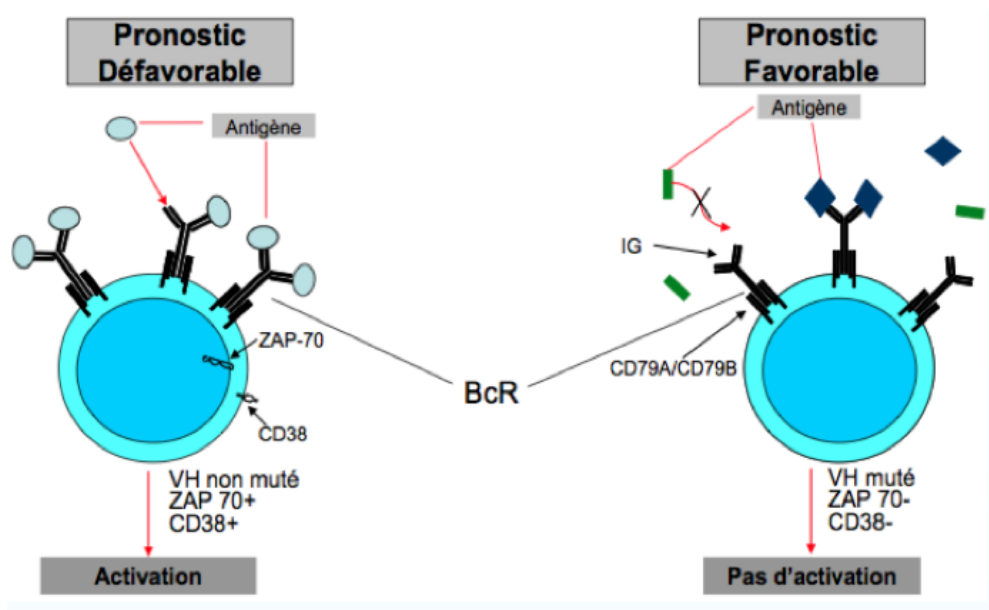


Figure 8 : Facteurs biologiques pronostics de la LLC (adaptée de ([Chiorazzi et al., 2005](#))).

II.4. Physiopathologie de la LLC

II.4.1. Terrain génétique

La LLC est une pathologie sporadique mais il existe des preuves de prédispositions génétiques. Différentes études montrent un risque augmenté (x8,5) de développer une LLC parmi les membres de la famille du premier degré du patient atteint ([Goldin et al., 2009](#); [Speedy et al., 2013](#)).

Dans la littérature, une seule étude a rapporté un cas de prédisposition génétique chez un patient présentant une diminution d'expression du gène pro-apoptotique *Death-associated protein kinase 1 (DAPK1)* ([Raval et al., 2007](#)).

Des études d'association génomique (GWAS) ont permis de mettre en évidence divers loci de susceptibilité de développement de la LLC ([Berndt et al., 2016](#); [Di Bernardo et al., 2008](#); [Law et al., 2017a](#); [Law et al., 2017b](#); [Speedy et al., 2014](#)). Ces divers loci entraînent un risque modéré. De plus, de nombreux loci de susceptibilité sont proches de gènes participant à des fonctions importantes comme l'apoptose ([Berndt et al., 2016](#)), le développement du LB ou encore participant à sa signalisation (liaison avec des facteurs de transcription notamment) ([Di Bernardo et al., 2008](#); [Law et al., 2017a](#)).

Actuellement, bien que la majorité des LLC soient de nature sporadique, de nombreuses études ont démontré l'existence d'une prédisposition familiale. Des validations restent nécessaires afin de confirmer cette base génétique. Une diminution d'expression du gène du Facteur de Régulation à l'Interféron - 4 (*IRF4*) a également été incriminée. Un modèle murin a mis en évidence le rôle de cette diminution d'expression en montrant le développement spontané de LLC dans les souris déficientes en IRF4. Les cellules murines responsables de cette leucémie présentaient toutes une résistance à l'apoptose qui était réversible lors de l'induction de l'expression de la protéine IRF4 ([Shukla et al., 2013](#)).

II.4.2. Anomalies génétiques

II.4.2.1. Anomalies chromosomiques

Plus de 80% de patients atteints de LLC présentent des anomalies chromosomiques ([Dohner et al., 2000](#)). Ces anomalies sont recherchées et mises en évidence à l'aide d'un caryotype et d'une Hybridation *In Situ* en fluorescence (FISH).

Les principales anomalies chromosomiques retrouvées sont la délétion 13q14, la trisomie 12, la délétion 11q22-23 et la délétion 17p13 ([Dohner et al., 2000](#); [Fabbri and Dalla-Favera, 2016](#); [Juliussen et al., 1990](#)).

La délétion de la région 13q14 est l'anomalie la plus fréquente et touche 50 à 60% des patients. La région minimale de délétion comprend les gènes « *Deleted in Lymphocytic Leukemia* » (*DLEU*) ainsi que les gènes codant les microARNs (miRNAs) miR-15a et -16.1. 68% des patients LLC présentent une diminution, voire une absence, des miR-15 et -16 ([Calin et al., 2002](#)). Cette délétion est associée à un pronostic favorable avec une médiane de survie de 133 mois ([Dohner et al., 2000](#)). Des modèles murins ([Klein et al., 2010](#); [Lia et al., 2012](#)) présentant une délétion des miR-15a et -16 développent des lymphoproliférations confirmant ainsi le rôle pathogène de la perte de ces miARNs.

La délétion de cette région peut, de par sa taille, impliquer une perte du suppresseur de tumeur du gène du rétinoblastome (*RBI*) ([Ouillette et al., 2008](#)). Cela en fait une délétion avec un pronostic défavorable ([Ouillette et al., 2011](#)).

La deuxième anomalie chromosomique est la Trisomie 12 retrouvée dans 15 à 20% des patients.

La présence de cette trisomie est un facteur pronostic indépendant du statut mutationnel et est associée à une médiane de survie de 114 mois ([Dohner et al., 2000](#)).

L'association de la trisomie 12 et d'une mutation dans le gène *NOTCH1* confère un mauvais pronostic en raison d'un risque d'évolution en syndrome de Richter plus important ([Del Giudice et al., 2012](#); [Strati et al., 2015](#)).

La délétion d'une partie du bras long du chromosome 11 (délétion 11q22-23) est présente chez 20% des patients et est associée à une médiane de survie de 79 mois ([Dohner et al., 2000](#); [Trbusek et al., 2006](#)). L'étendue de la délétion est variable et celle-ci est fréquemment associée à une IgVH NM. Cette délétion peut entraîner la perte du gène suppresseur de tumeur *Ataxie Téléangiectasie Muté* (*ATM*) codant une protéine de la voie de réparation des dommages de l'ADN ([Stankovic and Skowronska, 2014](#)). On trouve également des délétions 11q22-23 associées à une perte d'un régulateur négatif de la voie NF-κB, *Baculoviral IAP Repeat Containing 3* (*BIRC3*) ([Rossi et al., 2012](#)).

La délétion du bras court du chromosome 17 (délétion 17p13) est mise en évidence chez moins de 10% des patients. Cette anomalie chromosomique, fréquemment associée à une IgVH NM, est associée à un mauvais pronostic avec une médiane de survie de 32 mois ([Dohner et al., 2000](#)) en raison de l'inactivation du gène codant la *Protéine de Tumeur 53* (*TP53*). La délétion de ce gène entraîne un défaut de la voie de réparation de l'ADN et de l'apoptose.

Le dépistage de cette anomalie chromosomique est important, car elle est associée à une résistance à la chimiothérapie et contre-indique le traitement par chimiothérapie induisant des lésions de l'ADN.

II.4.2.2. Mutations génétiques

Le développement du séquençage nouvelle génération (NGS) a fortement contribué à l'approfondissement des connaissances des anomalies génétiques dans la LLC.

La première étude mentionnant le NGS, en 2011, a mis en évidence des mutations dans la séquence de 46 gènes. Le séquençage de ces gènes, sur une cohorte de 363 patients, a permis de confirmer une fréquence importante de mutations dans les gènes *NOTCH1* (fréquence de 20%), *Exportin 1 (XPO1)*, *MYeloid Differentiation primary response gene 88 (MYD88)* et *Kelch-like 6 (KLHL6)*. La présence de mutations dans les gènes *MYD88* et *KLHL6* est davantage associée à des IgVH mutées alors que les mutations dans les gènes *NOTCH1* et *XPO1* sont davantage associées à des IgVH non mutées ([Puente et al., 2011](#)).

Une autre équipe a également retrouvé des mutations de *NOTCH1* chez 8% des patients LLC et celles-ci sont associées à un mauvais pronostic. En effet, ces mutations sont retrouvées chez 31% des patients présentant un Syndrome de Richter et chez 21% des patients résistants à la chimiothérapie ([Fabbri et al., 2011](#)).

D'autres gènes impliqués dans la pathologie ont été mis en évidence comme le gène codant la *sous-unité 1 du Facteur d'Épissage 3B (SF3B1)* où des mutations ont été retrouvées dans 10 à 15% des patients et associées à des formes plus évolutives de la leucémie ([Quesada et al., 2011](#); [Wang et al., 2011](#)).

Ces études ont, par ailleurs, retrouvé des mutations dans les gènes *TP53*, mutation la plus répandue chez les patients, ou encore dans le gène *ATM* ([Wang et al., 2011](#)).

II.4.2.3. Anomalies épigénétiques

Les anomalies épigénétiques correspondent à l'ensemble des modifications d'expression d'un gène, sans anomalie de sa séquence, par méthylation d'ADN ou modification de la structure de la chromatine ([Ruden et al., 2003](#)).

L'épigénétique dans la LLC est bien documentée et démontre qu'il existe habituellement une hypométhylation généralisée dans les LB-LLC comparés à des LB issus de donneurs sains ([Kulis et al., 2012](#)). Cette hypométhylation de l'ADN est stable dans le temps, à la fois dans les cellules de LLC du sang périphérique et dans les cellules en cours de prolifération dans les ganglions lymphatiques ([Cahill et al., 2013](#)).

La comparaison de la méthylation de l'ADN entre les cellules avec des IgVH M et NM a mis en évidence une variation de la méthylation de gènes suppresseurs de tumeur et de gènes impliqués dans la prolifération et la progression tumorale, comme les gènes *ADORA3*, *AIRE*, *IFNB1*. ([Cahill et al., 2013](#); [Kanduri et al., 2010](#)). Cette différence de méthylation entre les cellules possédant des IgVH NM et M pourrait également refléter leur origine puisque ce profil épigénétique est similaire à celui des cellules B naïves et des cellules B mémoires respectivement ([Kulis et al., 2012](#)).

II.4.3. Anomalies des progéniteurs

II.4.3.1. Hypothèse d'anomalies de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la leucémogénèse

L'hypothèse du rôle des CSH dans la leucémogénèse a été proposée en 2011 par l'équipe de Kikushige qui a suggéré la présence d'un évènement déclencheur au niveau de ces cellules ([Kikushige et al., 2011](#)).

La greffe de CSH, issues de patients porteurs de LLC, dans des souris immuno-déficientes a montré leur capacité à recréer une hématopoïèse complète avec un biais de différenciation en faveur de la lignée B avec la présence d'expansion oligoclonale.

Cependant, la présence d'un répertoire VH différent, entre le clone apparu et le clone tumoral initial (origine des CSH), conforte la présomption de la nécessité de modifications épigénétiques pour le déclenchement de la leucémogénèse.

L'hypothèse est alors que le potentiel leucémogène existe au stade CSH et qu'une stimulation antigénique chronique ultérieure serait responsable de la prolifération de LB matures génératrice de la LLC (Figure 8). Une étude, portant sur l'analyse des télomères, suggère que les cellules de LLC non mutées ont déjà connu un épisode prolifératif avant la transformation en cellule leucémique ([Damle et al., 2004](#)).

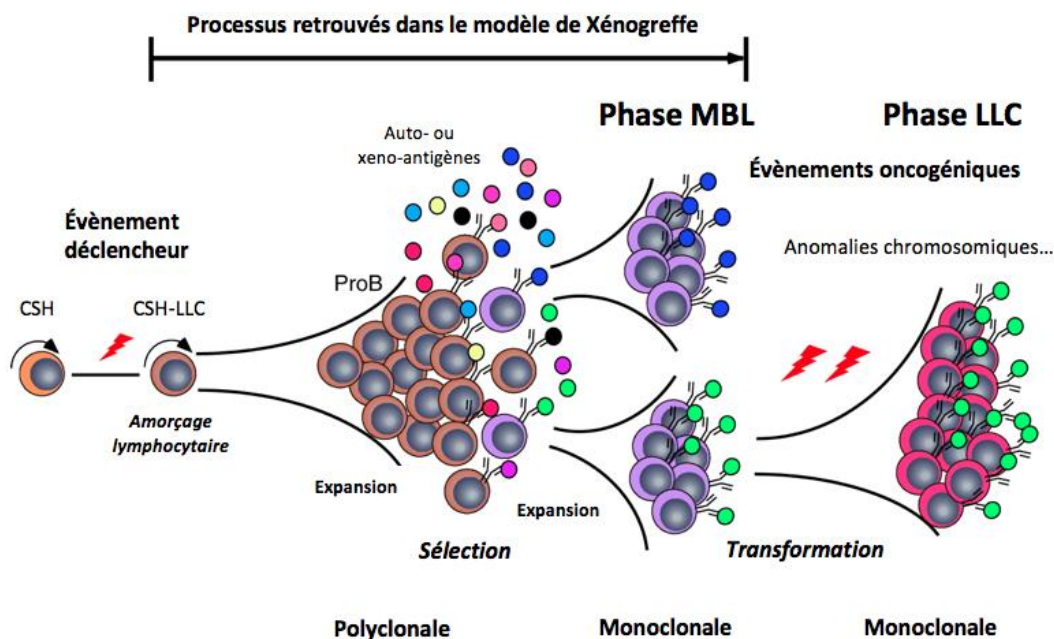


Figure 9 : Représentation schématique du développement de la LLC humaine dans un modèle murin de xénogreffe ([Kikushige et al., 2011](#))

D'autres travaux ont confirmé, grâce à des modèles murins, la présence de CSH porteuses de mutations du clone tumoral dans la moelle de patients LLC. La présence de mutations retrouvées dans les CSH au niveau des gènes *NOTCH1*, *SF3B1*, *BRAF* et *EGR2* entrainerait une perturbation de la différenciation hématopoïétique des LB précoces par dérégulation de la signalisation du pré-BCR ([Damm et al., 2014](#)).

La démonstration de l'existence de progéniteurs hématopoïétiques pathologiques et leur rôle éventuel dans la leucémogénèse reste cependant à confirmer.

Les mécanismes de leucémogénèse responsables du développement de la LLC restent encore mal connus, mais ces diverses études suggèrent un développement précoce de cette leucémogénèse avec un rôle des progéniteurs hématopoïétiques pathologiques déjà porteurs de lésions génétiques interférant dans le développement du LB.

II.4.3.2. « Side population »

Les cellules « side-population » (SP) ont pour la première fois été décrites en 1996 grâce à un marquage cellulaire avec du colorant Hoechst 33342 qui a permis d'isoler une sous-population minoritaire excluant le colorant. Ces cellules possèdent un potentiel de régénération de l'hématopoïèse chez une souris irradiée ([Goodell et al., 1996](#)) et présentent donc certaines propriétés de cellules souches, comme l'auto-renouvellement ([Hirschmann-Jax et al., 2005](#); [Kondo et al., 2004](#)). De plus, il a

été démontré que ces cellules ont la capacité de développer l'initiation d'une tumeur après xénotransgreffe chez la souris ([Hu et al., 2010](#)).

Dans la LLC, des cellules présentant des caractéristiques de cellules SP ont été isolées à partir de prélèvements issus de patients et ont montré des capacités d'auto-renouvellement ([Gross et al., 2010](#))

Les cellules SP sont donc détectables chez les patients atteints de LLC. Leur capacité d'auto-renouvellement bien supérieure aux cellules non-SP a été établie grâce à leur aptitude à induire des tumeurs et cela même lors de transplantations successives ([Wu et al., 2007](#)). De plus, ces cellules SP ont un rôle important dans la LLC, puisque la majorité de ces cellules se développent après un traitement à base de chimiothérapie. Cela prouve inéluctablement qu'elles représentent une population chimio-résistante (Foster et al, 2010).

II.4.4. Cellule(s) d'origine

Actuellement, l'origine cellulaire des LB-LLC reste discutée mais plusieurs hypothèses sont proposées ([Chiorazzi and Ferrarini, 2011](#); [Fabbri and Dalla-Favera, 2016](#); [Zhang and Kipps, 2014](#)).

La première hypothèse découle de la description immunophénotypique du LB-LLC. L'expression de CD5 sur les LB-LLC suggère que la cellule dérive d'une sous population B CD5+ ([Caligaris-Cappio, 1996](#)). Il s'agit d'une sous population de LB naïfs présente en faible proportion (10 à 25%) dans le sang périphérique ([Fischer et al., 1997](#)) ou au niveau des amygdales ([Dono et al., 2007](#); [Dono et al., 2004](#)).

Une deuxième hypothèse suggère comme origine de la cellule cancéreuse un LB de la zone marginale avec IgVH NM ([Chiorazzi and Ferrarini, 2011](#)), en raison des similarités entre ces cellules et les LB-LLC. Cependant, celle-ci est remise en cause puisque les cellules B de la zone marginale n'expriment pas le CD5 ([Weill et al., 2009](#)).

La comparaison du profil d'expression génique des LB-LLC NM et des LB-LLC M montre de très fortes similarités et suggère une origine commune aux 2 types de cellules ([Klein et al., 2001](#); [Rosenwald et al., 2001](#)). En effet, sur un panel de 12 000 gènes, seul 23 gènes sont différenciellement exprimés entre une cellule NM et une cellule M. Dans ces études, on trouve un profil transcriptomique très proche entre les cellules B mémoires CD27+ sortant du GC et les LB naïfs ou LB CD5+.

En 2012, la comparaison du profil d'expression génique du LB-LLC avec différentes sous-population de LB comprenant, des LB naïfs, des LB de la zone marginale, des LB commutés, des LB mémoires IgM+/CD27+ et des LB CD5+ du sang périphérique ([Seifert et al., 2012](#)) a montré que le profil transcriptomique des LB-LLC est proche de celui des LB CD5+ du sang périphérique.

De plus, en étudiant spécifiquement les séquences des gènes codants pour l'IgVH ([Forconi et al., 2010](#); [Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004](#)) et en effectuant une analyse du méthylome de l'ADN ([Kulis et al., 2012](#)), l'ensemble de ces données montre une forte proximité transcriptionnelle entre les **LB-LLC NM et les LB matures CD5+ CD27- sans mutation des gènes IgVH** ainsi que des similitudes entre les **LB-LLC M et les LB CD5+ CD27+ post-GC possédant des mutations des gènes IgVH**.

II.4.5. Accumulation des cellules leucémiques

II.4.5.1. *Résistance à l'apoptose des lymphocytes B de LLC*

Les LB-LLC possèdent des caractéristiques de cellules quiescentes arrêtées en phase G0. Ces cellules sont en effet de petite taille, présentent une chromatine dense et un rapport nucléocytoplasmique élevé.

Une absence de phosphorylation de la protéine du gène *RBI* suggère également un arrêt de la sénescence ([Caligaris-Cappio et al., 1993](#); [Kornblau et al., 1994](#)).

Les LB-LLC présentent un défaut d'apoptose favorisé par la surexpression de molécules anti-apoptotiques comme la protéine du *Lymphome à cellules B-2* (Bcl2) et la protéine *Myeloid Cell Leukemia 1* (MCL-1). Cette dérégulation est amplifiée par la sous-expression de molécules pro-apoptotiques comme la protéine Bax ([de Toterò et al., 2006](#); [Kitada et al., 1999](#); [Korz et al., 2002](#); [Oppezzo and Dighiero, 2013](#)).

La surexpression de la protéine BCL-2, permettant une augmentation de la survie cellulaire, est due à la diminution de la méthylation de sa région promotrice entraînant une augmentation de la transcription du gène ([Hanada et al., 1993](#)). D'autre part, cette surexpression peut également être expliquée dans les formes de LLC avec une délétion 13p, par la perte des miR-15-a et miR-16-1, qui régulent négativement la protéine BCL2 ([Cimmino et al., 2005](#)). Enfin, l'interaction ligand/récepteur CD38/CD31 améliore la survie cellulaire en favorisant également l'expression de BCL2 et BCL-X ([Deaglio et al., 2005](#)).

Par ailleurs, la surexpression et l'autophosphorylation de protéines en aval du BCR, comme SYK et ERK, dans les LB-LLC par rapport aux LB sains participent également à la dérégulation du mécanisme de mort et à l'augmentation de la survie cellulaire des LB-LLC ([Buchner et al., 2009](#)). La présence de la protéine ZAP-70, homologue de la protéine SYK, dans un sous-groupe de patients porteurs de LLC, vient amplifier ce phénomène d'activation de la voie du BCR ([Chen et al., 2002](#); [Gobessi et al., 2007](#); [Richardson et al., 2006](#)).

De plus, dans 10 à 15% des LB-LLC, des mutations de *TP53* et d'*ATM*, qui participent aux mécanismes de réparation de l'ADN, induisent des résistances à l'apoptose ([Trbusek et al., 2006](#); [Wang et al., 2011](#)).

Ex vivo, Il a été démontré le rôle essentiel, dans la résistance des cellules LLC, du système du protéasome/ubiquitination. L'irradiation d'un lymphocyte B sain induit une réponse pro-apoptotique. Au contraire, la réponse de certains LB-LLC, résistants à divers traitements, se traduit par une altération du processus d'apoptose ([Delic et al., 1998](#); [Masdehors et al., 1999](#)). Une hypothèse suggère une augmentation du mécanisme d'ubiquitination dans le LB-LLC, interagissant ainsi dans le déroulement de la voie NF- κ B connue pour prévenir l'induction d'apoptose en réponse à divers stimuli ([Delic et al., 1998](#)).

La protéine TP53 a un rôle important dans le processus pro-apoptotique induit par des irradiations ([Lowe et al., 1993](#)). Sa régulation est contrôlée, en partie, par le système ubiquitine protéasome dans les LB-LLC et sa dérégulation contribue à l'altération du mécanisme d'apoptose ([Masdehors et al., 2000](#)).

II.4.5.2. Prolifération des lymphocytes B de LLC

Différentes études ont permis de mettre en évidence la prolifération de LB-LLC et ont évalué son importance dans la leucémie.

En 2005, à la suite d'un marquage de l'ADN de cellules tumorales, une étude a mis en évidence l'existence d'une dynamique avec la présence de cellules en prolifération. Pour cela, un isotope stable non radioactif a été administré chez les patients sous forme d'eau lourde (2H₂O) afin de marquer l'ADN des cellules *in vivo* lors du cycle cellulaire. Cet isotope a ensuite été détecté dans le sang par spectrométrie de masse pour définir le taux de génération de cellules B. Ces données ont permis de mettre en évidence une prolifération dans les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Le pourcentage de nouveaux LB-LLC générés quotidiennement a été évalué entre 0,1 et 1,76%, ce qui représente plus de 10⁹ nouvelles cellules par jour. Une prolifération importante des LB-LLC est corrélée à une maladie évolutive et agressive. Une prolifération cellulaire a été observée chez certains

patients présentant une lymphocytose stable, ce qui prouve que toutes les cellules B de LLC ne présentent pas un défaut d'apoptose (taux de mortalité calculé pouvait atteindre 1% du clone leucémique par jour) ([Chiorazzi, 2007](#); [Messmer et al., 2005](#)).

La présence d'un clone activé est aussi objectivée par la présence de plusieurs marqueurs d'activation cellulaires comme le CD23, CD25, CD69 et CD38 ([Damle et al., 2002](#)). De plus, un taux de marqueur d'activation bien plus élevé a été retrouvé dans les formes agressives (présentant une IgVH NM) par rapport aux formes indolentes.

La prolifération de LB-LLC est également suggérée par l'analyse des télomères ([Damle et al., 2004](#)). Un raccourcissement des télomères confirme le déroulement d'une division cellulaire et par conséquent d'une prolifération cellulaire. Damle et son équipe, ont montré que la longueur des télomères de LB-LLC possédant des IgVH NM est inférieure à celle des télomères de LB-LLC avec des IgVH M. Ces derniers sont eux-mêmes plus courts par rapport aux télomères des LB sains (qu'il s'agisse de CD19+/CD5+ ou CD19+/CD5-). Le nombre de divisions des LB-LLC est d'autant plus important que la maladie est agressive. Cela est une nouvelle fois confirmé par la corrélation entre une forte activité télomérase et l'absence de mutations dans l'IgVH.

Par ailleurs, les expériences de Messmer, ont montré une augmentation des B-LLC marqués dans le sang périphérique plusieurs semaines après l'arrêt de l'administration d'eau lourde ([Messmer et al., 2005](#)). La prolifération lymphocytaire est donc suivie par une libération des lymphocytes en périphérie après une certaine période.

Cette prolifération des B-LLC a été mise en évidence dans les centres prolifératifs, également appelés « pseudo-follicules », au niveau des organes lymphoïdes ([Oppezzo and Dighiero, 2013](#)) où elles expriment fortement des marqueurs de prolifération comme le Ki67 ainsi que des molécules anti-apoptotiques comme la survivine et le BCL2 ([Granziero et al., 2001](#); [Schmid and Isaacson, 1994](#)).

Les lymphocytes en prolifération sont retenus dans ces centres prolifératifs grâce à la diminution du récepteur CXCR4 ([Calissano et al., 2011](#)). Cette étude montre également que les cellules CD5+/CXCR4dim prolifèrent davantage et expriment un profil transcriptionnel enrichi en gènes exerçant des fonctions prolifératives (comme diverses cyclines) et anti-apoptotiques (BCL6), contrairement aux cellules de la fraction périphérique non proliférative CD5dim/CXCR4^{fort}.

II.4.5.3. Rôle du microenvironnement

Le microenvironnement joue un rôle important dans de nombreux cancers. L'utilisation de cytokines ou de co-culture pour stimuler/activer des LB-LLC confirme le rôle du microenvironnement sur la balance apoptose/prolifération. La présence de nombreux récepteurs aux chimiokines

(interaction avec des facteurs solubles) ou encore l'interaction possible avec d'autres cellules (cellules stromales, cellules T) procurent une capacité non seulement de survie cellulaire mais également de prolifération ([Ten Hacken and Burger, 2016](#)). Toutes ces interactions avec les LB-LLC ont lieu majoritairement dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques. Ils permettent notamment la migration des cellules dans les centres prolifératifs ([Oppezzo and Dighiero, 2013](#)).

Dans le microenvironnement lymphoïde, des cellules stromales et des cellules monocytaires *Nurse-Like Cells* (NLC) expriment diverses molécules favorisant la survie et la prolifération des lymphocytes de LLC. Ces NLC sont des cellules dérivées de monocytes présentes dans la rate et les organes lymphoïdes secondaires qui maintiennent une meilleure survie cellulaire par l'intermédiaire de BAFF et de la molécule *A proliferation-inducing ligand* (APRIL) ([Burger et al., 2009a](#); [Burger et al., 2000](#)). La survie cellulaire est également favorisée par la liaison de CXCR4, exprimé par les cellules leucémiques, avec le CXCL12 (SDF-1) présent sur ces cellules NLC et les cellules stromales de la moelle osseuse ([Burger et al., 1999](#)).

D'autres cellules environnantes, comme les monocytes, par l'intermédiaire de CD31, augmentent la survie et la prolifération des B de LLC qui expriment le récepteur CD38. Cette liaison va induire l'expression du CD100, une sémaphorine permettant un maintien de la croissance cellulaire ([Deaglio et al., 2005](#)).

Enfin, l'interaction avec les cellules T, permise par la liaison du CD40 à la surface des LB et de son ligand, participe également à la prolifération et à la survie cellulaire par l'intermédiaire de la protéine survivine ([Granziero et al., 2001](#)).

II.4.6. Rôle du BCR dans la leucémogénèse

II.4.6.1. Présence d'une stimulation antigénique chronique

L'analyse des gènes VH utilisés par les lymphocytes de LLC montre l'existence d'une restriction des familles VH utilisées par ces cellules puisque la fréquence d'utilisation de certains gènes VH est plus importante dans les LB-LLC que dans les LB sains. Physiologiquement, les LB possèdent une très grande variabilité du répertoire immunitaire grâce à la diversité combinatoire des régions variables (VDJ) et la diversité jonctionnelle.

Une utilisation préférentielle des gènes VH 1-69 a été mise en évidence dans les LB-LLC avec IgVH NM et des gènes VH 4-34 dans les LB-LLC avec IgVH M ([Johnson et al., 1997](#); [Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004](#)). Au sein de la population suédoise, le gène VH (IGHV3-21) est retrouvé chez

11% des LLC ([Tobin et al., 2002](#)). L'association de gènes VH identiques et une similarité structurelle de la région de reconnaissance antigénique CDR3 (longueur et composition en acides aminés) permet de définir des BCR stéréotypés qui sont retrouvés dans 20 à 30% des lymphocytes de LLC ([Fais et al., 1998](#); [Messmer et al., 2004](#); [Stamatopoulos et al., 2007](#)). Une région CDR identique est retrouvée chez 1% des patients LLC.

A ce jour, environ 200 stéréotypes différents ont été mis en évidence. Parmi eux, 19 stéréotypes regroupent 10% des patients ([Vardi et al., 2014](#)).

Ces résultats suggèrent une sélection des LB-LLC par un nombre limité d'épitopes antigéniques et ces biais de répertoire des gènes VH associés à la présence de BCR stéréotypés suggèrent l'existence d'une stimulation antigénique à l'origine de la leucémogénèse.

Différents antigènes bactériens ou viraux pourraient être impliqués dans cette stimulation antigénique. Une réactivité des anticorps de LB-LLC a effectivement été retrouvée dirigée contre des cellules apoptotiques ou des agents bactériens ([Lanemo Myhrinder et al., 2008](#)).

Certains LB-LLC présentent une réactivité contre des antigènes du soi. Des études *in vitro* ont montré la présence d'auto-réactivité et de poly-réactivité d'anticorps recombinant issus de LB-LLC avec IgVH NM contrairement aux cellules présentant des IgVH M. Or, lors du rétablissement de ces anticorps non réactifs issus de cellules IgVH M dans des séquences germinales *in vitro*, celles-ci acquièrent une poly-réactivité similaire aux cellules IgVH NM ([Herve et al., 2005](#)).

La restriction du répertoire du BCR des LB-LLC peut être le résultat d'un mécanisme de sélection antigénique. Ces antigènes pourraient être à l'origine de l'expansion d'un précurseur des LB-LLC. Une stimulation antigénique chronique pourrait donc être à l'origine de la prolifération des lymphocytes de LLC.

Pour certains BCR stéréotypés, une signalisation cellulaire autonome et antigène-indépendant a été mise en évidence ([Duhren-von Minden et al., 2012](#)), activant les voies en aval du BCR et favorisant la prolifération ([Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004](#)).

II.4.6.2. Signalisation et réponse cellulaire anormale des LB-LLC

Les lymphocytes de la LLC sont caractérisés par une faible expression des immunoglobulines de surface ([Oppezzo and Dighiero, 2013](#)). Cette diminution pourrait être due à une anomalie de glycosylation entraînant un défaut dans le processus de transport de ces immunoglobulines à la membrane ([Oppezzo and Dighiero, 2013](#); [Vuillier et al., 2005](#)). Ceci pourrait également traduire un état d'anergie de ces cellules ([Packham et al., 2014](#)).

Les lymphocytes B issus de patients porteurs de LLC expriment à leur surface un BCR d'isotype IgM et IgD ([Dighiero et al., 1991](#)).

La fixation de l'antigène sur le récepteur induit une activation de l'immunoglobuline de surface et des molécules CD79 α /CD79 β possédant des motifs ITAM. Cette activation entraîne un ensemble d'activation/phosphorylation de kinases. La signalisation débute par l'activation des kinases Src (notamment LYN). Cela entraîne le recrutement de la tyrosine kinase SYK puis on assiste à une propagation du signal *via* le recrutement de kinases en aval (activation de 3 voies principales).

Les conséquences de l'engagement du BCR diffèrent entre les LB-LLC IgVH NM et les LB-LLC IgVH M. Les LB-LLC avec IgVH NM ont une meilleure capacité de mobilisation du calcium ainsi qu'une plus forte capacité de phosphorylation de la protéine SYK ([Mockridge et al., 2007](#)).

Certaines équipes ont suggéré que les LB-LLC mutés avaient une réponse à l'activation du BCR proche de celle du LB anergique ([Packham et al., 2014](#)). L'anergie est un mécanisme physiologique permettant de conserver des LB auto-réactifs lors des étapes de sélection négative médullaires, associé à une diminution d'expression de l'immunoglobuline de surface. Cette anergie peut être observée dans l'ensemble des LB-LLC mais se retrouve plus fréquemment au niveau des cellules possédant une **IgVH mutée** ([Mockridge et al., 2007](#); [Muzio et al., 2008](#); [Packham et al., 2014](#)).

Certains auteurs ont montré que seules les voies Ras/MAPK (facteur de transcription ERK) et PI3K/AKT étaient activées de façon limitée après activation du BCR. Cette diminution d'activation a pour conséquence une surexpression de protéines anti-apoptotiques ([Petlickovski et al., 2005](#)).

Une équipe a montré l'existence d'une activation autonome du BCR induisant la prolifération de LB-LLC contenant une région CDR3 stéréotypée et constituant une sous population particulière ([Duhren-von Minden et al., 2012](#)). Cette activation autonome serait due à une reconnaissance par le CDR3 de motifs peptidiques sur sa propre chaîne lourde (région FR2), induisant une dimérisation du BCR à la surface de ces LB-LLC. Le transfert d'un CDR3 stéréotypé sur un BCR sans capacité de signalisation est suffisant pour entraîner l'apparition d'un signal tonique autonome ([Burger and Chiorazzi, 2013](#); [Duhren-von Minden et al., 2012](#)).

Par ailleurs, différentes anomalies de signalisation ont été mises en évidence dans le LB-LLC. Parmi ces anomalies, on retrouve une augmentation de la phosphorylation de LYN ([Contri et al., 2005](#)), de SYK ([Gobessi et al., 2009](#)) ou de NF- κ B ([Hewamana et al., 2008](#)) qui par conséquent entraîne une signalisation du BCR amplifiée dans les LB-LLC en comparaison à la signalisation des LB issus de donneurs sains.

L'analyse des différents groupes de LLC et de leurs facteurs pronostics confirme le rôle essentiel de la kinase ZAP-70. Dans les formes agressives de la LLC (essentiellement IgVH NM), la présence de la protéine ZAP-70 entraîne une amplification de la cascade de signalisation en renforçant l'activation de SYK et la réponse au BCR ([Chen et al., 2008](#); [Gobessi et al., 2007](#)). Cette augmentation de l'activation de la voie SYK serait due à la séquestration d'inhibiteurs par la protéine ZAP-70 ([Chen et al., 2002](#)).

Les mécanismes d'interaction précis entre la protéine ZAP-70 et la protéine SYK restent aujourd'hui encore inconnus (Figure 10).

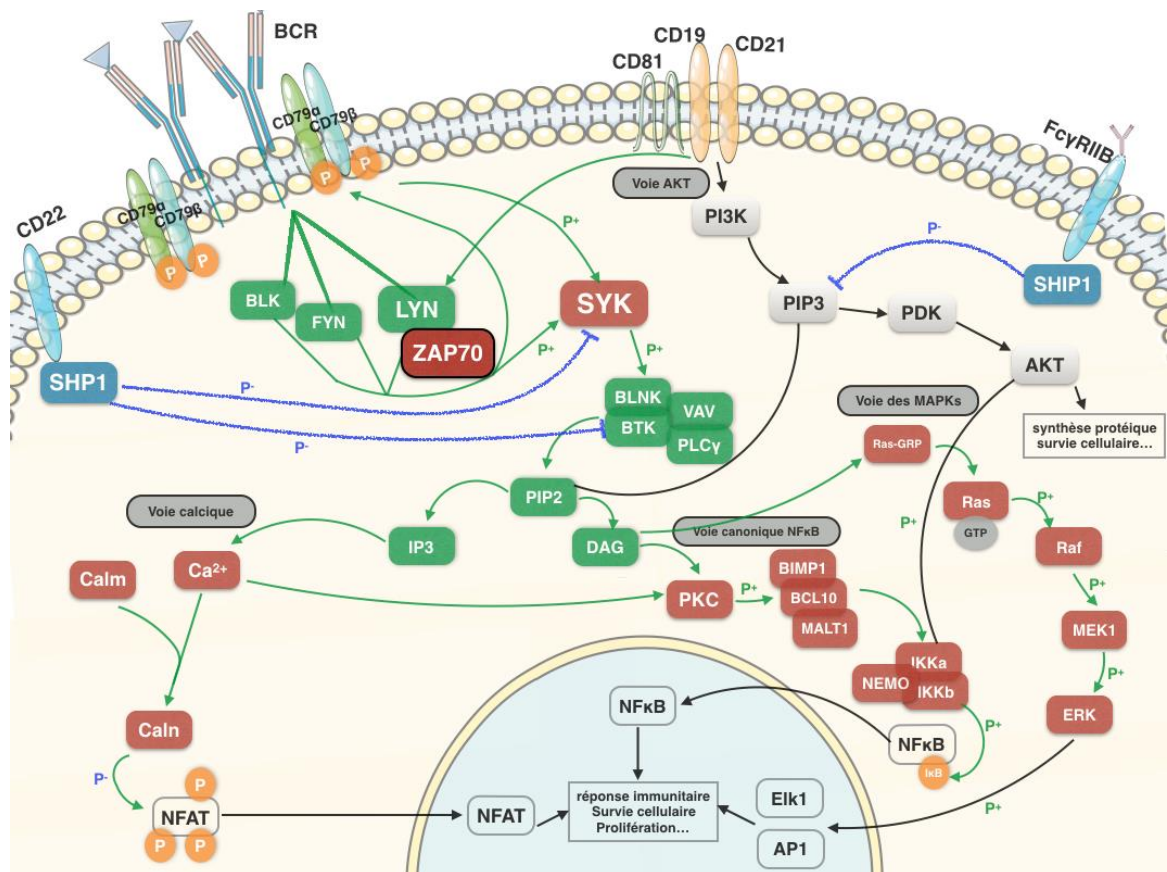


Figure 10 : Voies de signalisation activées suite à la stimulation du BCR d'un LB-LLC exprimant la protéine ZAP-70 (adaptée de ([Zhang and Kipps, 2014](#)))

II.4.7. Modèles murins de la LLC

Les modèles animaux sont cruciaux pour étudier une maladie, car ils permettent de tester les mécanismes physiopathologiques ainsi que l'efficacité de nouveaux traitements, en tenant compte des différences dues au changement d'espèce.

Aujourd'hui, plusieurs modèles murins présentant des lymphoproliférations B et se rapprochant de la LLC ont été proposés. La plupart de ces modèles tentent de reproduire les anomalies génétiques retrouvées dans la LLC. Parmi ces modèles, deux se rapprochent au mieux de la pathologie humaine : il s'agit du modèle spontané de la souris *New-Zealand Black* (NZB), reproduisant une lymphoprolifération indolente et d'une souris transgénique E μ -TCL1 proche des formes agressives de LLC ([Scaglione et al., 2007](#); [Simonetti et al., 2014](#)).

Les souris NZB sont un modèle murin présentant une lymphoprolifération B polyclonale spontanée accompagnée d'une production d'auto-anticorps IgM. A l'âge d'un an environ, ces souris développent une prolifération monoclonale de LB CD5+ présentant des IgVH non mutées et exprimant la protéine ZAP-70, comme les cellules de la LLC humaine de forme agressive ([Phillips et al., 1992](#); [Scaglione et al., 2007](#)). Par ailleurs, ces souris présentent une délétion équivalente à la délétion d'une partie du bras long du chromosome 13 chez l'Homme, entraînant la perte d'expression du miR-16.

Un modèle de souris transgénique a permis de reproduire, grâce à la Cre-recombinase, la délétion d'une partie du bras long du chromosome 13 (14qC3 chez la souris). Cette délétion entraîne la perte d'expression des miR-15 et -16. Ce modèle a permis de démontrer le lien entre la longueur de la délétion et l'agressivité de la pathologie ([Klein et al., 2010](#); [Lia et al., 2012](#)).

Un autre modèle murin permettant d'étudier la LLC est le modèle de souris transgénique E μ -TCL1 qui reproduit en partie le phénotype LLC. Le gène *T-Cell Leukemia 1* (*TCL1*) est surexprimé chez les patients présentant une forme agressive (IgVH NM/ZAP-70 pos) ([Herling et al., 2006](#)). L'expression du gène *TCL1* dans ces souris se traduit par une accumulation progressive de LB CD5+/IgM+ quiescents (bloqués en phase G0/G1). Après un an environ, cette expansion monoclonale envahit les organes lymphoïdes ([Bichi et al., 2002](#)). On retrouve également un biais de répertoire, comme pour les cellules humaines, avec des LB monoclonaux présentant des IgVH NM avec une utilisation préférentielle de certains gènes VH (11, 12 et 4) ([Yan et al., 2006](#)).

D'autres modèles murins reproduisant une surexpression de différents gènes mis en cause dans la LLC, comme le gène *Bcl2*, ont été proposés. La surexpression du gène codant la protéine anti-apoptotique *Bcl2* dans les souris BCL2xtraf2dn a permis de démontrer l'effet synergique de cette dernière avec une protéine similaire à TRAF1 surexprimée dans la LLC humaine ([Zapata et al., 2004](#)).

Ce modèle présente une mortalité importante des souris (80% à 14 mois) après le développement d'une lymphocytose et de pathologies liées à divers organes (splénomégalie, adénopathie, épanchement pleural).

Le développement de ces modèles peut aujourd'hui participer à une meilleure connaissance de la leucémogénèse mais ceux-ci sont parfois difficilement transposables à l'Homme. Par exemple, dans le modèle murin E μ -TCL1, il n'existe pas de sous-population B CD5+ présentant des mutations somatiques ([Simonetti et al., 2014](#)). Néanmoins, ces modèles sont physiologiquement pertinents et restent très utiles pour la compréhension de divers mécanismes et pour rechercher de nouveaux agents thérapeutiques ([Bresin et al., 2016](#)).

II.5. Modèles d'étude de la prolifération des LB-LLC *ex vivo*

Les cellules de LLC sont facilement accessibles du fait de leur circulation dans le sang périphérique mais elles sont difficilement cultivables en laboratoire. Malgré leur nature tumorale, les LB issus de patients porteurs de LLC ne prolifèrent pas spontanément *ex vivo* et entrent rapidement en apoptose en l'absence de stimulation ([Collins et al., 1989](#)).

Ainsi, après 3 jours de culture, 50% des LB-LLC subissent une apoptose spontanée ([Bernal et al., 2001](#); [Deglesne et al., 2006](#)).

Cette apoptose est observée pour l'ensemble des groupes de LLC (NM et M) avec néanmoins une apoptose plus élevée dès le premier jour de culture pour les cellules avec des IgVH Non mutées (21% vs 11% à J1). Cette différence est due à une inactivation rapide du signal tonique de NF- κ B et une diminution de l'expression de Bcl-2 dans ces cellules *ex vivo* ([Coscia et al., 2011](#)).

Les connaissances actuelles sur la pathogénèse de la LLC prédisent l'existence d'une stimulation antigénique chronique dans la leucémogénèse ([Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004](#)) et celle-ci semble essentielle à la survie et à la prolifération des LB-LLC *in vivo* ([Fabbri and Dalla-Favera, 2016](#)). D'autre part, l'auto-activation du BCR *in vivo* pourrait être responsable du maintien de la stimulation chronique dans certains sous-types de LLC ([Duhren-von Minden et al., 2012](#)).

Dans ces conditions, la mise en place d'un modèle de stimulation du BCR de LB-LLC *ex vivo* induisant une prolifération cellulaire est nécessaire pour étudier la physiopathologie de cette leucémie.

II.5.1. Activation *ex vivo* du récepteur à l'antigène du B-LLC

L'activation *ex vivo* du BCR par l'utilisation d'anticorps solubles induit un programme transcriptionnel et protéique spécifique des cellules LLC ([Perrot et al., 2011](#); [Vallat et al., 2007](#)) et l'absence de co-stimulation du BCR induirait une activation incomplète des voies MAPK et AP1 ([Petlickovski et al., 2005](#)).

De plus, l'activation isolée du BCR de LB-LLC *ex vivo*, par un anticorps anti-IgM soluble, renforce l'apoptose de ces cellules en culture. En effet, l'ensemble des études utilisant une stimulation isolée du BCR montre un déclenchement du mécanisme d'apoptose supérieur à l'apoptose spontanée ainsi qu'une absence totale de prolifération. Le taux d'apoptose, après 3 jours de stimulation, va de 32% à 77% pour une concentration d'anti-IgM de 5 μ g/ml à 10 μ g/ml ([Petlickovski et al., 2005](#); [Vallat et al., 2007](#); [Zupo et al., 2000](#)). Cette apoptose est plus élevée chez les patients présentant une forme agressive de LLC ([Petlickovski et al., 2005](#)).

Une seule équipe a observé une légère prolifération avec ce modèle. Cette étude rapporte une prolifération mise en évidence par un marquage du Ki67 (marqueur présent lors des stades G1/S/G2 et M du cycle) et présente 3 groupes de réponse. Un groupe non répondeur présentant un signal perturbé et une absence de flux calcique, un groupe avec une induction du cycle cellulaire (7/26 patients, 43% de Ki67 à J1, forte phosphorylation du facteur AKT) et une diminution d'apoptose (présence d'un flux calcique fort et prolongé ainsi qu'une forte activation de PI3K) et enfin un groupe de cellules entamant le processus d'apoptose. L'expression et la phosphorylation de la protéine ZAP-70 sont retrouvées uniquement dans les cellules entrant en apoptose ([Nedellec et al., 2005](#)).

L'utilisation d'anti-IgM immobilisé n'a pas d'effet sur la prolifération mais améliore la survie cellulaire. On observe une diminution de l'apoptose (5 à 10%) ([Deglesne et al., 2006](#); [Petlickovski et al., 2005](#)). Cette activation induit une signalisation complète et persistante dans les trois principales voies du BCR et s'accompagne de l'augmentation de protéines anti-apoptotiques, comme MCL1 ([Petlickovski et al., 2005](#)).

Toutes ces études montrent qu'une activation du BCR isolée est insuffisante pour entraîner une prolifération des LB-LLC car elle stimule l'apoptose des cellules. Une co-stimulation apparaît donc nécessaire pour induire une prolifération des LB-LLC *ex vivo*.

II.5.2. Activation *ex vivo* par l'utilisation de signaux de co-stimulation du LB-LLC

Comme pour les modèles d'activation des LB physiologiques, on retrouve un grand nombre de modèles reproduisant la collaboration entre le LB et le LTh.

II.5.2.1. *Activation du LB-LLC par des cytokines produites par les LT*

La collaboration LB/LTh se fait par le contact entre le CD40 et son ligand CD40L. L'activation *ex vivo* du récepteur CD40 à la surface des LB avec du CD40L soluble entraîne une faible prolifération avec taux inférieur à 10% des cellules en phase S ([Ahearne et al., 2013](#)) et diminue l'apoptose par deux après 3 ou 4 jours ([Bhattacharya et al., 2015](#); [Granziero et al., 2001](#)) grâce à la mobilisation de différents gènes, comme le proto-oncogène *MYC* ([Furman et al., 2000](#)).

Cette diminution de la mortalité cellulaire est retrouvée principalement chez les patients avec des IgVH NM (taux de 20% contre 60% dans les cellules non stimulées après 7 jours de stimulation) ([Coscia et al., 2011](#)).

De plus, la stimulation par le CD40L induit une expression du récepteur à l'IL-21 à la surface du lymphocyte B ([Coscia et al., 2011](#); [de Toter et al., 2006](#)).

Au-delà de l'interaction CD40/CD40L, plusieurs interleukines produites par le LTh agissent sur l'activation du LB.

L'IL-4 permet principalement d'obtenir une meilleure survie cellulaire en divisant l'apoptose par deux ([Dancescu et al., 1992](#)). Cet effet anti-apoptotique ne semble pas influencé par l'état mutationnel ([Coscia et al., 2011](#)). Cette interleukine protège de l'apoptose en stimulant la voie Jak3/STAT6 et en augmentant l'expression des protéines anti-apoptotiques MCL1 et BCL2 ([Aguilar-Hernandez et al., 2016](#); [Ruiz-Lafuente et al., 2014](#); [Steele et al., 2010](#)). Une étude publiée en 1993 montre même une survie des LC-LLC jusqu'à 3 semaines après stimulation par l'IL-4 ([Panayiotidis et al., 1993](#)).

L'IL-21, autre interleukine produite par les LTh, va activer la voie JAK/STAT1-3-5 et possède un rôle pléiotrope avec une action sur la prolifération et la différenciation ([Spolski and Leonard, 2014](#)).

L'IL-21 induit l'apoptose du LB-LLC lorsqu'elle est utilisée seule, avec un effet dose-dépendant ([de Toter et al., 2008](#); [de Toter et al., 2006](#)). En association avec l'IL-15, l'IL-21 induit une légère prolifération (inférieure à 2000 cpm dans un test utilisant la thymidine tritiée) mais celle-ci vient contre-balancer l'effet anti-apoptotique de l'IL-15 ([de Toter et al., 2008](#)).

Un très grand nombre de cytokines ont été testées de manière isolée et la plupart, comme l'IL-13 ([Chaouchi et al., 1996](#)), n'entraînent aucune prolifération. Seulement deux interleukines utilisées isolément peuvent entraîner une prolifération.

L'IL-15 possède également un rôle dans la prolifération des LB-LLC (2085 cpm contre 216 cpm pour les cellules non stimulées après 5 jours) ([de Toter et al., 2008](#); [Trentin et al., 1996](#)).

L'IL-2 pourrait aussi participer à la prolifération de ces cellules (entre 3000 cpm et 7000 cpm contre 500 à 1500 cpm pour la condition non stimulée) ([Chaouchi et al., 1996](#); [Karray et al., 1988](#); [Mainou-Fowler et al., 1995](#)), mais cet effet n'a pas été confirmé dans d'autres études, malgré l'utilisation d'une large gamme de concentration ([Touw et al., 1987](#); [Trentin et al., 1996](#)).

Différentes équipes ont analysé l'effet de l'association de ces différentes cytokines. L'association d'IL-4 ([Karray et al., 1988](#)) ou d'IL-13 ([Chaouchi et al., 1996](#)) inhibe la prolifération induite par l'IL-2, alors que l'ajout d'IL-15 augmente cette prolifération (dose dépendance des deux IL) ([Trentin et al., 1996](#)).

Des modèles de stimulation associant le CD40L soluble à différentes interleukines ont été proposés.

L'association du CD40L avec l'IL-2 ou l'IL-13 ne permet pas d'induire la prolifération lymphocytaire ([Chaouchi et al., 1996](#)).

Le CD40L soluble associé à l'IL-4 diminue l'apoptose (mortalité de 20%) ([Coscia et al., 2011](#)) et permet une prolifération des LB-LLC après 7 jours de culture. Cette prolifération reste limitée avec une réponse de la moitié des patients testés et un taux de cellule en phase S inférieur à 20% mesuré à l'aide de bromodésoxyuridine (BrdU) ([Ahearne et al., 2013](#); [Chaouchi et al., 1996](#)).

La combinaison de cytokines permettant d'obtenir la meilleure prolifération associée du CD40L soluble, de l'IL-4 et de l'IL-21 ([Ahearne et al., 2013](#)). Celle-ci permet d'induire le passage de plus de 30% des LB-LLC en phase S.

Une stimulation du récepteur CD40 induit l'expression du récepteur à l'IL-21 à la surface des LB-LLC ([de Toterò et al., 2006](#)). Une prolifération plus importante est donc obtenue si l'apport d'IL-21 est réalisé après une pré-incubation de 24h avec du CD40L et de l'IL-4 ([Ahearne et al., 2013](#); [Saito et al., 2008](#)).

La co-stimulation associant le CD40L, l'IL-4 et l'IL-21 montre l'importance du microenvironnement et des LT. Le rôle des LTh folliculaires présents dans les centres prolifératifs semble également primordial ([Caligaris-Cappio, 2003](#); [Herishanu et al., 2011](#)).

II.5.2.2. Activation du LB-LLC par le récepteur à l'antigène associée aux cytokines T

L'activation isolée du récepteur à l'antigène induit l'apoptose des cellules primaires de LLC *ex vivo*. Néanmoins, les effets de différentes cytokines T associées à l'activation du BCR ont été étudiés par plusieurs équipes ([Chaouchi et al., 1996](#)). L'association d'anti-IgM avec de l'IL-4 ou de l'IL-13 n'induit pas de prolifération. Cependant, on observe une prolifération *ex vivo* après 3 jours, lors de l'activation du BCR combinée à l'IL-2 (40000 cpm pour les cellules stimulées contre 1500 cpm pour celles non stimulées).

L'association d'une activation du BCR avec une stimulation par du CD40L soluble ne permet pas de faire proliférer les LB-LLC mais participe à une amélioration de la survie cellulaire avec une apoptose divisée par 3 après 48h de stimulation ([Bernal et al., 2001](#)). L'inhibition de l'activité caspase, l'activation de NF- κ B et la surexpression de protéines anti-apoptotiques (MCL1, BCL2, BFL-1) permettent d'inhiber l'apoptose dans ces conditions.

II.5.2.3. Activation du LB-LLC par le récepteur TLR9

Plusieurs équipes utilisent la voie du TLR9 pour induire une prolifération des LB-LLC. Le récepteur TLR9, qui reconnaît l'ADN double brin hypométhylé au niveau des motifs CpG, a une action sur le cycle cellulaire et un effet prolifératif sur le LB ([Good et al., 2006](#); [Peng, 2005](#)).

Différentes études mettent en évidence des réponses hétérogènes lors de l'activation de cette voie dans les LB-LLC avec une induction d'apoptose, une survie cellulaire ou une prolifération. La capacité de la cellule à activer la kinase SYK et l'absence de mutations sont tous deux des facteurs prédictifs de la réponse au CpG-ADN. La phosphorylation de SYK va induire une activation de la voie MAPK aboutissant au facteur de transcription ERK, commun avec la voie du BCR et participant à la prolifération cellulaire. Il existerait alors un effet synergique entre la voie du BCR et la voie TLR9 ([Chatzouli et al., 2014](#)). On observe une prolifération plus importante si la protéine ZAP-70 est présente et si la cellule présente des IgVH NM ([Decker et al., 2000](#); [Longo et al., 2007](#); [Tromp et al., 2010](#); [Wagner et al., 2016](#)).

Cela semble en contradiction avec des résultats publiés en 2013 où les cellules issues de patients présentant une LLC non progressive et des IgVH M prolifèrent davantage ([Ghalamfarsa et al., 2013](#)).

L'observation qui ressort d'un grand nombre d'études est qu'un traitement *ex vivo* au CpG-ADN va entraîner une forte diminution de la viabilité et ce dès le premier jour de culture suite à une augmentation du clivage de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et de l'activation de la caspase 8 (casp8) ([Chatzouli et al., 2014](#)). Après 5 jours de stimulation, plus de 70% des cellules sont en apoptose. De plus, l'action du CpG-ADN induit des modifications morphologiques, comme une augmentation de la taille cellulaire et une augmentation du cytoplasme basophile, ainsi qu'une altération de la production de cytokines ([Liang et al., 2010](#)).

La stimulation de la voie TLR9 en combinaison avec différents cytokines T est fréquemment décrite dans la littérature.

Le CpG-ADN combiné à l'IL-2 provoque une forte prolifération (84% de CFSEdim à 7 jours) d'une population de cellules LLC majoritaires. Alors que les cellules « side-population », présentant les marqueurs de la maladie ainsi qu'une résistance aux traitements prolifèrent à un taux de 30% après 7 jours de culture ([Gross et al., 2010](#)).

L'association du CpG-ADN et de l'IL-21 a montré un effet prolifératif sur des cellules n'exprimant pas le marqueur CD38 ou des cellules avec des IgVH M et n'exprimant pas la protéine ZAP-70 ([Ghalamfarsa et al., 2013](#)).

En 2015, la combinaison du CpG-ADN à l'IL-15 a démontré son fort potentiel avec une prolifération analysée en CFSE qui se situait entre 70 et 90% après 6 jours de culture ([Mongini et al.,](#)

[2015](#)). Il existe une corrélation entre une forte réponse proliférative et la diminution de la survie cellulaire : plus il y a de prolifération, plus on observe de cellules en apoptose.

II.5.3. Activation du LB-LLC par l'utilisation de co-cultures

La grande majorité des modèles *ex vivo* retrouvés dans la littérature proposent des systèmes de co-culture associant les LB-LLC à d'autres cellules comme des LT, des cellules stromales ou des fibroblastes.

Actuellement, il reste difficile d'obtenir une prolifération robuste des LB-LLC primaires.

Ces modèles induisent une stimulation continue et non contrôlée. Cela rend difficile la mise en évidence des acteurs indispensables de la prolifération. En effet, l'utilisation de co-cultures entraîne la présence d'un grand nombre de facteurs non désirés et rend ainsi très difficile les études des facteurs importants ([Lutzny et al., 2013](#)). D'où la nécessité de mettre en place un modèle le plus simple possible avec un nombre de facteurs minimaux et connus.

II.5.3.1. *Co-culture de cellules souches de moelle osseuse (BMSC)*

Les cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC) fournissent un support fonctionnel et structural aux cellules hématopoïétiques.

La co-culture de LB-LLC et de BMSC de donneurs sains ([Lagneaux et al., 1998](#); [Panayiotidis et al., 1996](#)) ou autologues ([Coscia et al., 2011](#)) augmente la survie cellulaire. Paradoxalement, la co-culture de LB sains et de BMSC entraîne une apoptose ([Lagneaux et al., 1998](#)).

Des expériences de co-culture utilisant des membranes, afin d'empêcher tout contact entre les deux types cellulaires, ont montré que le contact cellulaire est indispensable pour permettre une diminution de l'apoptose. En effet lors d'un contact direct entre ces cellules, l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2 est maintenue ([Lagneaux et al., 1998](#)). Cette diminution de l'apoptose est observée pour les cellules IgVH NM et M. Le taux d'apoptose diminue jusqu'à 5% après 7 jours chez les patients M ([Coscia et al., 2011](#)).

L'ajout de cytokines à ce modèle de co-culture a été décrit dans la littérature. La co-culture de BMSC associée à du CD40L soluble, de l'IL-10 et de l'IL-2 permet d'induire une entrée dans le cycle cellulaire avec 8% des cellules en phase S-G2/M à 3,5j. Cette réponse est essentiellement observée avec des cellules exprimant ZAP-70 ([Plander et al., 2009](#)).

Un autre modèle associe des BMSC avec du CD40L soluble et du CpG-ADN. Ce cocktail montre une faible prolifération avec 11% de Ki67 après 3 jours. Comme dans la stimulation utilisant le CpG-ADN, on constate une diminution de la survie cellulaire et donc une perte du bénéfice des BMSC avec 80 % d'apoptose à J3 ([Purroy et al., 2014](#); [Purroy et al., 2015](#)).

II.5.3.2. Co-culture de lymphocytes T activés

Quelques équipes ont également utilisé des modèles composés, non plus de BMSC mais d'une co-culture de LT autologues et ont mis en évidence une faible prolifération inférieure à 20% de CFSEdim. Ces résultats corrélaient avec la présence de cellules exprimant fortement le marqueur CD38 (CD38high) ([Patten et al., 2008](#)). Ce modèle a permis de mettre en évidence l'induction d'un groupe de gènes participant au cycle cellulaire ([Pascutti et al., 2013](#)).

L'ajout de cytokines comme l'IL-2 ou de CpG-ADN n'induit pas plus de 25% de cellules en phase S après 5 jours de culture ([Os et al., 2013](#)).

II.5.3.3. Co-culture de cellules fibroblastiques

Elles utilisent le plus souvent des cellules fibroblastiques murines comme les cellules nourricières : 3T3.

Ces cellules sont souvent transfectées afin d'exprimer le CD40L qui dans ces conditions (donc non soluble) est présenté directement aux récepteurs CD40 à la surface du LB. Cette approche permet un gain de survie cellulaire avec une augmentation de nombreuses protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, FLIP et Survivine ([Hamilton et al., 2012](#); [Kater et al., 2004](#)). On retrouve également un léger avantage prolifératif en présence de ces fibroblastes ([Pascutti et al., 2013](#)) et essentiellement sur les cellules IgVH NM ([Tromp et al., 2010](#)). Sur une période de 21 jours, 2 à 3 générations de cellules ont été observées ([Hamilton et al., 2012](#)).

La présence de fibroblastes au contact des LB entraîne également une augmentation de nombreux autres marqueurs comme le CD54, CD80, CD86, CD70, CD95 ([Kater et al., 2004](#)) et ZAP-70, CD11c et CD38 ([Hamilton et al., 2012](#)).

D'autres équipes ont associé cette co-culture de fibroblastes 3T3 avec diverses cytokines. L'utilisation de 3T3 associée à une activation du BCR avec un anti-IgM soluble n'entraîne pas plus de 20% de prolifération (CFSE) après 6 jours ([Pascutti et al., 2013](#)).

L'utilisation d'autres cytokines comme l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-15 a montré une faible, voire aucune, induction de prolifération ([Pascutti et al., 2013](#)). Cependant, une bonne prolifération après 3

jours de culture est observée si on associe l'IL-15 aux 3T3 (12 000cpm contre <2000cpm en condition non stimulée) ([de Toterò et al., 2008](#); [de Toterò et al., 2006](#)).

L'IL-21 associée avec une co-culture de 3T3 et une activation du BCR ([Pascutti et al., 2013](#)) ou non ([Pascutti et al., 2013](#); [Thijssen et al., 2016](#)) permet d'obtenir une forte prolifération de LB-LLC (>75% en CFSE) et une moyenne de 5 générations cellulaires après 6 jours.

L'ajout de CpG-ADN à la co-culture permet d'obtenir une prolifération modérée (7500 cpm contre 2500 cpm pour la co-culture seule) ([Decker et al., 2000](#)) et est en faveur d'une plus forte réponse des cellules IgVH NM. Cela serait dû à une différence de signalisation de la voie NF-κB ainsi qu'au maintien de p52 et BclXL dans ces cellules ([Tromp et al., 2010](#)).

L'association d'une double co-culture avec l'utilisation de 3T3 et de LT autologues activés a permis d'obtenir une faible prolifération avec une induction du cycle cellulaire au troisième jour s'élevant à 11% (Ki67). Dans ce modèle, deux marqueurs semblent se distinguer et ont été proposés comme marqueurs de prolifération, le CD80 et le CD86 ([Asslaber et al., 2013](#)).

D'autres types cellulaires en co-culture ont été testés comme les « nurse-like cells », des cellules stromales du sang exprimant le facteur CXCL1 (SDF1) et favorisant la survie cellulaire ([Burger et al., 2000](#); [Filip et al., 2015](#); [Tsukada et al., 2002](#)). Les cellules épithéliales mammaires humaines (HMEC1) ([Buggins et al., 2010](#); [Hamilton et al., 2012](#)) permettent également de maintenir les LB LLC en culture au-delà de 14 jours.

D'autres fibroblastes murins (L-cells CD31+) induisent une légère prolifération grâce à l'interaction CD38/CD31 permettant une augmentation du CD100 et ainsi une survie associée à une prolifération ([Deaglio et al., 2005](#)).

Ces modèles associant une culture de LB-LLC à d'autres types cellulaires permettent de reproduire fidèlement les conditions physiopathologiques. Néanmoins, ces modèles sont responsables d'une stimulation continue impliquant de nombreux facteurs.

III. Réponse transcriptionnelle et protéomique des LB-LLC après activation du BCR

III.1. Analyse transcriptionnelle et protéomique

Toutes les cellules de l'organisme sont en contact permanent avec leur environnement. Ces contacts permettent aux cellules de fournir une réponse adaptée en cas de modifications des signaux recueillis ([Yosef and Regev, 2011](#)). Une stimulation d'un récepteur cellulaire induit, dans la majorité des cas, des cascades de signalisation aboutissant à l'activation de différents facteurs de transcription. L'activation de certains gènes induit la synthèse de protéines qui seront le support de la réponse cellulaire. Cette cascade transcriptionnelle et protéomique forme un réseau de régulation qui peut être considéré comme un programme génique et protéique cellulaire ([Lee et al., 2002](#); [Luscombe et al., 2004](#)).

Le programme cellulaire induit dans une cellule dépend de nombreux facteurs comme l'origine des stimuli ou encore la durée et la force de la stimulation ([Damdinsuren et al., 2010](#)). Une stimulation cellulaire conduit à l'expression coordonnée de nombreux gènes. On assiste rapidement, en quelques minutes ou quelques heures, à l'expression des premiers gènes appelés « gènes de réponse précoce » ([Damdinsuren et al., 2010](#); [Fowler et al., 2013](#)).

Dans certaines pathologies, des anomalies géniques peuvent perturber ces programmes cellulaires. L'étude de la structure des réseaux de régulation transcriptionnelle est essentielle dans la compréhension du mécanisme des pathologies et dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

La plupart des études comparent les différences transcriptionnelles et protéomiques basales entre les LB-LLC et les LB sains ([Aalto et al., 2001](#); [Casellas et al., 2001](#); [Jelinek et al., 2003](#); [Rosenwald et al., 2001](#); [Stratowa et al., 2001](#)) ou uniquement à un temps donné après l'activation du LB *ex vivo* par anti-IgM ([Herishanu et al., 2011](#)), par IL-4 ([Ruiz-Lafuente et al., 2014](#)) ou encore lors d'une co-culture ([Burger et al., 2009b](#); [Filip et al., 2015](#); [Pascutti et al., 2013](#)). On trouve cependant très peu de données de cinétique transcriptionnelle après activation du récepteur à l'antigène ou uniquement à deux temps après l'activation du BCR ([Guarini et al., 2008](#); [Pede et al., 2013](#); [Tavolaro et al., 2015](#)).

Les gènes différentiellement exprimés (DE) dans les LB-LLC après activation du BCR *in vitro* sont essentiellement des gènes de la prolifération tumorale, de la signalisation du BCR et de l'apoptose. Herishanu et son équipe ont observé 60 gènes surexprimés 6 heures après l'activation ([Herishanu et al., 2011](#)). Les gènes liés aux voies du BCR sont les plus représentés avec des gènes

activés par NF- κ B, comme la cycline *CCND2* (cycle cellulaire), le gène codant pour une protéine anti-apoptotique *BCL2A1*, ou encore des gènes codant des protéines qui régulent le signal du BCR (*DUSP2*). La forte surexpression du proto-oncogène *MYC*, qui a un rôle crucial dans le cycle cellulaire et l'apoptose, a également été mise en évidence dans les LB-LLC ([Pede et al., 2013](#)).

Notre groupe a analysé la cinétique d'expression de LB-LLC à 4 temps après activation du BCR (6 premières heures) ([Perrot et al., 2011](#); [Vallat et al., 2007](#)). Cette étude a mis en évidence l'induction d'un programme génique spécifique des LB-LLC à la suite d'une activation *in vitro* du BCR ([Vallat et al., 2007](#)) ainsi qu'une dynamique d'expression protéique spécifique ([Perrot et al., 2011](#)) avec la mise en évidence d'un grand nombre de gènes (426) différentiellement exprimés (DE) entre les LB-LLC et les LB sains.

La comparaison des profils d'expressions entre LLC NM et LLC M a mis en évidence une vingtaine de gènes dont le celui codant la protéine ZAP-70 ([Casellas et al., 2001](#); [Ferrer et al., 2004](#); [Haslinger et al., 2004](#); [Rosenwald et al., 2001](#)). Cette différence transcriptionnelle entre les LLC NM et LLC M est retrouvée au niveau protéique ([Perrot et al., 2011](#)).

Parmi les gènes DE entre les LB de la forme agressive et indolente, certains sont spécifiques de l'état mutationnel, notamment *OAS3*, *LPL* et *GF11* qui sont surexprimés dans des cellules LLC IgVH NM et *CCL4* et *EGR3* qui sont surexprimés dans les cellules IgVH M ([Herishanu et al., 2011](#)). Dans les analyses transcriptionnelles réalisées après activation du BCR, la différence transcriptionnelle entre ces deux formes s'observe dès la sixième heure de stimulation et est accentuée après 24h. On identifie alors des gènes codant des protéines ayant des fonctions de transduction du signal, de transcription ou de cycle cellulaire qui sont surexprimés dans les cellules IgVH NM ([Guarini et al., 2008](#)).

Après stimulation du BCR par un anti-IgM, on observe un profil d'expression des miRNAs particulier dans les LB-LLC en comparaison des LB sains. On retrouve 24 miRNAs DE puis 16 miRNA DE après 24 et 48h d'activation respectivement ([Tavolaro et al., 2015](#)). Deux miRNAs majeurs, miR-132 et miR-212, sont associés aux formes agressives de LLC. Les principales cibles de ces miRNA sont *RB/E2F*, essentiel dans la régulation du cycle cellulaire et le gène *TP53* régulant l'apoptose.

Pour l'étude des LB-LLC, les mêmes modèles d'activation *in vitro* à base de co-culture de fibroblastes, de LT activés ([Pascutti et al., 2013](#)) ou de cellules NLC ([Filip et al., 2015](#)) ont également été utilisés. L'ensemble de ces études montre une surexpression de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose, avec la surexpression de gènes anti-apoptotiques, et dans la régulation du cycle cellulaire.

L'activation par l'IL-4 soluble a permis de mettre en évidence 54 gènes exprimés spécifiquement dans les LB-LLC. De plus, l'expression de ZAP-70 influence la réponse transcriptionnelle des LB-LLC après activation du BCR ([Ruiz-Lafuente et al., 2014](#)).

III.2. Reconstruction des réseaux d'interactions de gènes

Définir et modéliser les réseaux d'interactions géniques et protéiques qui conditionnent la réponse cellulaire représente un enjeu indispensable pour mieux comprendre et agir sur ces systèmes complexes.

Une collaboration entre deux disciplines, la biologie et les mathématiques, est nécessaire pour analyser ces programmes cellulaires.

Analyser un réseau dans sa globalité exige d'identifier, dans un premier temps, l'ensemble des acteurs du système puis les interactions qui surviennent suite aux variations des conditions environnementales ([Bray, 2003](#)). Ensuite, ceci nécessite de prendre en compte la dynamique du système, c'est à dire le mécanisme permettant le passage d'un état d'équilibre à un état activé après perturbation (étude des changements au cours du temps). La description du système qui en découle permet de le contrôler en induisant des modifications orientées (déterminer les acteurs qui ont le plus grand effet et redéfinir le système qui consiste à agir sur celui-ci pour le faire évoluer) ([Kitano, 2002a, b](#)).

Comme nous venons de le mentionner dans la partie précédente, suite à une stimulation, le BCR va induire des cascades de signalisation composées de nombreux acteurs. L'expression de ces acteurs, dont font partie les facteurs de transcription, est coordonnée dans le temps. L'expression rapide et transitoire de certains facteurs de transcription induit l'expression de gènes plus tardifs. Cette cascade va aboutir à la transcription de gènes responsables de la réponse cellulaire adaptée au stimulus ([Yosef and Regev, 2011](#)).

Pour modéliser ces réseaux, différentes approches sont possibles. Il n'existe pas de méthode standard car chaque approche répond à différentes hypothèses et possède sa spécificité ([Marbach et al., 2010](#)).

Plusieurs méthodes d'inférence de réseau de régulation ont ainsi été proposées ([Bar-Joseph et al., 2012](#); [de Jong, 2002](#); [He et al., 2009](#); [Hecker et al., 2009](#)). Des approches adaptées à l'analyse de données d'expression temporelle sont possibles.

On retrouve essentiellement trois modèles permettant d'effectuer des inférences à partir de données d'expression génique dynamiques ([Bansal et al., 2007](#)) :

- Les modèles théoriques d'information basés sur l'étude de la proximité des gènes permettent de définir un coefficient de corrélation ([Jang et al., 2013](#); [Schafer and Strimmer, 2005](#)). Cependant, cette méthode uniquement descriptive, ne permet pas de réaliser des prédictions.

- Les méthodes d'optimisation, utilisant des scores et des algorithmes pour définir le réseau le mieux adapté, sont peu efficaces et montrent leurs limites avec un grand nombre de données.
- Les méthodes de régression ou les équations différentielles ([Gardner et al., 2003](#)), nécessitent d'établir préalablement une structure sous-jacente du réseau. Elles sont très flexibles et possèdent la capacité d'effectuer des prédictions, c'est à dire, de déterminer, à l'aide de la modélisation, les acteurs ayant le plus d'influence dans le réseau.

Les données d'expression génique doivent être, dans un premier temps, normalisées ([Law et al., 2014](#)). Ensuite, il convient de déterminer les gènes différentiellement exprimés sur un ou plusieurs temps. Divers logiciels d'analyse de données d'expressions sont proposés : *Linear Models for MicroArrays data* (LIMMA) ([Ritchie et al., 2015](#); [Smyth, 2005](#)) qui utilise un modèle linéaire, *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) basé sur la permutation de l'expression génique, ou encore *Extraction of Differential Gene Expression* (EDGE) basé sur la structure temporelle des données (expression au cours du temps) ([Leek et al., 2006](#)).

L'étape d'inférence (ou d'ingénierie inverse) permet de rechercher, grâce à l'utilisation d'algorithmes et des données d'expression, les liens statistiques entre les différents gènes ou protéines ([Bansal et al., 2007](#)). Cette étape permet d'établir un modèle permettant la reconstruction du réseau de gènes, ajusté avec les données expérimentales biologiques (données d'expression) ([de Jong, 2002](#); [Kitano, 2002b](#)).

Notre équipe a utilisé une approche de modélisation statistique pour rechercher les meilleures cibles transcriptionnelles à moduler pour contrôler ces programmes géniques et protéomiques. Pour cela, des mathématiciens ont développé une méthode basée sur une régression linéaire précédée par une étape de regroupement (clustering) afin d'étudier le programme génique induit par cette stimulation dans ces cellules (Jung et al. 2014). Cette étape repose sur l'analyse de l'évolution de l'expression génique au cours du temps, ce qui permet un regroupement des gènes en fonction de leur profil d'expression et donc au moment de leur plus forte activité. De plus, ce regroupement repose sur l'hypothèse que des gènes possédant des profils d'expression comparables sont susceptibles d'être fonctionnellement liés.

Ce modèle a été utilisé pour prédire les effets d'une intervention sur le réseau de régulation génique des LB-LLC ; la validation biologique de ces prédictions a ensuite prouvé la faisabilité de cette approche (Vallat et al. 2013). Cette méthode permet de prévoir les changements d'expression génique après une intervention biologique sur des gènes clés (en utilisant la technologie du silencing par transfection de siARN).

Objectifs du travail de Thèse

Une cellule reçoit en permanence d'innombrables signaux provenant de son environnement. Cette stimulation entraîne une cascade d'activation qui a pour cible des facteurs de transcription qui activent un programme génique et protéomique responsable du comportement cellulaire. Ces programmes peuvent être altérés dans les pathologies cancéreuses. L'étude de la réponse de ces cellules à des stimulations de l'environnement *ex vivo* permet d'évaluer l'altération de ces programmes géniques et protéomiques.

L'objectif de notre équipe est de répondre à deux questions essentielles : **Peut-on caractériser ce programme génique et protéomique tumoral ? Est-il possible d'intervenir de façon dirigée sur ce programme afin de le moduler ?**

Des anomalies de l'expression de nombreux gènes et protéines ont été mis en évidence dans les cellules cancéreuses, mais les réseaux de régulation de ces gènes et des protéines qu'ils codent sont encore mal caractérisés.

Notre étude porte sur la leucémie lymphoïde chronique. Les mécanismes de cette pathologie associent une prolifération clonale de lymphocytes B matures et un défaut du mécanisme d'apoptose. Le récepteur à l'antigène du LB (BCR) joue un rôle fondamental dans la pathogénèse de la maladie et il est admis aujourd'hui qu'une stimulation antigénique chronique favorise la prolifération lymphocytaire leucémique.

La réponse cellulaire qui fait suite à cette activation du BCR des cellules leucémiques a été étudiée dans différents modèles et notamment lors des études préliminaires de l'équipe ([Perrot et al., 2011](#); [Vallat et al., 2007](#)). Ces travaux ont permis de mettre en évidence une réponse transcriptionnelle et protéomique spécifique des LB-LLC. Cependant, la stimulation cellulaire qui a été utilisée dans ces études n'induit aucune prolifération contrairement à ce que l'on observe *in vivo*.

Afin d'étudier le programme cellulaire soutenant la prolifération des LB-LLC, il est tout d'abord indispensable de mettre en place un modèle de stimulation induisant une prolifération *ex vivo* des LB-LLC. Cependant, les LB issus de patients porteurs d'une LLC prolifèrent difficilement en culture et entrent en apoptose spontanément. Aucun modèle de prolifération ne fait aujourd'hui consensus et les différents protocoles associent classiquement l'utilisation d'autres types cellulaires en co-culture. Ces différents modèles rendent difficiles les analyses de programme cellulaire et toute modélisation statistique puisque la présence persistante de ces cellules nourricières entraîne une activation continue de LB et ne permet pas de synchroniser l'ensemble des LB-LLC.

Dans la première partie de ma thèse, je me suis employé à **mettre en place des conditions d'activation du BCR *ex vivo* induisant une prolifération de LB-LLC primaires**. Le but a donc été de trouver les conditions optimales pour induire une prolifération tout en se rapprochant au mieux des conditions physiopathologiques.

Le modèle d'activation *ex vivo* des LB-LLC primaires mis en place permet d'induire la prolifération de lymphocytes primaires de LLC en culture. Ce modèle simple, impliquant une activation du BCR, associe une co-stimulation avec le CD40L, l'IL-4 et l'IL-21 soluble. Cette stimulation permet de distinguer deux groupes de patients : ceux dont les lymphocytes répondent et prolifèrent et ceux qui ne répondent pas à la stimulation.

La mise en place de ces conditions de culture m'a ensuite permis d'aborder le second objectif de ma thèse qui est d'**analyser les réponses transcriptionnelles et protéomiques dynamiques induites lors de la prolifération de LB issus de patients porteur de la forme agressive de LLC.**

Grâce à une collaboration avec une équipe de mathématiciens et au développement d'outils statistiques, une inférence conjointe de la réponse transcriptomique et protéomique a été réalisée afin de décrire les réseaux de régulation cellulaire des LB-LLC qui prolifèrent.

La caractérisation des altérations de cette réponse lymphocytaire tumorale permet une meilleure connaissance des aberrations des programmes cellulaires dans la LLC. Ce travail a permis de mettre en évidence des acteurs clés du programme soutenant la prolifération lymphocytaire et ainsi de proposer des cibles potentielles pour moduler le programme génique des formes tumorales les plus agressives pour tenter de réduire leur phénotype. A travers cette approche, transposable à d'autres pathologies, de nouvelles cibles d'intervention dans un but thérapeutique peuvent être proposées.

Résultats

Manuscrit 1 : BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation *ex vivo*

Les résultats obtenus font l'objet d'un manuscrit publié dans le journal *Scientific Report* ([Schleiss et al., 2019](#)).

La pathogénèse de la LLC implique que le récepteur à l'antigène des Lymphocytes B (LB) joue un rôle primordial dans l'initiation et/ou le développement de la pathologie. En effet, une stimulation antigénique serait à l'origine du processus de leucémogénèse. De plus, une auto-activation chronique du BCR des LB-LLC a été mise en évidence dans un sous-type de LLC ([Duhren-von Minden et al., 2012](#)).

L'activation du récepteur serait indispensable à la survie cellulaire ainsi qu'à la prolifération des LB-LLC. Cela est démontré par l'apparition rapide d'une apoptose spontanée *ex vivo*.

A ce jour, aucun modèle permettant une prolifération des cellules primaires (LB) issues de patients atteints de LLC n'est unanimement admis dans la littérature. L'effet de l'activation prolongée *ex vivo* du BCR des LB-LLC a été beaucoup étudié et se traduit par une induction de l'apoptose des LB-LLC. Cette observation suggère que d'autres stimulations associées à l'activation du BCR sont nécessaires pour induire une prolifération soutenue. Différents protocoles décrits dans la littérature font état de l'utilisation d'autres types cellulaires (fibroblastes murins, LT, cellules stromales...) en co-culture, ce qui implique que de nombreux facteurs (cytokines, interactions cellulaires) sont requis pour induire la prolifération des LB isolés des patients LLC.

L'objectif initial de mon travail de thèse est décrit dans ce premier manuscrit. Il a consisté à mettre en place un modèle contrôlé et biologiquement défini de stimulation des LB-LLC primaires isolés de patients. Le protocole que j'ai défini requiert une activation du BCR pour induire une prolifération cellulaire robuste *ex vivo*. En plus de cette stimulation passant par le BCR, j'ai identifié un nombre minimal de stimuli permettant une prolifération robuste des LB-LLC. Ce travail permet donc une étude visant à identifier les facteurs leucémogènes et responsables de la prolifération, un objectif difficilement réalisable en situation de co-culture.

Pour répondre à cet objectif, nous avons dans un premier temps recherché les conditions optimales induisant la prolifération cellulaire en testant différents co-stimuli (IL-2, IL-4, IL-10, IL-21, IL-15, sCD40L) isolés ou en combinaison dans différents milieux de culture. L'analyse par cytométrie en flux (en présence de CFSE) permet de mettre en évidence la prolifération cellulaire qui se traduit par la diminution de la fluorescence (par dilution) de cette molécule lors des divisions cellulaires. Cette approche permet de définir la proportion de cellules en prolifération ainsi que le nombre de générations.

Dans un premier temps, nous avons confirmé l'absence de prolifération suite à une activation isolée du BCR par un anti-IgM, quel que soit le milieu utilisé, soluble ou semi-solide. Mon travail m'a conduit à identifier une combinaison de cytokines permettant une prolifération optimale des LB-LLC : en association avec l'activation du BCR, l'utilisation du CD40L soluble, d'IL-4 et d'IL-21 induit la prolifération des LB-LLC de manière reproductible. Ces quatre stimuli sont essentiels pour obtenir une prolifération robuste, puisque leur utilisation isolée ou en combinaison

deux par deux n'entraîne pas ou peu de prolifération (Figure 1A et S2A). Le potentiel de ce cocktail pour induire la prolifération cellulaire a été mis au point et démontré sur des LB isolés de donneurs sains (Figure 1B et S2B).

Notons que l'IL-21 est ajoutée un jour après l'activation initiale par un anti-IgM, le CD40L et l'IL-4, ce qui permet de potentialiser l'effet prolifératif ([Ahearne et al., 2013](#)).

Nous avons ensuite appliqué ce modèle de stimulation en milieu soluble sur une cohorte de LB-LLC plus large constituée de 59 patients non traités porteurs de LLC ainsi que sur des LB de donneurs sains (Figure 2). Six jours après la stimulation, 41% des échantillons de patients montrent une réponse proliférative avec une médiane de prolifération de 25%. De plus, on observe un maximum de 4 générations.

L'utilisation d'un milieu semi-solide (méthyl-cellulose) nous a permis d'augmenter très significativement le taux de réponse, puisque dans ces conditions, 89% des échantillons ont répondu à la stimulation avec une médiane de prolifération supérieure à 50% et un maximum de 6 générations observées (Figure 3 et S4).

Nous avons ensuite testé l'association de nos conditions de culture avec l'activation de la voie du TLR9, qui joue un rôle important dans la prolifération des LB-LLC ([Decker et al., 2000](#)). L'utilisation de CpG-ADN, associé au cocktail constitué d'anti IgM, de CD40L, d'IL4 et d'IL-21 permet d'augmenter significativement le taux de prolifération quel que soit le milieu utilisé (Figure 4). Cette observation renforce l'hypothèse d'effet synergique provoqué par l'induction simultanée du BCR et du TLR9 ([Chatzouli et al., 2014](#)).

J'ai ensuite comparé le cocktail que j'ai défini en milieu soluble avec l'utilisation de cellules fibroblastiques 3T6-CD40L. J'ai ainsi montré l'absence de différence significative entre ces 2 méthodes de stimulation de la prolifération de LB (Figure S5). Cependant, et comme je l'ai déjà mentionné, le cocktail que j'ai défini permet, contrairement à la co-culture, de réaliser la stimulation des LB dans un environnement biochimiquement contrôlé.

Dans les conditions de stimulation que j'ai définies, j'ai également observé un avantage prolifératif des cellules exprimant la protéine ZAP-70 dans le milieu soluble. En outre, en milieu semi-solide, les cellules présentant des mutations du gène *IgVH* et une expression de la protéine ZAP-70 présentent un avantage prolifératif avec 100% de réponse (Figure 5). A noter que la stimulation associant notre cocktail avec une activation de la voie TLR9 dans un milieu semi-solide permet une prolifération cellulaire quelles que soient ces caractéristiques biologiques (état mutationnel et présence ou non de ZAP70).

Compte tenu de l'hétérogénéité de la réponse proliférative des cellules exprimant la protéine ZAP-70, nous avons comparé les voies de signalisation dans des cellules ZAP-70 positives répondant ou non à la stimulation. L'analyse par western blot de différentes voies de signalisation suggère une augmentation de la phosphorylation de ZAP70^{TYR319} / SYK^{TYR352} à l'état basal dans les cellules répondant à la stimulation. De plus, les résultats suggèrent également une augmentation de la phosphorylation de la protéine STAT6 dans les cellules ayant proliféré, soulevant ainsi l'impact possible de la voie de signalisation en aval du récepteur à l'IL-4, dans laquelle STAT6 est primordiale (Figure 6A). Ce dernier résultat est confirmé par la diminution de la prolifération en l'absence d'IL-4 ou en présence d'un inhibiteur sélectif de JAK3 (Figure 6B).

L'ensemble de ce travail permet de proposer un modèle de stimulation induisant la prolifération des LB issus de patients atteints de LLC. Ce modèle présente l'avantage de passer par un engagement du BCR, évènement crucial de la leucémogénèse dans cette pathologie. J'ai ainsi identifié un cocktail de facteurs essentiels induisant la prolifération de LB et constitué de CD40L soluble, d'IL-4 et d'IL-21, suggérant fortement un rôle essentiel des LT dans ce processus.

Le CD40L est un membre de la famille du TNF exprimé à la surface des lymphocytes T activés. Son interaction avec le récepteur TNFRSF5 sur les lymphocytes B déclenche plusieurs voies de signalisation, y compris celles impliquant NF-κB et ERK. CD40L est connu pour participer à la survie, à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes B. L'IL-4, qui est principalement sécrétée par les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (TFH), active les voies impliquant JAK 2/3 et STAT6 et participe à la survie des LB. Enfin, l'IL-21, produite en partie par les cellules TFH, active la voie JAK 1/3/STAT3 dans les LB. Cette cytokine a été décrite comme induisant l'apoptose, mais joue également un rôle dans la prolifération des LB-LLC après une activation initiale par l'IL-4 et le CD40L. L'utilisation d'autres cytokines utilisées de manière isolée ou en combinaison (IL-10, IL-2, IL-15) ne présentait pas de gain dans la prolifération induite par le BCR ([Bernal et al., 2001](#); [Chaouchi et al., 1996](#)).

Le modèle de stimulation que nous proposons dans ce manuscrit constitue la première étude permettant d'obtenir une prolifération des LB passant par l'activation de la voie du BCR associée à des co-stimulations par des cytokines et ne faisant pas intervenir d'autres types cellulaires. La « simplicité » de ce modèle permet donc la recherche d'autres acteurs indispensables au déclenchement et/ou au maintien de la prolifération des LB tumoraux. De plus, la mise en place de cette stimulation m'a permis de répondre au second objectif de ma thèse qui visait à étudier la réponse transcriptionnelle et traductionnelle induite lors de la prolifération des LB-LLC.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation *ex vivo*

Received: 30 April 2018
Accepted: 21 November 2018
Published online: 24 January 2019

Cédric Schleiss^{1,2}, Wassila Ilias^{1,2}, Ouria Tahar^{1,2,3}, Yonca Güler⁴, Laurent Miguet^{4,5}, Caroline Mayeur-Rousse^{4,5}, Laurent Mauvieux^{4,5}, Luc-Matthieu Fornecker^{4,6}, Elise Toussaint^{4,6}, Raoul Herbrecht^{4,6}, Frédéric Bertrand^{2,7}, Myriam Maumy-Bertrand^{2,7}, Thierry Martin^{2,8}, Sylvie Fournel⁹, Philippe Georgel^{1,2}, Seiamak Bahram^{1,2,3} & Laurent Vallat^{1,2,3,10}

A chronic antigenic stimulation is believed to sustain the leukemogenic development of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and most of lymphoproliferative malignancies developed from mature B cells. Reproducing a proliferative stimulation *ex vivo* is critical to decipher the mechanisms of leukemogenesis in these malignancies. However, functional studies of CLL cells remains limited since current *ex vivo* B cell receptor (BCR) stimulation protocols are not sufficient to induce the proliferation of these cells, pointing out the need of mandatory BCR co-factors in this process. Here, we investigated benefits of several BCR co-stimulatory molecules (IL-2, IL-4, IL-15, IL-21 and CD40 ligand) in multiple culture conditions. Our results demonstrated that BCR engagement (anti-IgM ligation) concomitant to CD40 ligand, IL-4 and IL-21 stimulation allowed CLL cells proliferation *ex vivo*. In addition, we established a proliferative advantage for ZAP70 positive CLL cells, associated to an increased phosphorylation of ZAP70/SYK and STAT6. Moreover, the use of a tri-dimensional matrix of methylcellulose and the addition of TLR9 agonists further increased this proliferative response. This *ex vivo* model of BCR stimulation with T-derived cytokines is a relevant and efficient model for functional studies of CLL as well as lymphoproliferative malignancies.

Like in most mature lymphoproliferative malignancies, an antigenic stimulation is believed to drive the leukemogenic process in chronic lymphocytic leukemia (CLL)^{1–3}. A restricted use of *IGHV* genes and the existence of stereotypic B cell receptor (BCR) on CLL cells^{4–6} provides evidence in favor of antigenic stimulation where different microbial antigens, as well as auto-antigens, have been suspected as actors of this chronic stimulation⁷. In addition, a chronic BCR self-activation has been shown in subtypes of CLL cells⁸. Moreover, several signaling aberrations have been described downstream of the BCR, notably in aggressive CLL with unmutated *IGHV* (UM-CLL), in which the expression of ZAP70 reinforces BCR responsiveness^{9–12}. BCR activation, which is essential for the physiological development of lymphocytes¹³ would also be indispensable for the survival and proliferation of CLL cells *in vivo*². Accordingly, withdrawal of this stimulation is believed to be responsible for the rapid spontaneous apoptosis of CLL cells *ex vivo*¹⁴. The cellular consequences of this BCR activation has been extensively studied and

¹Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR-S1109, LabEx Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ²Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMCARE, Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ³Laboratoire d'Immunologie, Plateau Technique de Biologie, Pôle de Biologie, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France. ⁴Université de Strasbourg, INSERM, IRFAC UMR-S1113, Strasbourg, France. ⁵Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. ⁶Service d'Hématologie Adulte, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. ⁷Institut de Recherche Mathématique Avancée IRMA, CNRS UMR 7501, Strasbourg, France. ⁸CNRS UPR 9021 - Immunologie et Chimie Thérapeutiques, Institut de Biologie Moléculaire et cellulaire (IBMC), Strasbourg, France. ⁹CNRS UMR7199, Université de Strasbourg, Illkirch, France. ¹⁰Present address: Université de Strasbourg, INSERM, IRFAC UMR-S1113, and Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. Cedric Schleiss and Wassila Ilias contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.B. (email: siamak@unistra.fr) or L.V. (email: vallat@unistra.fr)

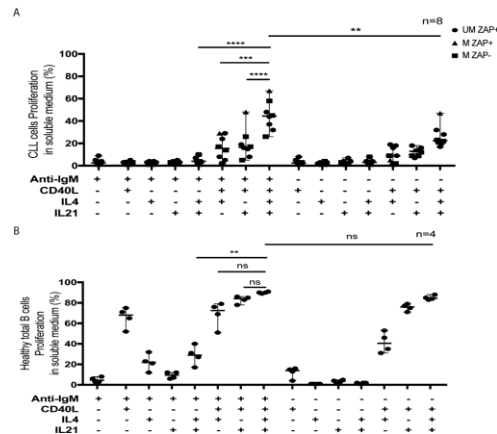


Figure 1. Determination of the optimal culture conditions for CLL and healthy B cells proliferation *ex vivo*. (A) Effect of BCR and cytokines stimulation, isolated or in combination, on the proliferation of B cells harvested from CLL patients and cultured on soluble medium (n = 8; CLL samples #6, 14, 24, 42, 49, 52, 58 and 62) and (B) total B cells from healthy donors (n = 4) cultured in soluble medium. After initial CFSE staining at day 0, the percentage of dividing cells (CFSE^{dim}) were evaluated by flow cytometry at day 6 for CLL cells samples and at day 4 for healthy B cells. Symbols represent CLL cells sub-types (circle: UM ZAP +; triangle: M ZAP +; square: M ZAP-). 95% confidence interval for median is shown in each group. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

we previously described the specific transcriptional^{15,16} and proteomic programs¹⁷ which are induced in aggressive CLL cells following BCR ligation.

Nevertheless, a sustained soluble stimulation of the BCR induces apoptosis in CLL cells^{9,15,18–21} and BCR-associated factors are mandatory in inducing CLL cells proliferation. Several factors, are known for their role in CLL cells survival or proliferation, among which IL-2, IL-4, IL-10, IL-15, IL-21 and CD40L are prominent^{22–25}, but an exhaustive evaluation of their role as BCR-cofactors for CLL cells proliferation is still lacking. Difficulties to achieve robust CLL cell proliferation *ex vivo* led to the use of stromal cells^{26,27}, activated T cells^{22,28–31} or fibroblast (eventually CD40L transfected)^{31,22,30,32–34} as feeder cells. However, feeder cells' interactions³⁵ and secretion of IL-6, IL-10 or TGF- β can also participate in CLL cells survival and proliferation²⁶, which makes the identification of essential leukemogenic factors difficult and prevents the specific evaluation of BCR ligation in the proliferative response in these models.

In this study, we aim to set-up culture conditions, primarily based on BCR ligation for patho-physiological relevance, inducing CLL cells proliferation. This study was conducted in two steps. We first aimed at establishing the optimal *ex vivo* model for CLL cells proliferation measured by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) incorporation. For this, a selection of healthy and primary CLL cells were stimulated by anti-IgM ligation with or without co-stimulatory molecules (IL-2, IL-4, IL-10, IL-21, IL-15, sCD40L), at various concentration in different culture conditions. Next, using the optimized culture conditions, we analyzed the proliferative response of fresh negatively selected B cells isolated from a cohort of well characterized CLL patients, under informed consent, including clinical data, cell morphology, flow cytometry - including ZAP70 expression status-, FISH and *IGHV* mutational status, as these factors may impact the cell response to stimulation^{22,28,30,31}. These culture conditions induced a proliferative response of a fraction of CLL cells, essentially ZAP70+, in soluble medium and a proliferation of nearly all CLL cells in 3D semi-solid medium, representing a valuable system for CLL functional studies.

Results

Establishing culture conditions for CLL cells proliferation *ex vivo*. To establish culture conditions for CLL cells proliferation after *ex vivo* activation, we first evaluated CFSE labeling in a small series of patient samples (n = 8). This approach allows calculating the percentage of dividing cells and the number of cell generations (Fig. S1). We first confirmed data from previous studies showing that *ex vivo* BCR activation by means of anti-IgM ligation does not induce CLL cells proliferation when these cells are cultured in soluble medium (Figs 1A and S2A). Similarly, stimulation with IL-4, IL-21 or CD40L, used separately, in soluble medium, did not induce CLL cells proliferation either (Fig. 1A). We also confirmed that different combinations of cytokines, [CD40L + IL-4], [CD40L + IL-21] and [CD40L + IL-4 + IL-21] induced a weak (less than 40%) proliferation of CLL cells (Fig. 1A). Of note, IL-21, which has a pro-apoptotic effects on CLL cells³⁴ potentiates the proliferating effect of IL-4 when sequentially added after IL-4²³ and therefore IL-21 was added 24 h after all initial IL-4 stimulation. However, when we analyzed the proliferative effect of a combination of cytokines added after initial BCR stimulation (IgM ligation), we established that, even if BCR activation associated to [CD40L + IL-4] or [CD40L + IL-21] allowed a weak proliferation, the combination of anti-IgM with [CD40L + IL-4 + IL-21] induces a higher proliferation

rate of CLL cells in soluble medium (Fig. 1A). Similar experiments confirmed the proliferative potential of these conditions on total B cells from healthy donors (Figs 1B and S2B). We analyzed the morphology of CLL cells submitted to these culture conditions. We observed the formation of clusters of proliferating cells in the culture medium (Fig. S1) and cytological analysis of these cells after cyto centrifugation at day 6 revealed in all cases a monomorphic evolution consisting in large cells with a high amount of basophilic cytoplasm, prominent nucleoli and a fine chromatin that were distinct from those of control unstimulated cells (Fig. S3A). Immunophenotypic analysis of proliferating CLL cells at day 6 after *ex vivo* stimulation showed a lower expression of CD5, an upregulation of CD138 but not of CD38 and no IgG expression on cell surface, as compared to the expression at day 0 before stimulation (Fig. S3B) which underlined the biological relevance of this model of *ex vivo* stimulation.

Response of a cohort of CLL cells submitted to the selected culture conditions. Because of the clinical and biological heterogeneity of CLL patients, we analyzed the impact of these selected culture conditions on the proliferative response of fresh CLL cells harvested from sixty-five untreated patients referred in Strasbourg Hospitals, essentially Binet stage A (58/65) (Table 1). Among them, 25 harbored unmutated *IGHV* genes (UM-CLL) and expressed the ZAP70 protein (ZAP70+), 29 had mutated *IGHV* genes (M-CLL) and did not express the ZAP70 protein (ZAP70-), 10 were ZAP70+ M-CLL and one was ZAP70- UM-CLL. We also analyzed the proliferation of total B cells (20 healthy blood-donors) and naïve (CD19+, CD27-, IgM+) B cells (16 healthy blood-donors). All of the total B-cells (20/20) and 12 out of 16 naïve B cells exhibited more than 25% of dividing cells at day 4 (Fig. 2A) (median 62%; confidence interval (CI) of median [56;82] with up to 4 cell generations for total B cells and median 60%; CI [24;71] for naïve B cells with up to 5 cell generations). In the same conditions, 24/59 (41%) of CLL cells samples proliferated (median 25%; CI [17;27]), showing up to four generations of proliferating cells at day 6 (Fig. 2A,B).

3D semi-solid matrix increases CLL cells proliferation *ex vivo*. Then we analyzed the impact of a tri-dimensional environment using a semi-solid medium (methylcellulose) where the selected culture conditions also showed their proliferative action (Fig. S4). This culture condition enhanced the proliferation rates and number of cell generations of nearly all CLL cells (89%; 34/38 samples) (Fig. 3A), with up to six generations observed at day 6 (Fig. 3B,C). Of importance, CLL cells stimulation on feeding cells (CD40L-transfected 3T6 cells) neither drove a higher proliferation rate (compared to the soluble stimulation alone) nor increased the number of generations of proliferating cells (Fig. S5A,B).

TLR9 agonists further increases CLL cells proliferation. Next, we tested the effects of CpG-ODN2006 (known to affect B cells proliferation by TLR9 activation)³¹ in our culture conditions. While CpG-ODN2006 alone did not induce CLL cells proliferation (for 35 out of 39 CLL cells tested), we observed increased responses ($p < 0.0001$) when cells were stimulated with CpG-ODN2006 combined to BCR and cytokines in soluble and 3D semi-solid medium (Fig. 4A-F). In addition, CpG/DSP30 and IL-2 cocktails being routinely used as metaphases inducers for cytogenetic diagnosis, we then compared our stimulation conditions with CpG-ODN2006 + IL-2 or commercial premix DSP30/IL-2. The combination of CpG/DSP30 and IL-2 did not increase the proliferation rate, compared to BCR with our selected cytokine stimulation conditions, in soluble or semi-solid medium (Fig. S6A,B). Our work also confirmed previous reports³⁶ showing that the combination of CpG-ODN2006 and IL-15 is a modest inducer of CLL cells proliferation. Nevertheless, IL-15 addition did not increase the proliferation rate, compared to our soluble BCR stimulation (Fig. S7A,B).

Proliferative advantage of ZAP70+ CLL cells in soluble medium. Analyzing the rate of CLL cells proliferation after BCR and cytokine stimulation according to their biological characteristics, we observed that proliferating cells, in soluble medium, exhibit the highest ZAP70 expression levels, compared to non-proliferating cells ($p = 0.0043$) (Fig. 5). Accordingly, 15/30 (50%) ZAP70+ CLL cells responded to the stimulation with up to four generations (median: 2 generations, with a significant ($p = 0.0198$) Pearson's correlation coefficient between ZAP70 expression level and the number of cell generations), whereas only 8/28 ZAP70- CLL cells proliferate with a maximum of two generations. Of note, the percentage of *IGHV* gene identity and CD38 expression did not associate with the cell proliferation in this soluble model (not shown). In semi-solid medium, ZAP70+ CLL cells with mutated *IGHV* exhibit a proliferative advantage (Fig. 5).

When BCR ligation and cytokines are associated with CpG-ODN2006 stimulation, all CLL-cells respond equally in soluble or semi-solid medium, irrespective of the level of ZAP70 and the *IGHV* status (Fig. 5).

Increased ZAP70/SYK and STAT6 phosphorylation in proliferating ZAP70+ CLL cells. Given the heterogeneity of the proliferative response of ZAP70+ CLL-cells, we searched for signaling differences between responders (proliferating) and non-responders ZAP70+ cells. We performed western blots to analyze the main signaling pathways activated downstream of the BCR (e.g. ZAP70, pZAP/pSYK, pERK, plkB) and the JAK/STAT pathway (e.g. pAKT and pSTAT6) in selected responders and non-responders amongst the ZAP70+ UM-CLL cells. Our results (Figs 6A and S8A,B) confirmed ZAP70 expression in all these CLL cells. They also suggested increased ZAP70^{Tyr319}/SYK^{Tyr352} phosphorylation before stimulation (at the steady state) and a further increase upon stimulation in responding ZAP70+ CLL cells, compared to non-responding cells ($p = 0.03$). IκB phosphorylation was evidenced upon stimulation in both non-responding ($p = 0.03$) and responding ($p = 0.05$) CLL cells. The main signaling pathway downstream IL-21R (pSTAT3), revealed no difference between responders (proliferating) and non-responders ZAP70+ cells (Fig. S9A-C). However, we observed an increased STAT6 phosphorylation in responding CLL cells, compared to non-responders ($p = 0.03$). STAT6 being a major component of the IL-4 receptor signaling pathway, this result was corroborated by the significantly reduced CLL cells proliferation found in the absence of IL-4 in the stimulatory cocktails, or when a selective JAK3 inhibitor (PF-956980) was used (Fig. 6B).

Discussion

Engagement of the BCR is a crucial event in CLL leukemogenesis, but is not sufficient to induce cell proliferation *ex vivo*, and is even known to promote B cells apoptosis^{15,18}. This caveat can be prevented with coated anti-IgM stimulation, which promotes CLL cells survival⁹ but does not induce cell proliferation either. Therefore, BCR-induced CLL-cell proliferation *in vivo* likely requires additional co-stimulatory signals and proliferative properties of several soluble factors have been described in the literature. Here we performed an exhaustive study of the role of several co-stimulating factors, used solely or in combination, on top of anti-IgM stimulation, to identify mandatory factors sustaining CLL cells proliferation *ex vivo*. We evaluated CD40L (CD154), a TNF family member expressed on activated T-cells that activates the TNFRSF5 receptor on B cells and triggers several signaling pathways, including NF- κ B and ERK, and participates in the survival, proliferation and differentiation of B cells³⁷. IL-4, which is mainly secreted by T Follicular helper cell (TFH), activates STAT6 and participates in the activation and survival of B cells^{38,39}, was also tested. Finally, we considered IL-21, which is produced by TFH, NKT and TH17 cells, for its role in the induction of JAK/STAT signaling in B cells⁴⁰. IL-21 is known to induce apoptosis³⁴, but plays also a role in CLL cells proliferation after priming by IL-4 and CD40L^{22,23}. IL-21 was added at Day 1 in the culture medium. We also tested, isolated or in combination, IL-10, IL-2, IL-15, which did not show gain in BCR-induced proliferation effect (not shown) and were not considered further.

Several groups have already used soluble CD40L, IL-2, IL-4, IL-10, IL15 or IL-21, isolated or in combination, to stimulate CLL cells^{22–24,30,34,39}. However, to our knowledge, this is the first study to evaluate their role as BCR co-stimulating factors in soluble conditions without the support of feeder cells. Indeed, most *ex vivo* models of CLL cells proliferation described in the literature are not consistently defined, as they used co-cultures of fibroblasts expressing CD40L, sometimes in the presence of IL-2²², to favor CLL cells survival^{32,33}. Co-cultures involving autologous activated T-cells have also been reported^{22,28}, including in association with a fibroblast layer³⁰. The nature of the cytokines used suggests a T cell dependent activation, possibly delivered by follicular helper T-cells found in the proliferative centers described in secondary lymphoid organs of CLL patients^{41–43}.

Our systematic analysis of BCR ligation associated to different co-stimulations enabled us to select the optimal condition combining BCR activation and co-stimulating factors [CD40L + IL-4 + IL-21] driving CLL cells proliferation. This cocktail was used to stimulate CLL cells harvested from a cohort of patients with different biological characteristics (*IgHV* UM/M, ZAP70+/- and CD38+/-) and control B cells from healthy donors. In these conditions, about 1/3 of CLL cells proliferate at day 6 after stimulation, among which ZAP70+ B cells appeared particularly responsive. The same stimulation, performed on a 3D semi-solid (methylcellulose) medium, induced the proliferation of nearly all (89%) CLL cells, with a high number of cell generation, representing an efficient model of CLL cells proliferation.

A T-dependent help for CLL cells proliferation has not yet been proven *in vivo*. In our model, T-cells-derived cytokines (CD40L, IL-4 and IL-21) enable BCR-activated CLL proliferation which reinforces this hypothesis. Furthermore, it was shown in the literature that the proliferation of CLL cells xenografted in NOD-SCID mice required concomitant TFH graft *in vivo*⁴⁴, which also sustains this model. Of note, our results showed the importance of IL-4 and IL-21 co-stimulation (in addition to anti-IgM and CD40L) for CLL cells proliferation, whereas the sole association of anti-IgM and CD40L was sufficient to induce healthy B cells proliferation. Finally, BCR and cytokine stimulation on a tri-dimensional matrix of methylcellulose allowed the proliferation of most of the CLL cells tested, irrespectively of their biological characteristics. This result, which may reflect the natural history of leukemogenesis of CLL cells within secondary lymphoid organs may further enhance the pathophysiological relevance of our *ex vivo* model. Furthermore, the individualization of clusters of proliferating cells, distributed in this 3D matrix, could allow studying the heterogeneity of intraclonal responsiveness to various drugs in future studies.

High proliferation rate (up to 80% with 6–8 cell generations) was only observed in a subset of CLL cells. Such variability may reflect the clinical and biological heterogeneity of CLL patients, among whom those characterized by ZAP70+ CLL cells appeared particularly responsive, as also observed by others^{32,45}. However, we noted that all ZAP70+ CLL cells do not equally respond to *ex vivo* stimulation, which prompted us to investigate in more details the molecular features of the responders and non-responders among this subpopulation. We first confirmed by Western blots the presence of ZAP70 protein in these cells. In CLL cells, ZAP70 activates and extends SYK^{Tyr352} phosphorylation, independently of ZAP70 phosphorylation^{10,46}. This activation induces another SYK^{Tyr526} phosphorylation, leading to downstream BCR signaling. Our results, performed on a limited number of CLL cell samples (4R vs 3 NR) show that CLL cells that proliferate in soluble medium could achieved a higher initial ZAP70^{Tyr319}/SYK^{Tyr352} phosphorylation, the mechanism of which remains to be investigated. We also show a concomitant increase in pSTAT6 in the proliferating ZAP70+ CLL cells, suggesting that signaling downstream of the IL-4R could participate in CLL proliferation, which reinforces the need to evaluate therapeutic agents inhibiting this pathway^{39,47}. More generally, these results highlight the need to explore the functionality of multiple signaling pathways in relation to the heterogeneity of CLL patients. Indeed, as more kinases inhibitors are now available for therapeutic use, there appears to be a rationale for further personalized use of these molecules.

In conclusion, this study demonstrates the relevance of the BCR activation, combined with a defined set of cytokines, to recapitulate CLL cells proliferation *ex vivo*. In addition, it highlights the potential roles of T cells in this process. The soluble and 3D culture models established here represent valuable systems for further studies aimed at characterizing the initial steps of malignant evolution of the CLL, with the ultimate goal to identify novel targets for therapeutic purpose.

Materials and Methods

Subjects and B cell isolation. Peripheral lymphocytes were isolated from 65 untreated CLL patients and from 36 healthy blood donors (buffy coats obtained from the Etablissement Français du Sang Grand Est, Strasbourg, France). All subjects gave written informed consent for this study, which was approved by the institutional review board of the Strasbourg University Hospitals and all experiments were performed in accordance

Résultats

www.nature.com/scientificreports/

Sample	Sex	Age at diagnosis	IGHV status*	VH identity (%)	ZAP70 status**	CD38 ***	cytogenetic	Binet stage	Lymphocytes (G/L)
CLL-01	M	67	M	96	neg	neg	0	A	3
CLL-03	M	82	M	87	neg	neg	del13q, del17p	B	12
CLL-04	M	43	M	94	neg	neg	del13q	A	89
CLL-05	M	51	M	90	neg	neg	0	A	62
CLL-07	M	63	M	90	neg	neg	del13q	C	60
CLL-08	M	58	M	93	neg	neg	0	A	18
CLL-09	M	60	M	93	neg	neg	nd	A	9
CLL-12	F	64	M	93	neg	neg	0	A	47
CLL-15	M	57	M	91	neg	pos	0	A	43
CLL-17	M	59	M	95	neg	neg	nd	A	27
CLL-18	F	53	M	94	neg	nd	nd	A	55
CLL-27	M	77	M	92	neg	neg	del13q	A	12
CLL-30	M	46	M	92	neg	neg	del13q	C	124
CLL-31	F	68	M	93	neg	neg	del13q	A	13
CLL-34	M	73	M	91	neg	neg	0	A	35
CLL-35	F	49	M	93	neg	neg	del13q	A	10
CLL-37	M	54	M	92	neg	neg	nd	A	15
CLL-38	F	57	M	93	neg	neg	del13q	A	7
CLL-39	F	55	M	96	neg	neg	0	A	16
CLL-43	M	45	M	95	neg	nd	del13q	A	29
CLL-45	M	63	M	92	neg	neg	nd	A	12
CLL-49	M	44	M	95	neg	neg	nd	A	65
CLL-50	F	48	M	93	neg	neg	0	A	94
CLL-52	M	76	M	nd	neg	neg	0	A	44
CLL-60	F	78	M	93	neg	neg	nd	A	4
CLL-61	M	61	M	97	neg	neg	nd	A	12
CLL-62	F	61	M	98	neg	neg	del13q	A	8
CLL-63	M	44	M	93	neg	neg	del13q	A	13
CLL-64	M	70	M	91	neg	nd	nd	A	8
CLL-06	M	73	M	97	pos	neg	del13q	A	34
CLL-11	F	41	M	92	pos	neg	0	A	13
CLL-16	M	60	M	94	pos	neg	nd	A	24
CLL-20	M	57	M	93	pos	nd	0	A	10
CLL-21	M	59	M	96	pos	neg	del13q	A	6
CLL-28	M	73	M	94	pos	neg	del13q	A	11
CLL-29	F	56	M	96	pos	neg	trisom12, del11q	A	35
CLL-46	F	42	M	96	pos	nd	del13q	B	32
CLL-47	F	33	M	96	pos	neg	del13q	A	6
CLL-56	M	63	M	97	pos	pos	nd	A	9
CLL-59	F	75	UM	99	neg	pos	nd	A	8
CLL-02	M	77	UM	100	pos	nd	trisom12	B	155
CLL-10	M	60	UM	100	pos	neg	del13q	A	119
CLL-13	M	79	UM	98	pos	pos	0	A	14
CLL-14	F	70	UM	100	pos	neg	trisom12	A	18
CLL-19	F	58	UM	100	pos	neg	0	A	28
CLL-22	M	71	UM	99	pos	pos	del13q	A	7
CLL-23	M	61	UM	100	pos	pos	0	A	56
CLL-24	M	67	UM	99	pos	nd	trisom12	A	22
CLL-25	M	41	UM	99	pos	pos	del13q, del11q	B	44
CLL-26	F	66	UM	100	pos	neg	del13q	A	142
CLL-32	M	59	UM	100	pos	pos	trisom12	A	80
CLL-33	M	54	UM	100	pos	neg	del13q	A	93
CLL-36	F	55	UM	99	pos	neg	del13q	A	15
CLL-40	M	54	UM	100	pos	pos	del13q	A	66
CLL-41	F	34	UM	99	pos	neg	0	A	5

Continued

Sample	Sex	Age at diagnosis	IGHV status*	VH identity (%)	ZAP70 status**	CD38 ***	cytogenetic	Binet stage	Lymphocytes (G/L)
CLL-42	F	72	UM	100	pos	pos	del13q	A	11
CLL-44	F	47	UM	99	pos	neg	0	B	79
CLL-48	M	81	UM	100	pos	neg	del17p	A	10
CLL-51	F	79	UM	100	pos	neg	del13q	A	48
CLL-53	F	56	UM	100	pos	neg	del13q	A	145
CLL-54	M	60	UM	99	pos	neg	nd	A	15
CLL-55	M	72	UM	100	pos	neg	Trisom12, t(14;19)	A	10
CLL-57	F	62	UM	99	pos	neg	0	A	5
CLL-58	M	77	UM	100	pos	neg	0	A	9
CLL-65	M	60	UM	100	pos	neg	0	A	101

Table 1. Clinical and biological characteristics of CLL patients. * $\geq 98\%$ of VH identity for defining unmutated (UM) CLL B cells⁵². ** < 7 threshold of T-cells/CLL B cells ratio of ZAP70 mean fluorescence intensity expression for defining ZAP70 positive CLL cells⁴⁹. *** $\geq 30\%$ threshold for defining CD38 positive CLL. nd indicates non determined.

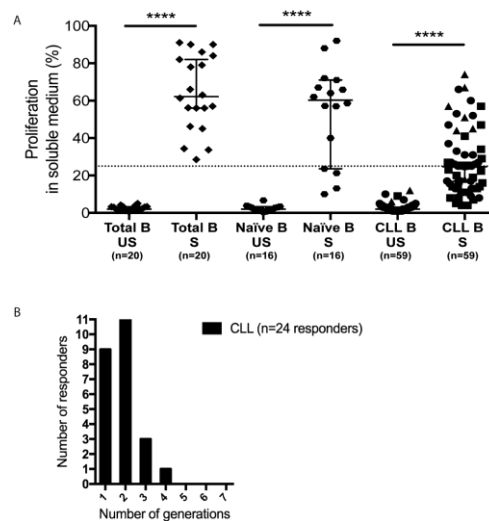


Figure 2. Cell proliferation of CLL and healthy B cells after soluble [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation. (A) CLL cells isolated from a cohort of 59 CLL patients and healthy donors (naïve B cells, n = 16 or total B cells, n = 20) were stimulated *ex vivo* with anti-IgM, CD40L, IL-4 and IL-21. After initial CFSE staining (day 0), the percentage of cell proliferation was measured at day 6 for CLL cells and at day 4 for healthy B cells in stimulated cells (S) and control unstimulated cells (US). A threshold of dividing cells greater than 25% among living cells (dashed line) and the presence of at least one generation of daughter cells defines proliferation. 95% confidence interval for median is shown in each group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Symbols represent CLL cells sub-types (circle: UM ZAP+, triangle: M ZAP+, square: M ZAP-, diamond: UM ZAP-). (B) For CLL cells responding to the stimulation, the number of cell generations, based on CFSE analysis, was quantified.

with relevant guidelines and regulations. CLL cells were negatively selected from fresh blood samples using the RosetteSep™ B cell enrichment cocktail (StemCell Technologies, Grenoble, France) and density gradient centrifugation (Ficoll®Paque Plus, GE Healthcare Life sciences, Velizy-Villacoublay, France). IGHV gene mutation status and ZAP70 expression were evaluated for each patient following established protocols^{48,49}. Cytogenetic abnormalities were identified by metaphase analysis and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using a panel of probes as previously reported⁵⁰. Total (CD19+) or naïve (CD19+, CD27+, IgM+) B cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy blood donors using a negative selection kit (Human naïve B cell isolation kit, Human B cell isolation kit, Stemcell™ Technologies, Grenoble, France) after density gradient centrifugation (Ficoll®Paque Plus, GE Healthcare Life sciences, Velizy-Villacoublay, France). The cell purity was then controlled by flow cytometry on a Cytomics FC500 System (Beckman-Coulter, Fullerton, CA)

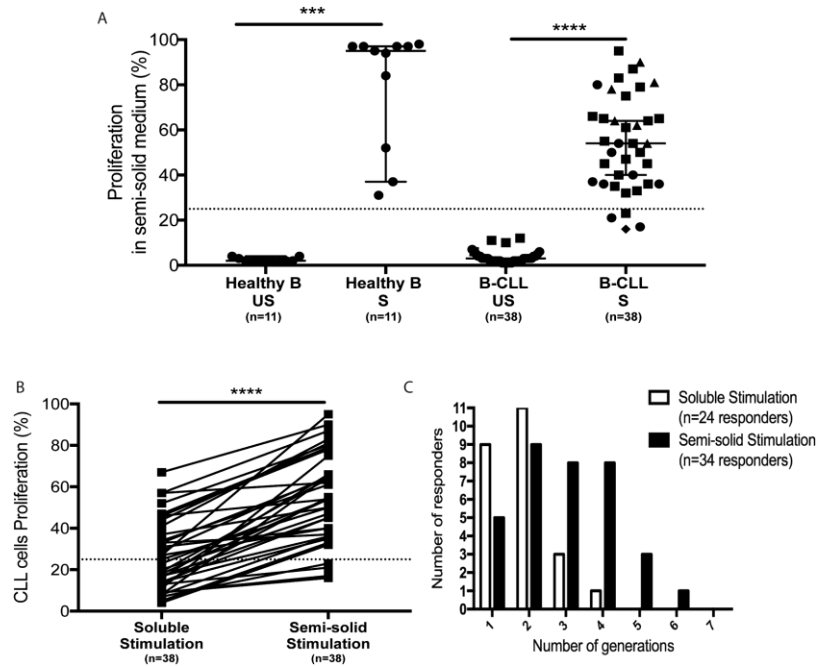


Figure 3. Cell proliferation of CLL and healthy B cells after [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation on a semi-solid medium. (A) CLL cells isolated from a cohort of 38 CLL patients and naïve and total B cells (n = 11) isolated from healthy donors have been stimulated *ex vivo* with anti-IgM, CD40L, IL-4 and IL-21 on a semi-solid culture medium. After initial CFSE staining (day 0), the percentage of cell proliferation was measured at day 6 for CLL cells and at day 4 for healthy B cells in stimulated cells (S) and control unstimulated cells (US). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Symbols represent CLL cells sub-types (circle: UM ZAP+; triangle: M ZAP+; square: M ZAP-; diamond: UM ZAP-). (B) Comparison of CLL cells proliferation after anti-IgM, CD40L, IL-4 and IL-21 stimulation in soluble and semi-solid medium. (C) Number of cell generations for responding CLL cells stimulated in soluble and semi-solid medium.

using CD19⁺ or CD19⁺/CD27⁻ staining (Beckman Coulter, Villepinte, France). CLL B cell purity was assessed after CD19⁺/CD5⁺ staining (Beckman Coulter, Villepinte, France) and ranged from 90% to 99% (median 97%). Cell differentiation was studied after anti-CD38 and anti-CD138 stainings (Beckman Coulter, Villepinte, France) at days 0 and 6.

Culture conditions. Cells were cultured in RPMI 1640 Medium (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Dutscher, Brumath, France) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, New York, USA), with or without methylcellulose (MethoCultTM, StemcellTM Technologies, Vancouver, Canada) at 37 °C, in an atmosphere enriched with 5% CO₂. B cells at a density of 10⁶ cells/ml were stimulated in the absence or presence of 10 µg/ml of soluble F(ab')₂ anti-human IgM (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), 100 ng/ml of trimeric CD40L (Enzo Life Science, Villeurbanne, France), 10 ng/ml of IL-4 (R&D Systems-Bio-Techne, Lille, France) and 25 ng/ml of IL-21 (Invitrogen, Maryland, USA). IL-21 was added 24 h after initial stimulation with anti-IgM, CD40L and IL-4 by up/down pipetting in soluble and methyl cellulose medium. In each well, 100 µl of fresh soluble medium was added at Day 3. Other culture conditions included CpG (ODN2006, 5 µg/ml, InvivoGen, San Diego, USA), IL-15 (15 ng/ml, R&D), IL-2 (10 ng/ml, R&D) and PremixAmpliB DSP30/IL-2 (50 or 100 µg/10⁶ cells) (Amplitech, Compiègne, France). After 6 days, proliferation was assessed by flow cytometry.

Control and CLL cells were co-cultured on fibroblasts (3T6 cells) stably transfected with either a plasmid encoding human CD40L (3T6-CD40L) or mock transfected (3T6). Fibroblasts were pre-cultured overnight in 48-well plates (Dutscher, Brumath, France) at 5.10⁴ cells/well. At day 1, fibroblasts were X-ray-irradiated (30 Gy) and re-cultured overnight. At day 2, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeled B cells (10⁶ cells/ml) were added to the fibroblast layer (10 CLL cells/1 fibroblast). At day 6 and after CD19 staining, B cells proliferation was evaluated by flow cytometry.

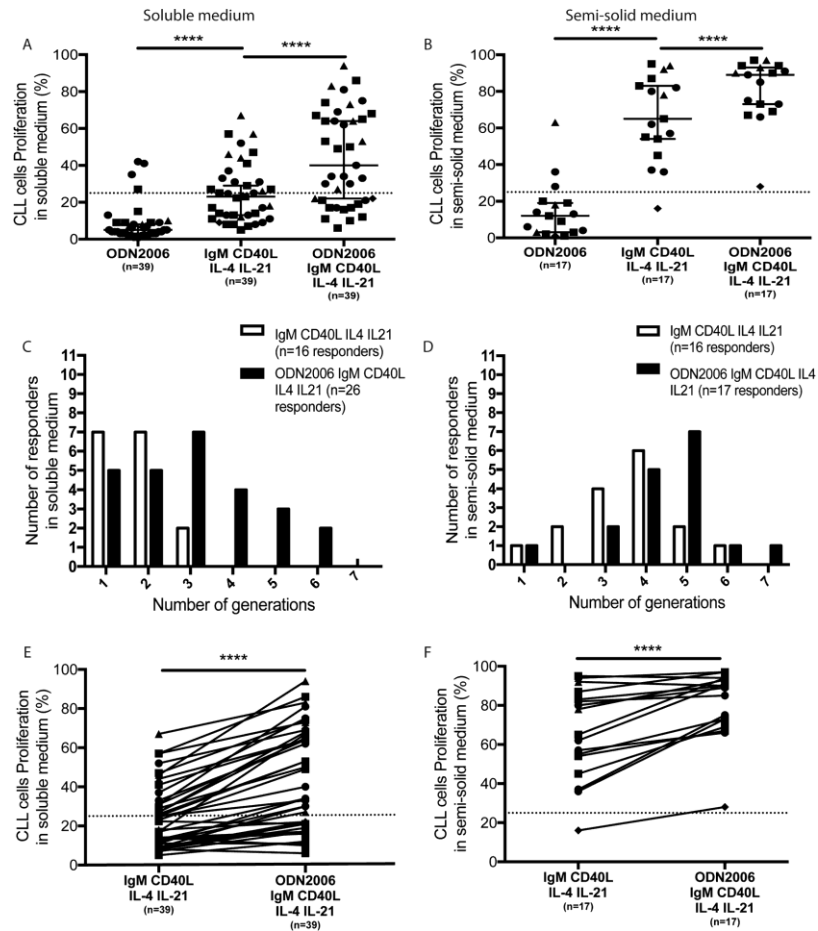


Figure 4. Additive effect of TLR9 activation on CLL cells after [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation. (A) CLL cells (n = 39) were stimulated either by CpG-ODN2006, or IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 or the combination of CpG-ODN2006 and anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21. After initial CFSE staining (day 0), the percentage of cell proliferation was measured at day 6 in soluble medium and (B) in semi-solid medium. (C) Determination of the number of cell generations for responding CLL cells after anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 stimulation with or without CpG-ODN2006 in soluble medium and (D) in semi-solid medium. (E) Comparison of CLL cells proliferation after anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 stimulation with or without CpG-ODN2006 in soluble medium and (F) in semi-solid medium. Symbols represent CLL cells sub-types (circle: UM ZAP+; triangle: M ZAP+; square: M ZAP-; diamond: UM ZAP-). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

CFSE-based proliferation assays. Freshly isolated B cells were labeled with 0.5 μM CellTrace™ CFSE (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and incubated for 10 min at 37 °C in the dark. Washed CFSE-labeled cells were stimulated and cultured at 37 °C/5% CO₂. Four or six days later, B cell proliferation was evidenced by a cell division-dependent decrease in CFSE staining intensity as evaluated by flow cytometry (Fig. S1). Fluorescence data were analyzed with CXP (Beckman Coulter, Fullerton, CA) and FlowJo v.8.7 (TreeStar, Ashland, USA) softwares.

Apoptosis assay. Cell apoptosis was evaluated using FITC annexin-V Apoptosis detection kit and propidium iodide (PI) (both from BD Pharmingen, BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Cells (10⁶) were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and re-suspended in annexin buffer before the addition of FITC annexin-V

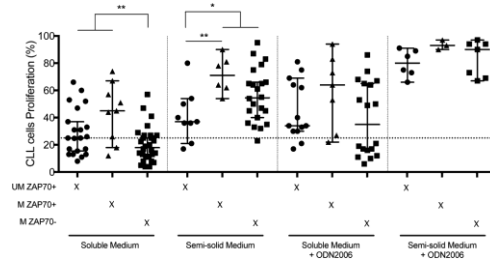


Figure 5. Proliferative response according to the IGHV mutational status and ZAP70 protein expression. Recapitulation of CLL cells proliferation for UM ZAP+ (circle), M ZAP70+ (triangle) and M ZAP70- (square) CLL cells after anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 stimulation in soluble medium, semi-solid medium, soluble medium + CpG-ODN2006 and semi-solid medium + CpG-ODN2006. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

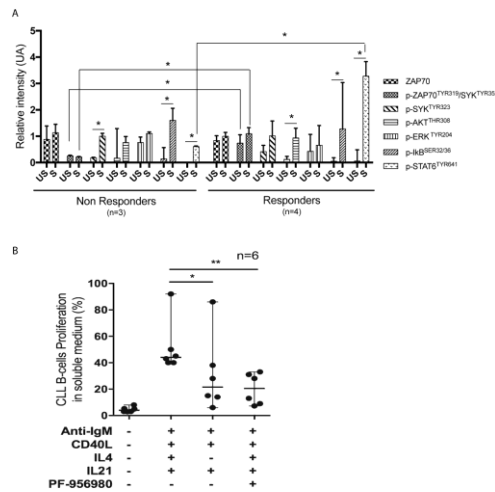


Figure 6. Signaling pathways activated by [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation of responding and non-responding UM ZAP70+ CLL cells. (A) Normalized protein expression of ZAP70, phospho-ZAP70³¹⁹/SYK³²⁵ (pZAP70/pSYK), phospho-SYK³²⁵ (pSYK), phospho-AKT³⁰⁸ (pAKT), phospho-ERK1/2²⁰⁴ (pERK), phospho-IκB^{32/36} (pIκB) and phospho-STAT6⁶⁴¹ (pSTAT6), based on immunoblot results of proliferating (Responders, $n = 4$) and non-proliferating (Non Responders, $n = 3$) UM-CLL ZAP+ CLL cells following stimulation (S) or in unstimulated (US) conditions. Protein expression corresponds to the value of a signal (determined with ImageJ) normalized to that of GAPDH. (B) Role of IL-4 co-stimulation on CLL cells proliferation. CLL cells isolated from 6 CLL patients were stimulated *ex vivo* with anti-IgM, CD40L, IL-4 and IL-21, with or without a specific JAK3 inhibitor (PF-956980), or with anti-IgM, CD40L and IL-21. After initial CFSE staining (at day 0), the percentage of cell proliferation was measured at day 6. Symbols (circle) represent UM ZAP+ CLL cells. 95% confidence interval for median is shown in each graph. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

and incubated for 20 min on ice in the dark. PI was then added for 5 min before flow cytometry analysis. DAPI (Sigma-Aldrich; Missouri, USA) was also used to analyze cell viability.

Western blotting. After stimulation, B cells were centrifuged and cell pellets re-suspended in lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl [pH 8], 130 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, and protease inhibitors) for 20 minutes on ice. Lysates were centrifuged for 10 minutes at 300 g at 4°C, and supernatants subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were then blocked using 5% milk in Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl) for 1 h at room temperature. The blots were then incubated with anti-ZAP70 (Clone E267) (Abcam, Paris, France), anti-phospho ZAP70³¹⁹ (Abcam, Paris,

France) - which recognizes also SYK^{Tyr352} phosphorylation in CLL B cells⁴⁶ -, anti-phospho-SYK^{Tyr323} (Santa Cruz, Nanterre, France), anti-phospho-ERK1/2^{Tyr204} (clone E-4) (Santa Cruz, Nanterre, France), for 2 h at room temperature, anti-phospho-STAT6^{Tyr641} (Cell Signaling, France), anti-phospho-AKT^{Thr308} (clone D25E6) (Cell Signaling), anti-phospho-IkB^{Ser32/36} (clone 5A5) (Cell Signaling), anti-phospho-STAT3^{Tyr705} (clone EP2147Y) (GeneTex), anti-STAT3 (clone 79D7) (Cell Signaling) overnight at 4 °C, followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG or anti-rabbit monoclonal antibodies (1 h at 25 °C), and revealed by Electro Chemo Luminescence (ECL Plus Western blotting Detection Reagents (Amersham, Courtaboeuf, France) or SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate (Pierce, Courtaboeuf, France), according to manufacturers' instructions. To confirm the presence of equal amounts of loaded proteins, membranes were incubated with anti-Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, clone 6C5) (Merck Millipore, Guyancourt, France). Signals were visualized by chemiluminescence and processed by the Image Lab™ software (BioRad, Marnes-la Coquette, France). The relative intensity of bands was measured and calculated using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). The abundance of each protein has been normalized to GAPDH within the same sample on the same western blot.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using R 3.2.4 (R Core Team, 2016, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Graphics were created using Graphpad Prism 7.0 (Graphpad Software; Inc, La Jolla, CA, USA). We used permutational ANOVA for repeated measurements (lmPerm R package, <https://github.com/mtorchiano/lmPerm>) to compare more than two groups. Posthoc tests were done using nonparametric multiple comparisons tests carried out with the nparcomp R package⁵¹. Differences between two groups were assessed using either nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank test of nonparametric Mann-Whitney test (unpaired, when applicable). A p value of <0.05 was considered statistically significant. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

References

- Chiorazzi, N., Rai, K. R. & Ferrarini, M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **352**, 804–815, <https://doi.org/10.1056/NEJMra041720> (2005).
- Fabbri, G. & Dalla-Favera, R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **16**, 145–162, <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.8> (2016).
- Puente, X. S. *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **475**, 101–105, <https://doi.org/10.1038/nature10113> (2011).
- Messmer, B. T. *et al.* Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* **200**, 519–525, <https://doi.org/10.1084/jem.20040544> (2004).
- Fais, F. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* **102**, 1515–1525, <https://doi.org/10.1172/JCI3009> (1998).
- Stamatopoulos, K. *et al.* Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* **109**, 259–270, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-012948> (2007).
- Hoogbeem, R. *et al.* A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J Exp Med* **210**, 59–70, <https://doi.org/10.1084/jem.20121801> (2013).
- Dühren-von Minden, M. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* **489**, 309–312, <https://doi.org/10.1038/nature11309> (2012).
- Deglesne, P. A. *et al.* Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* **66**, 7158–7166, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0085> (2006).
- Chen, L. *et al.* ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **111**, 2685–2692, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-062265> (2008).
- Rassenti, L. Z. *et al.* ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **351**, 893–901 (2004).
- Lanham, S. *et al.* Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **101**, 1087–1093, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1822> (2003).
- Casola, S. *et al.* B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* **5**, 317–327 (2004).
- Burger, J. A. & Gandhi, V. The lymphatic tissue microenvironments in chronic lymphocytic leukemia: *in vitro* models and the significance of CD40-CD154 interactions. *Blood* **114**, 2560–2561; author reply 2561–2562, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-228981> (2009).
- Vallat, L. D., Park, Y., Li, C. & Gribben, J. G. Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood* **109**, 3989–3997, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-045377> (2007).
- Vallat, L. *et al.* Reverse-engineering the genetic circuitry of a cancer cell with predicted intervention in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 459–464, <https://doi.org/10.1073/pnas.121130110> (2013).
- Perrot, A. *et al.* A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **118**, e1–15, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-335125> (2011).
- Yoshida, T. *et al.* Rapid B cell apoptosis induced by antigen receptor ligation does not require Fas (CD95/APO-1), the adaptor protein FADD/MORT1 or CrmA-sensitive caspases but is defective in both MRL-+/+ and MRL-lpr/lpr mice. *International immunology* **12**, 517–526 (2000).
- Zupo, S. *et al.* Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD. *Blood* **95**, 1199–1206 (2000).
- Petlickovski, A. *et al.* Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **105**, 4820–4827, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2669> (2005).
- Buske, C. *et al.* Stimulation of B-chronic lymphocytic leukemia cells by murine fibroblasts, IL-4, anti-CD40 antibodies, and the soluble CD40 ligand. *Experimental hematology* **25**, 329–337 (1997).
- Pascutti, M. F. *et al.* IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood* **122**, 3010–3019, <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-467670> (2013).
- Ahearne, M. J. *et al.* Enhancement of CD154/IL4 proliferation by the T follicular helper (Tfh) cytokine, IL21 and increased numbers of circulating cells resembling Tfh cells in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **162**, 360–370, <https://doi.org/10.1111/bjh.12401> (2013).
- de Toter, D. *et al.* The opposite effects of IL-15 and IL-21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways. *Blood* **111**, 517–524, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-087882> (2008).

25. Fluckiger, A. C. *et al.* Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood* **80**, 3173–3181 (1992).
26. Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C. & Stryckmans, P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* **91**, 2387–2396 (1998).
27. Plander, M. *et al.* Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established *in vitro* model for pseudofollicles. *Leukemia* **23**, 2118–2128, <https://doi.org/10.1038/leu.2009.145> (2009).
28. Patten, P. E. *et al.* CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* **111**, 5173–5181, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-108605> (2008).
29. Os, A. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells are activated and proliferate in response to specific T helper cells. *Cell Rep* **4**, 566–577, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.011> (2013).
30. Asslaber, D. *et al.* Mimicking the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia - where does the journey go? *Br J Haematol* **160**, 711–714, <https://doi.org/10.1111/bjh.12151> (2013).
31. Decker, T. *et al.* Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **95**, 999–1006 (2000).
32. Hamilton, E. *et al.* Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* **158**, 589–599, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09191.x> (2012).
33. Kater, A. P. *et al.* CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack. *Br J Haematol* **127**, 404–415, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05225.x> (2004).
34. de Toter, D. *et al.* Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **107**, 3708–3715, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3535> (2006).
35. Lutzny, G. *et al.* Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells *in vivo*. *Cancer cell* **23**, 77–92, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.003> (2013).
36. Wagner, M. *et al.* Integration of innate into adaptive immune responses in ZAP-70-positive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **127**, 436–448, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-646935> (2016).
37. Graham, J. P., Arcipowski, K. M. & Bishop, G. A. Differential B-lymphocyte regulation by CD40 and its viral mimic, latent membrane protein 1. *Immunological reviews* **237**, 226–248, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00932.x> (2010).
38. Ul-Haq, Z., Naz, S. & Mesaik, M. A. Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine & growth factor reviews* **32**, 3–15, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.04.002> (2016).
39. Aguilar-Hernandez, M. M. *et al.* IL-4 enhances expression and function of surface IgM in CLL cells. *Blood* **127**, 3015–3025, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-682906> (2016).
40. Spolski, R. & Leonard, W. J. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nature reviews. Drug discovery* **13**, 379–395, <https://doi.org/10.1038/nrd4296> (2014).
41. Caligaris-Cappio, F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **123**, 380–388 (2003).
42. Smit, L. A. *et al.* Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity. *Blood* **109**, 1660–1668, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-021683> (2007).
43. Herishanu, Y. *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563–574, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284984> (2011).
44. Bagnara, D. *et al.* A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood* **117**, 5463–5472, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324210> (2011).
45. Chen, L. *et al.* ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **105**, 2036–2041, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-1715> (2005).
46. Gobessi, S. *et al.* 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, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-011759> (2007).
47. Slinger, E., Thijsen, R., Kater, A. P. & Eldering, E. Targeting antigen-independent proliferation in chronic lymphocytic leukemia through differential kinase inhibition. *Leukemia* **31**, 2601–2607, <https://doi.org/10.1038/leu.2017.129> (2017).
48. van Dongen, J. J. *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* **17**, 2257–2317, <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202> (2003).
49. Letestu, R. *et al.* Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process. *Cytometry B Clin Cytom* **70**, 309–314, <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20132> (2006).
50. Dohner, H. *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **343**, 1910–1916 (2000).
51. Konietzschke, E., Placzek, M., Schaarschmidt, F. & Hothorn, L. A. nparcomp: An R Software Package for Nonparametric Multiple Comparisons and Simultaneous Confidence Intervals. *Journal of statistical software* **64**, <https://doi.org/10.18637/jss.v064.i09> (2015).
52. Dame, R. N. *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840–1847 (1999).

Acknowledgements

We would like to thank Drs Fanny Baran-Marszak, Frédéric Davi, Jean-Noël Freund, Delphine Rolland, Paolo Ghia and Robert Zeiser for critical reading of this manuscript. We are grateful to Drs Anne-Cécile Galois and Carine Gervais (Laboratoire d'Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France) for cytology analysis, Beatrice Uring-Lambert (Laboratoire d'Immunologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France) for help with flow cytometry, Laurent Mailly (INSERM UMR_S 1110, Strasbourg, France) for access to the cell irradiation platform, Shanti Amé and Blandine Guffroy (Service d'Hématologie Adulte, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France) for providing CLL samples, Manuela Tavian (INSERM UMR_S 949, Etablissement Français du Sang Grand Est, Strasbourg, France), Anne-Sophie Korganow (CNRS UPR9021, Strasbourg, France), Cendrine Seguin (CNRS UMR 7199, Illkirch, France) and Jozo Delic (Commissariat à l'Énergie Atomique, Fontenay-aux-roses, France) for helpful suggestions and Ms Nathalie Perrusson (Laboratoire d'Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France) for technical help. This work was supported by grants from the Institut Thématique Multi-Organisme (ITMO) cancer initiative within the framework plan cancer 2009–2013 “GenPred project”, Initiative d'Excellence-CNRS, the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), Alsace Cancer association, the Genomax, the Strasbourg School of Medicine Next Generation Sequencing center, the Institut Universitaire de France (IUF), the Ligue contre le Cancer and the LABEX Transplantex [ANR-11-LABX-0070_Transplantex] (French National Research Agency; ANR), INSERM UMR_S1109 and UMR_S1113.

Author Contributions

C.S., W.I. and O.T., S.F., Y.G. performed experiments, analyzed data and reviewed the manuscript. L.M., C.M.R. and L.M. performed C.L.L. cells biological characterization and reviewed the manuscript. L.M.F., E.T. and R.H. provided C.L.L. samples, clinical information and reviewed the manuscript. F.B. and M.M.B. performed statistical analysis. S.B. analyzed the data. T.M., P.G., S.B. wrote the manuscript. L.V. designed and supervised the study, analyzed data and wrote the manuscript. All authors read and concurred with the manuscript and its contents.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36853-8>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation ex vivo

Cedric Schleiss^{1,2*}, Wassila Ilias^{1,2*}, Ouria Tahar^{1,2,3}, Yonca Güler⁴, Laurent Miguet^{4,5}, Caroline Mayeur-Rousse^{4,5}, Laurent Mauvieux^{4,5}, Luc-Matthieu Fomecker^{4,6}, Elise Toussaint^{4,6}, Raoul Herbrecht^{4,6}, Frederic Bertrand^{2,7}, Myriam Maumy-Bertrand^{2,7}, Thierry Martin^{2,8}, Sylvie Fournel⁹, Philippe Georget^{1,2}, Seiamak Bahram^{1,2,3**}, Laurent Vallat^{1,2,3*** **}

¹ Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR-S1109, LabEx Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

² Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

³ Laboratoire d'Immunologie, Plateau Technique de Biologie, Pôle de Biologie, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

⁴ Université de Strasbourg, INSERM, IRFAC UMR-S1113, Strasbourg, France

⁵ Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

⁶ Service d'Hématologie Adulte, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

⁷ Institut de Recherche Mathématique Avancée IRMA, CNRS UMR 7501, Strasbourg, France

⁸ CNRS UPR 9021 - Immunologie et Chimie Thérapeutiques, Institut de Biologie Moléculaire et cellulaire (IBMC), Strasbourg, France

⁹ CNRS UMR7199, Université de Strasbourg, Illkirch, France

* equal contributions.

** corresponding authors: Seiamak Bahram siamak@unistra.fr; Laurent Vallat vallat@unistra.fr

*** current address: Université de Strasbourg, INSERM, IRFAC UMR-S1113, and Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

Supplemental figures

Figure 51

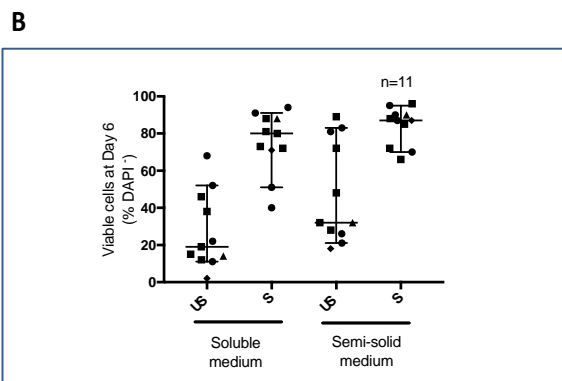
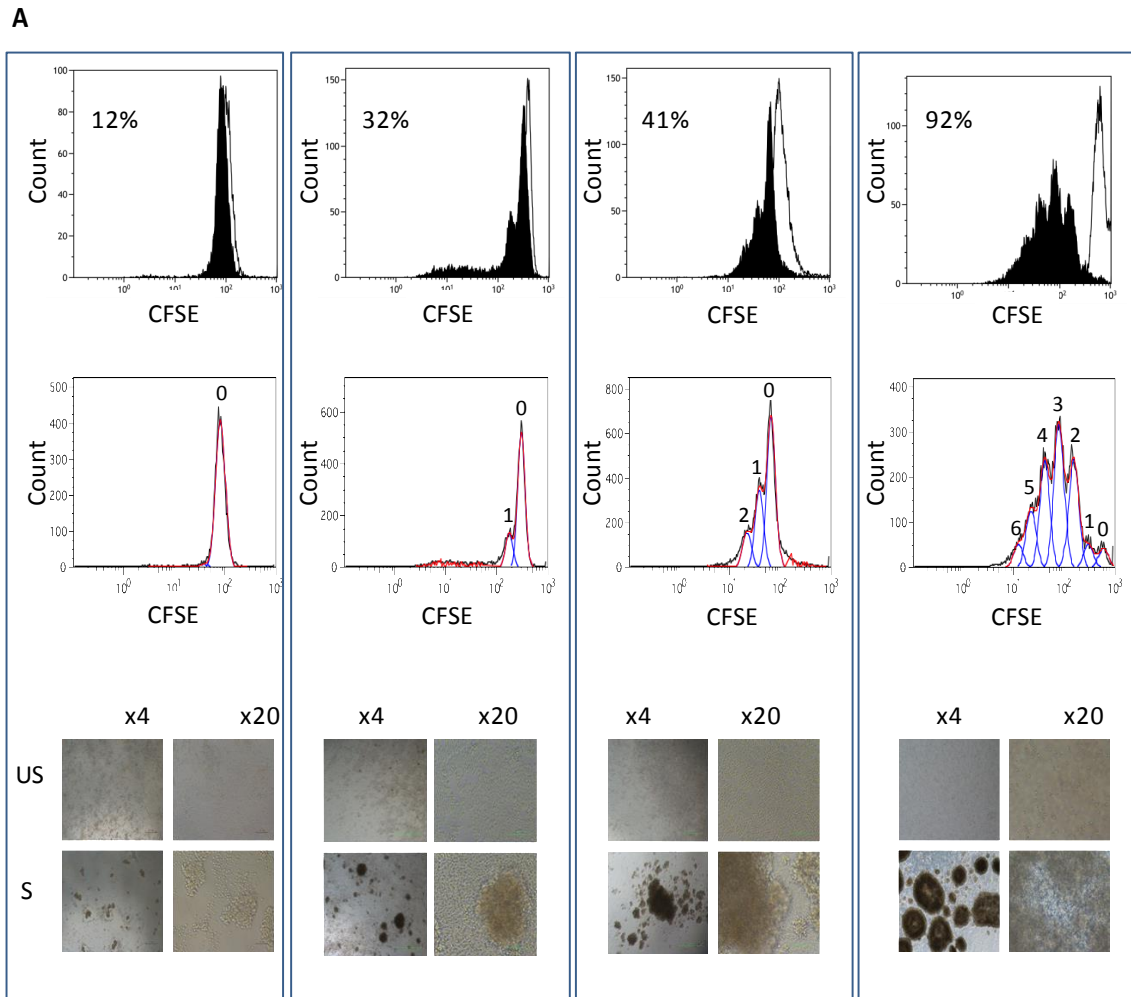


Figure S2

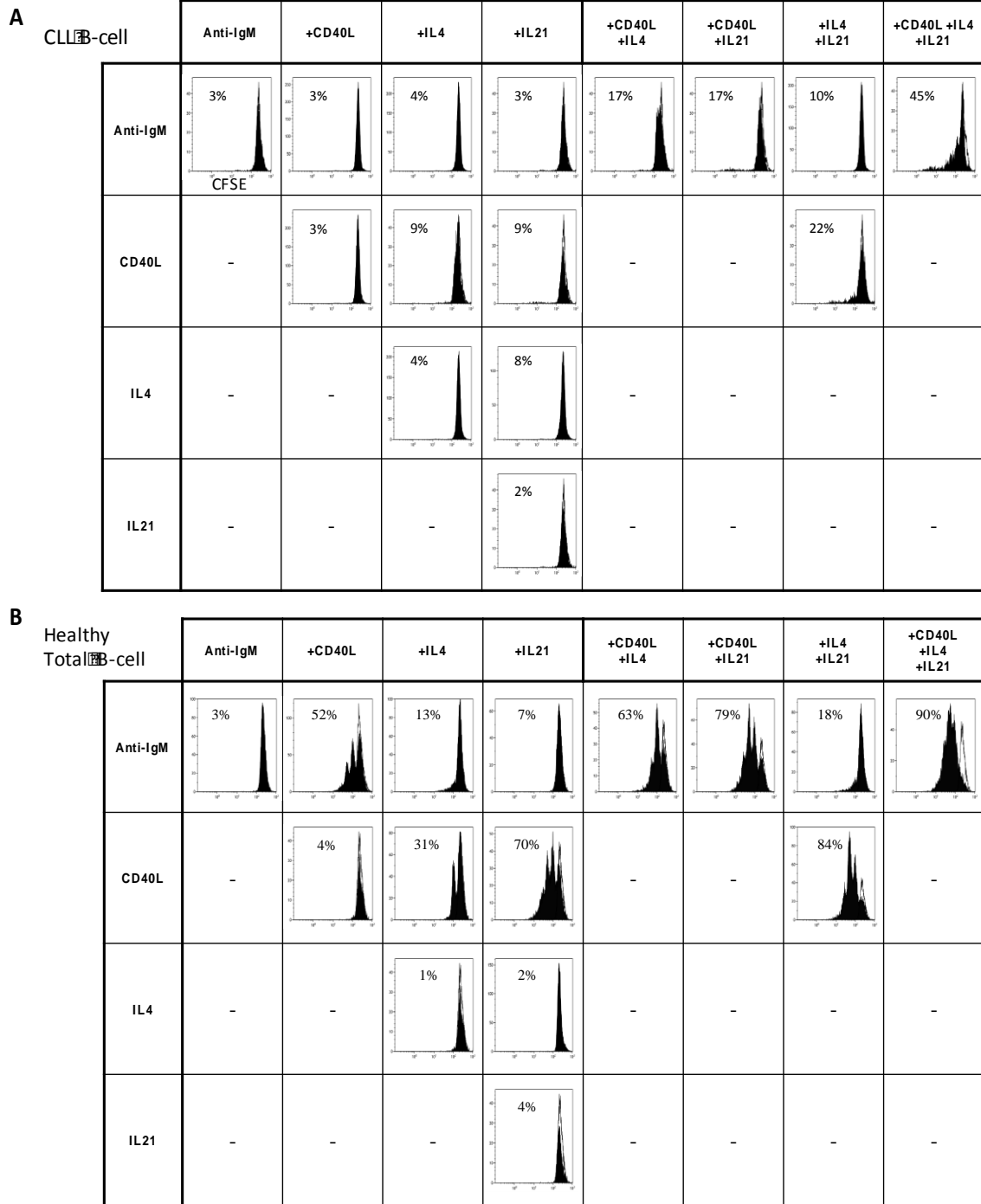


Figure S3

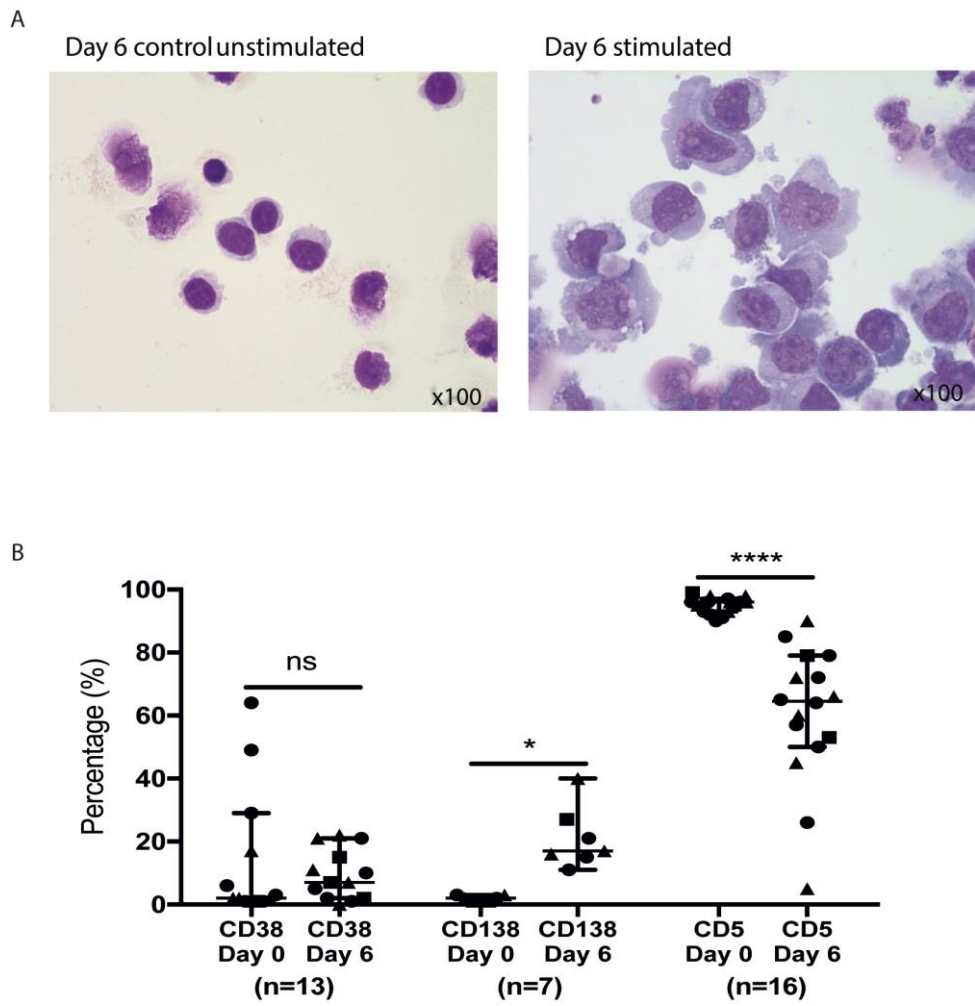


Figure 34

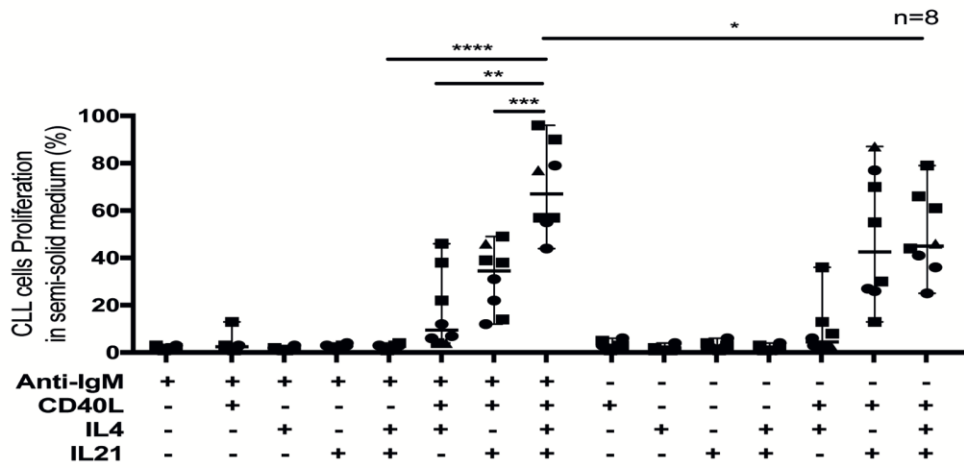


Figure 55

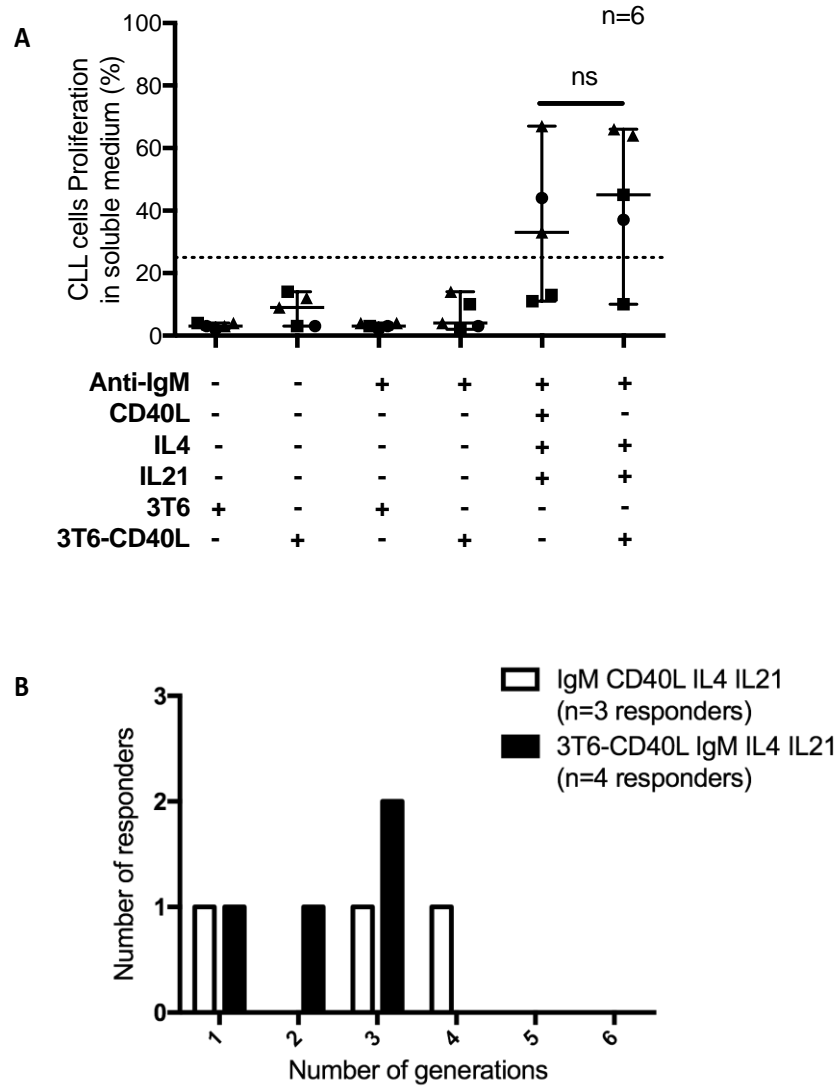


Figure 56

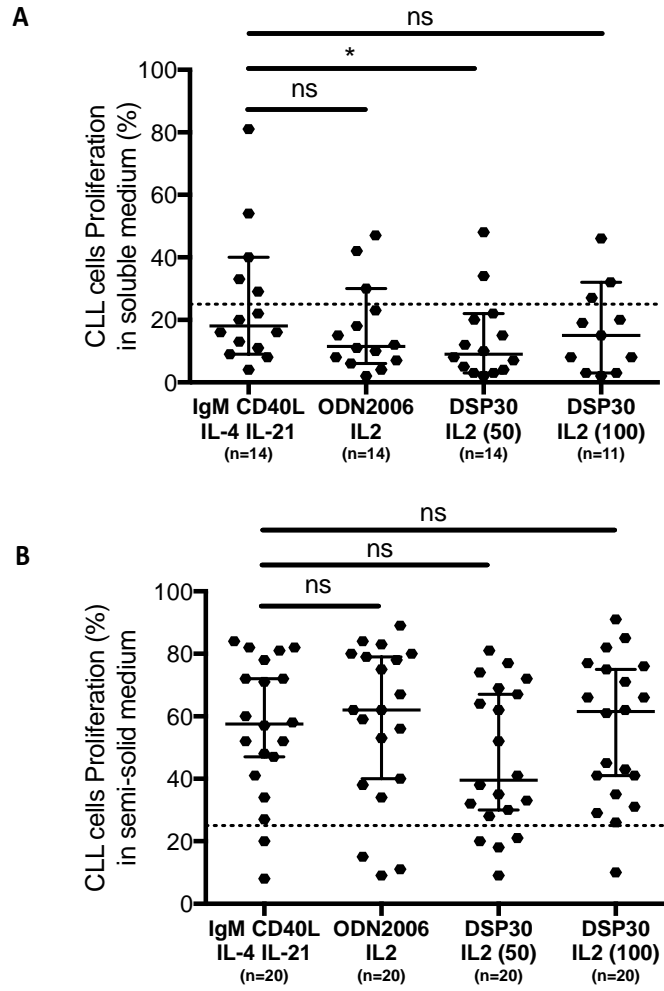


Figure 57

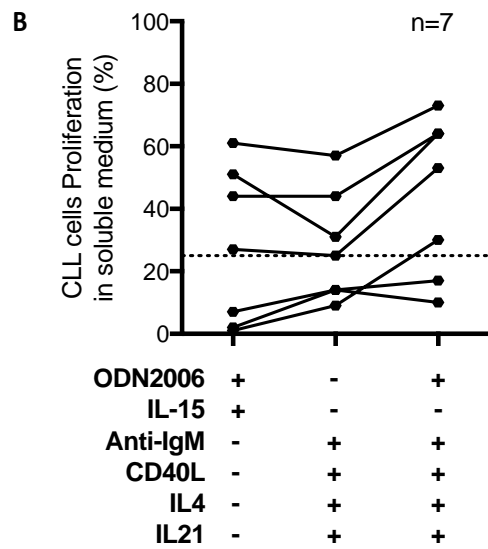
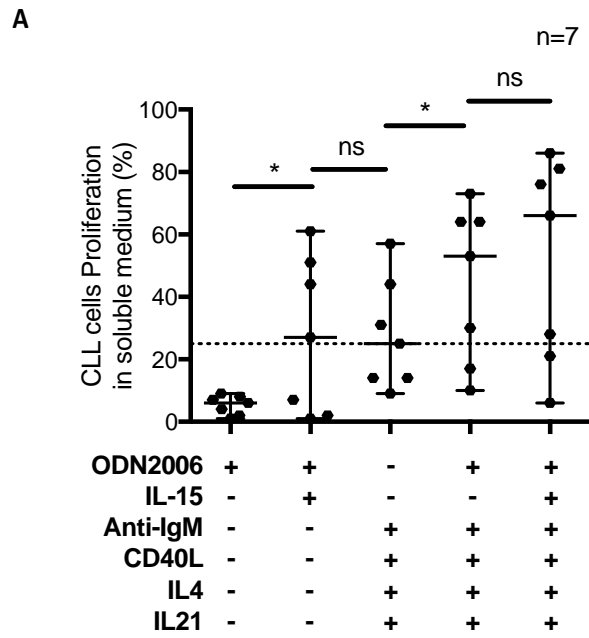


Figure S8 A

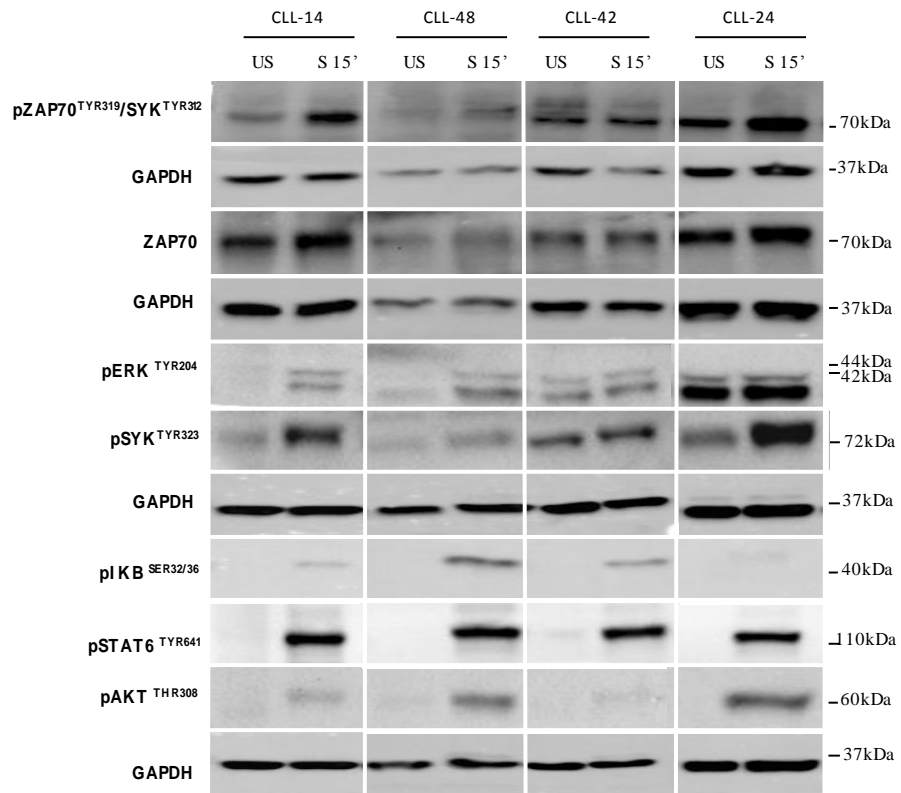


Figure S8 B

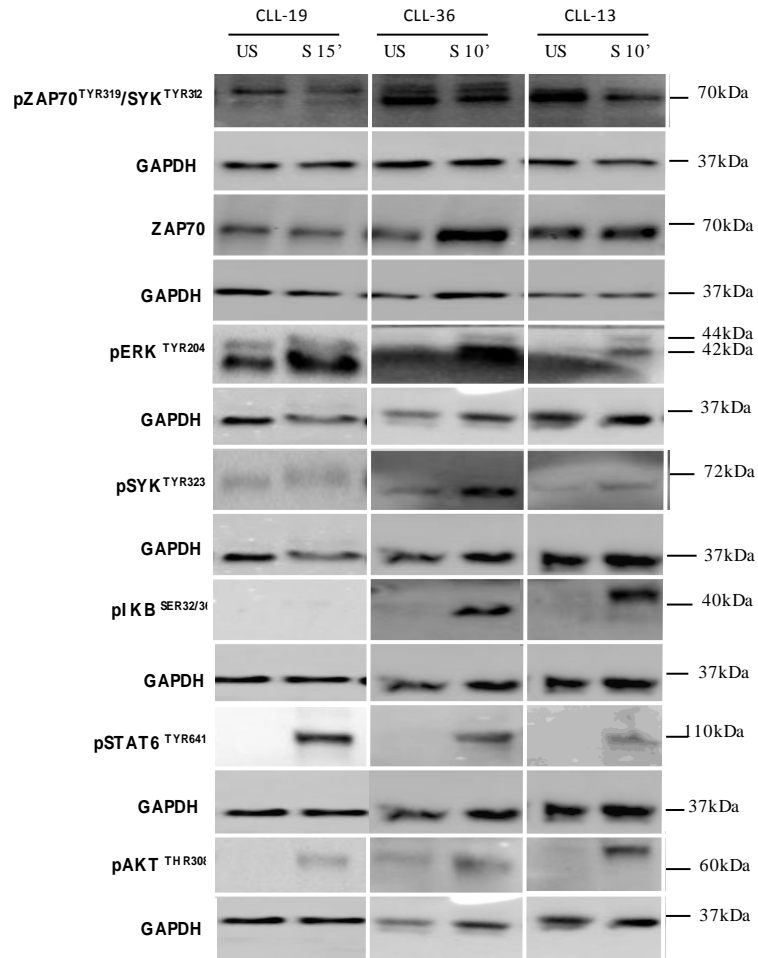
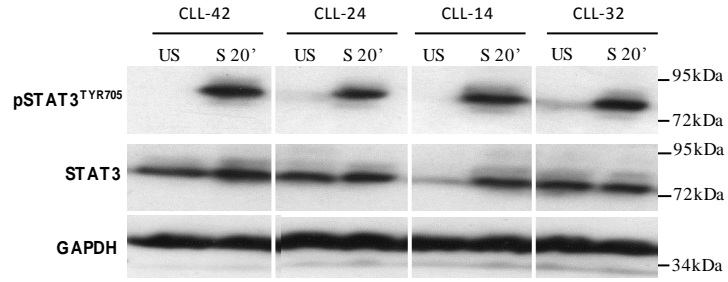
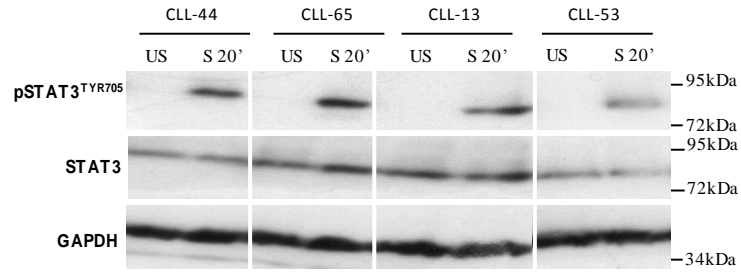


Figure S9

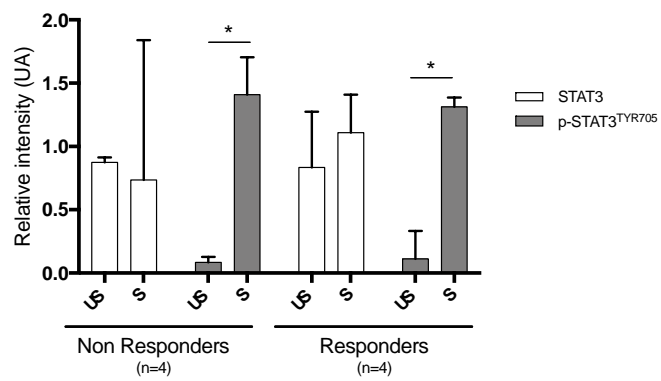
A



B



C



Supplemental figure legends

Figure S1: Proliferation of CLL cells at day 6 after [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation. (A) CLL cells are stimulated after initial CFSE staining at day 0. At day 6, flow cytometry analysis shows a repartition of the initial CFSE staining in the daughter cells populations, which permits the quantification of the number of generations. From left to right, representative examples of non-responding (non-proliferating), and responding (proliferating) CLL cell samples with 1, 2 or 6 generations at day 6. For each case, cell generations numbering is detailed. The pictures below show clusters of proliferating cells (magnifications x4 and x20) for stimulated (S) in lower line, and control unstimulated (US) CLL cells in upper line, at day 6 after stimulation. **(B)** Percentage of viable cells analyzed by flow cytometry after DAPI staining at day 6 in stimulated (S) and control unstimulated (US) CLL cells in soluble and semi-solid medium. Symbols represent CLL cells sub-types (circle: UM ZAP+; triangle: M ZAP+; square: M ZAP-).

Figure S2: Determination of the optimal culture conditions inducing CLL cells proliferation. (A) Different combinations of soluble culture conditions were tested on CLL and **(B)** healthy B cells in order to establish optimal culture conditions. Identical samples were subjected to all the conditions. Proliferation is measured at day 6 after initial CFSE staining at day 0. The percentage of dividing cells is indicated for each condition for representative CLL and healthy cells samples.

Figure S3: Morphology of CLL cells after soluble [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation. (A) A cytologic analysis, after cytocentrifugation, of control unstimulated cells and stimulated cells (at day 6) are shown for a representative CLL proliferating (responders) CLL

cells (magnification x100). **(B)** Flow cytometry analysis of CLL cells before and after combined soluble anti-IgM, CD40L, IL-4 and IL-21 stimulation. Percentage of CD38, CD138 and CD5 positive cells at day 6 after *ex vivo* stimulation in proliferating (responders) CLL cells are shown. 95% confidence interval for median is shown in each graph. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Figure S4: Proliferative response of CLL cells in semi-solid medium *ex vivo*. Effect of BCR and cytokines stimulation, isolated or in combination, on the proliferation of cells harvested from CLL patients and cultured in semi-solid medium (n=8; CLL samples # 20, 14, 24, 42, 49, 50, 52 and 62). After initial CFSE staining at day 0, the percentage of dividing cells (CFSE^{dim}) were evaluated by flow cytometry at day 6. 95% confidence interval for median is shown in each group. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Figure S5: Effect of 3T6-CD40L transfected cells on CLL cells proliferation.

(A) Cells isolated from CLL patients (n=6) were stimulated either with anti-IgM, or IL4 + IL-21, or anti-IgM + IL-4 + IL-21, in the presence of soluble CD40L and cocultured with 3T6 cells or 3T6-CD40L transfected cells. 95% confidence interval for median is shown in each group. **(B)** For the responding (proliferating) CLL cells, the number of cell generations after anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 or anti-IgM + 3T6-CD40L + IL-4 + IL-21 stimulation was evaluated.

Figure S6: Comparison of TLR9 + IL-2 and anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 stimulation on CLL cells. **(A)** CLL cells were stimulated either with IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 or CpG-ODN2006 + IL-2 or Premix AmpliB DSP30 + IL-2 (50µl or 100µl/10⁶ cells). After initial CFSE staining (day 0), the percentage of cell proliferation (CFSE^{dim}) was measured at day 6 in soluble medium, and **(B)** in semi-solid medium. 95% confidence interval for median is shown in each group. * p<0.05.

Figure S7. IL-15 additive effect on CLL cells proliferation. (A) Selected CLL cells were stimulated ex vivo with CpG-ODN2006, or CpG-ODN2006 + IL-15, or anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21, or a combination of CpG-ODN2006 + anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 with or without IL-15. Cell proliferation was measured at day 6 after initial (day 0) CFSE staining. 95% confidence interval for median is shown in each group. * $p < 0.05$. **(B)** CLL cells proliferation for 6 samples stimulated by various combinations: CpG-ODN2006 + IL-15, anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 or CpG-ODN2006 + anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21.

Figure S8: Signaling pathways activated by [anti-IgM + CD40L + IL-4] stimulation. (A) Representative Western blot showing expression of ZAP70, phospho-ZAP70/SYK, phospho-SYK, phospho-AKT, phospho-ERK, phospho-IKB, phospho-STAT6 and GAPDH (as loading control), before (unstimulated) and 15 minutes after anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 stimulation for proliferating (n=4) and **(B)** non-proliferating (n=3) UM-CLL ZAP+ CLL cells.

Figure S9: Signaling pathway activated by [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation. (A) Western blot showing expression of STAT3, phospho-STAT3 and GAPDH (as loading control), before (unstimulated) and 20 minutes after IL-21 addition at day 1 (following initial anti-IgM + CD40L + IL-4 stimulation at day 0) for proliferating (n=4) and **(B)** non-proliferating (n=4) UM-CLL ZAP+ CLL cells. **(C)** STAT3 and p-STAT3 protein expression normalized to that of GAPDH (determined with ImageJ). 95% confidence interval for median is shown in each group. * $p < 0.05$.

**Supplementary full-length blots
for reviewing purpose.**

Figure S8 A

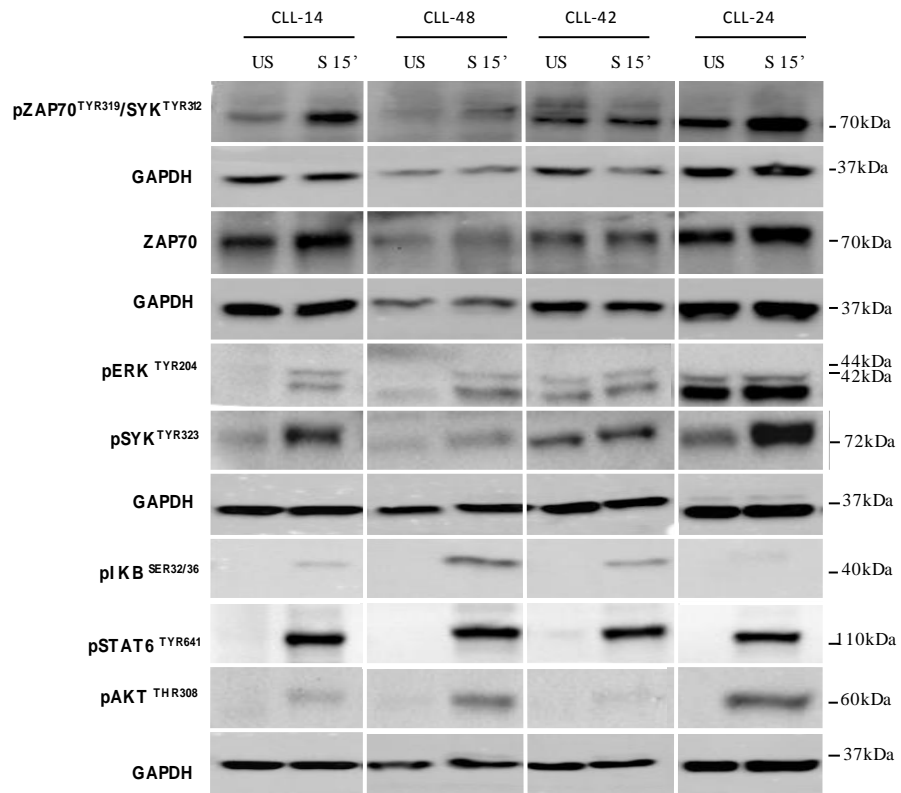
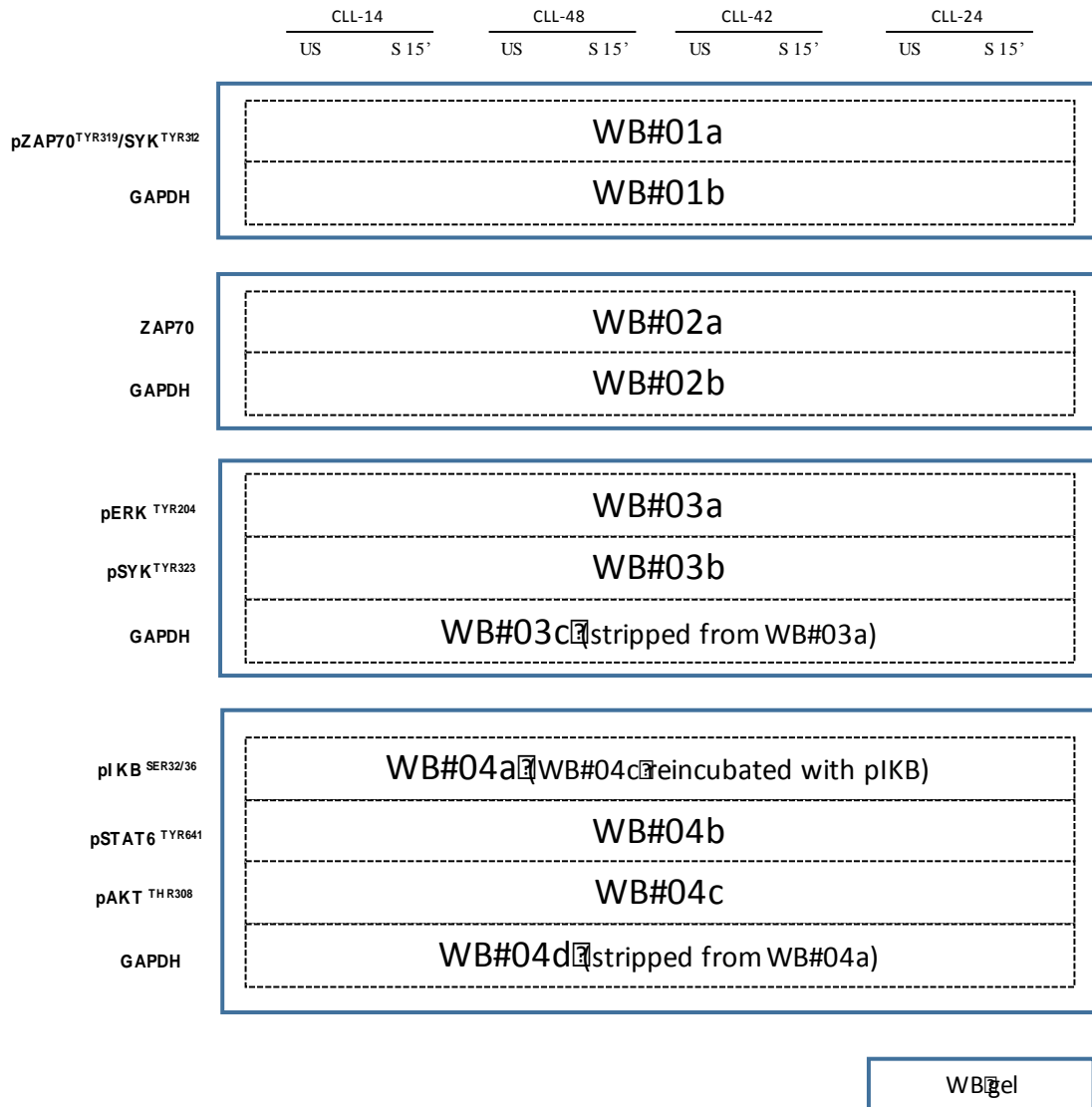
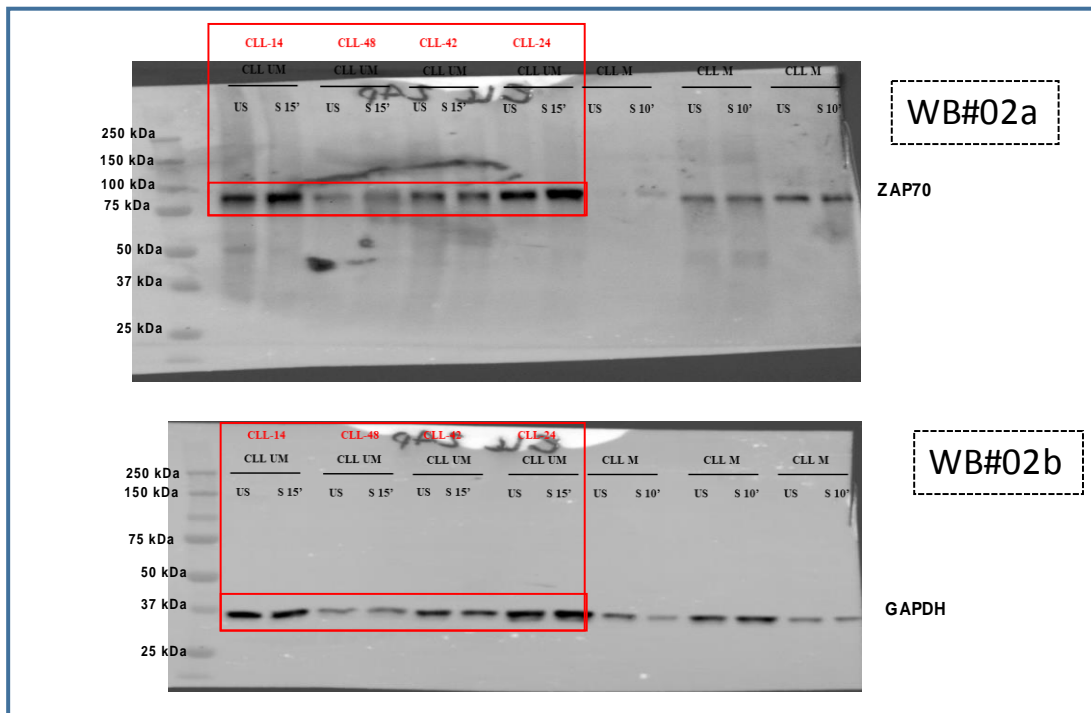
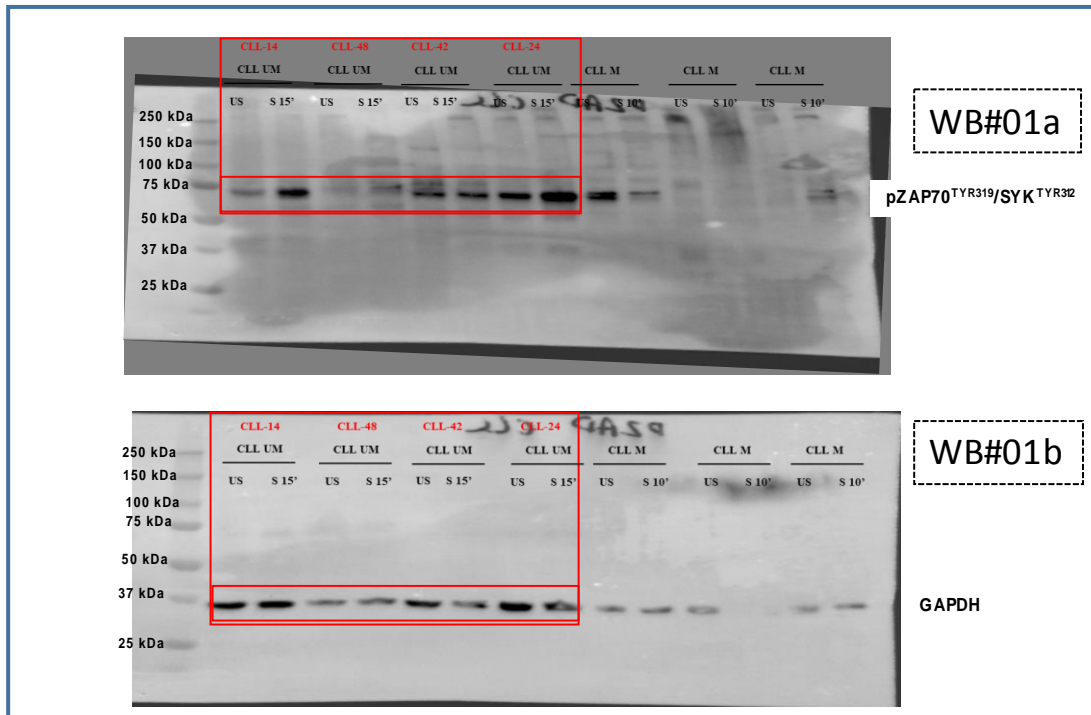


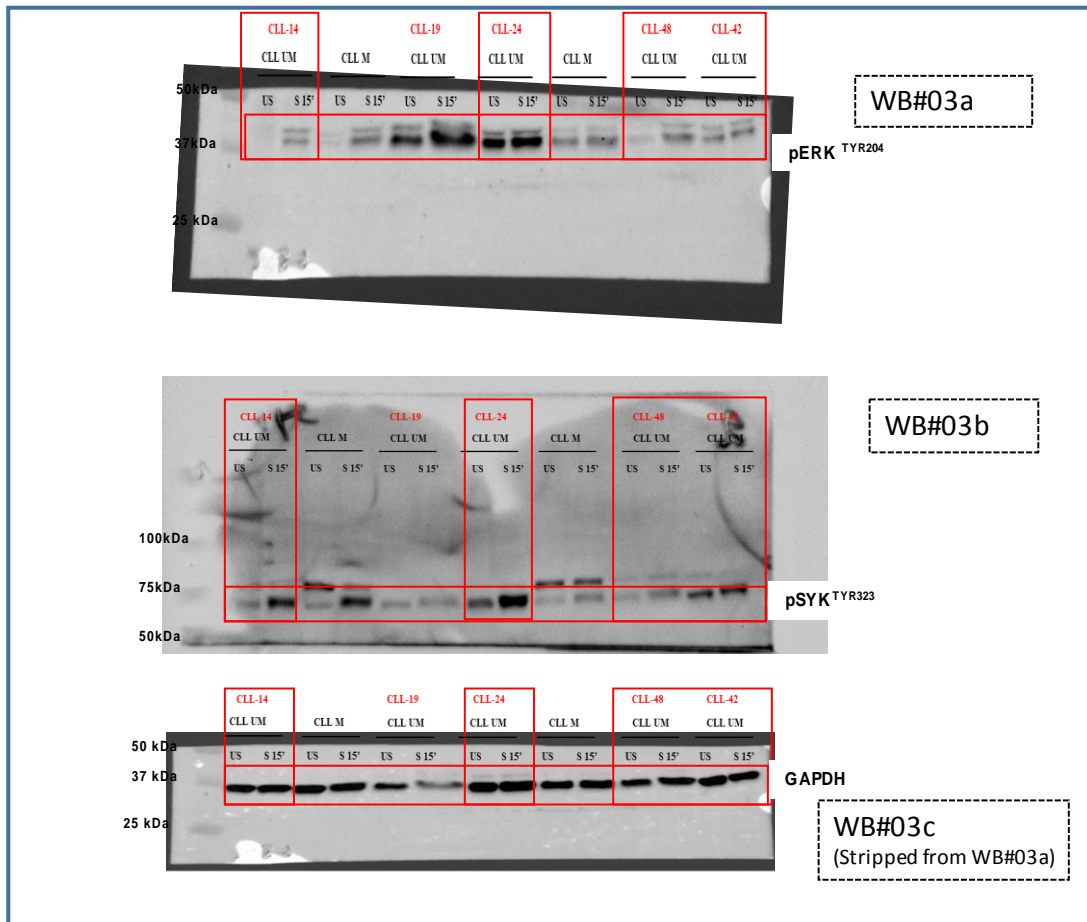
Figure S8 A



Résultats



Résultats



Résultats

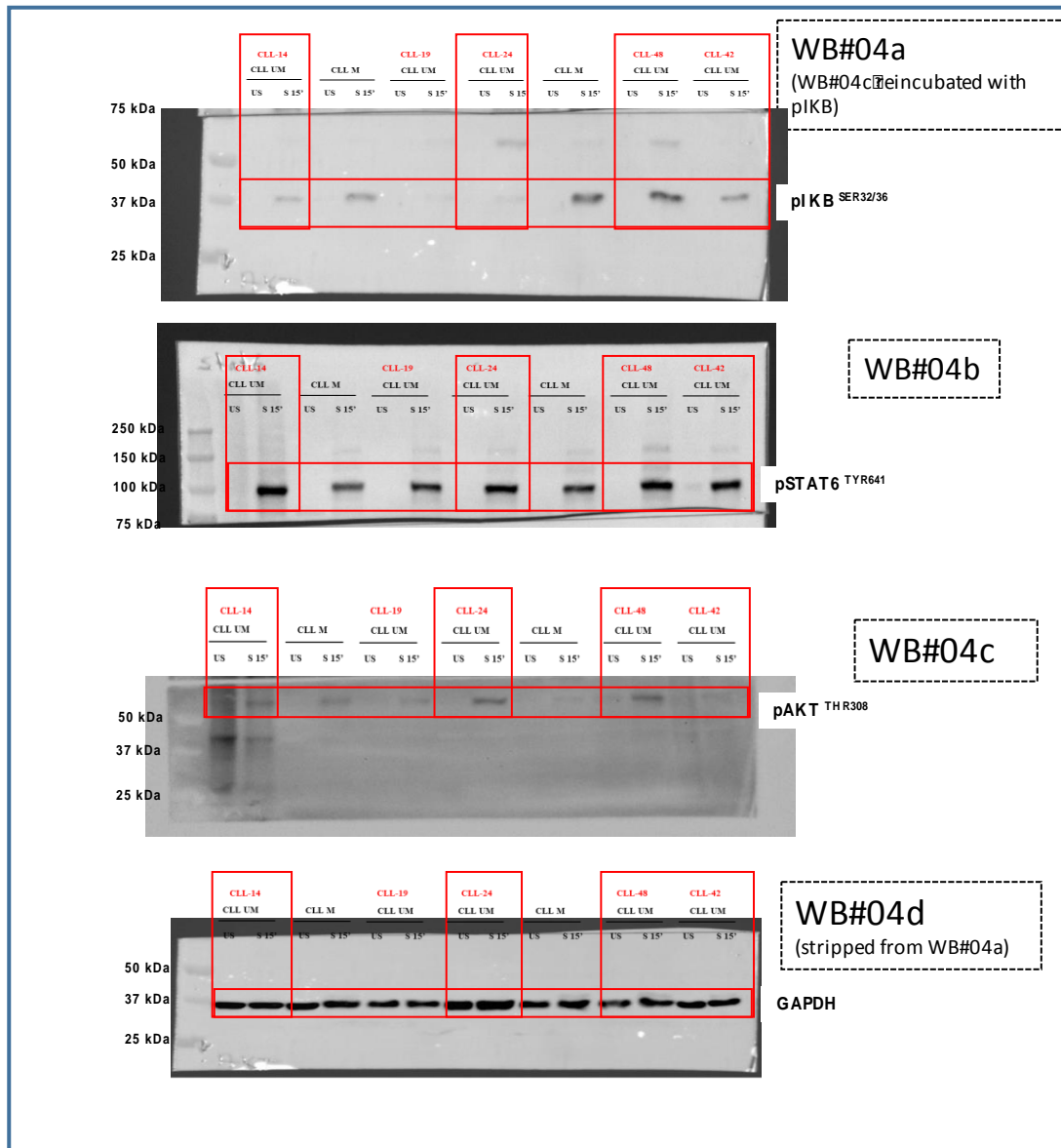


Figure S8 B

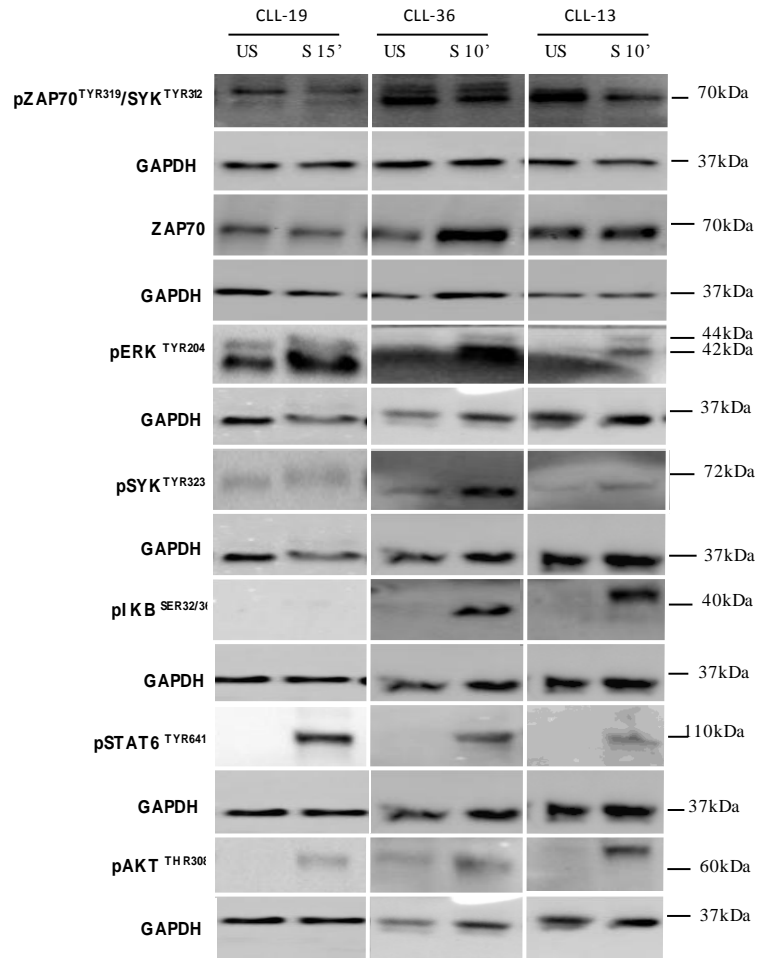
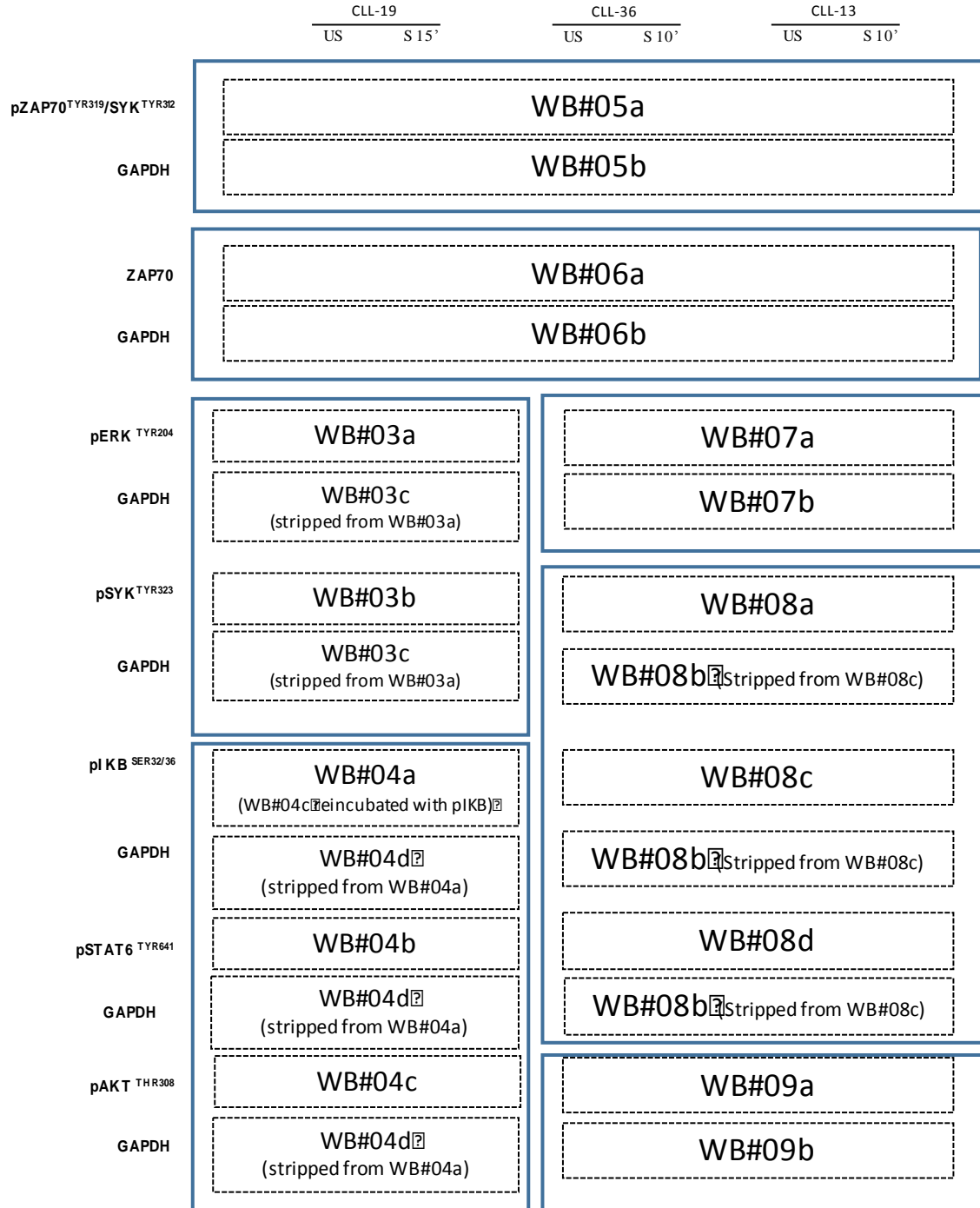
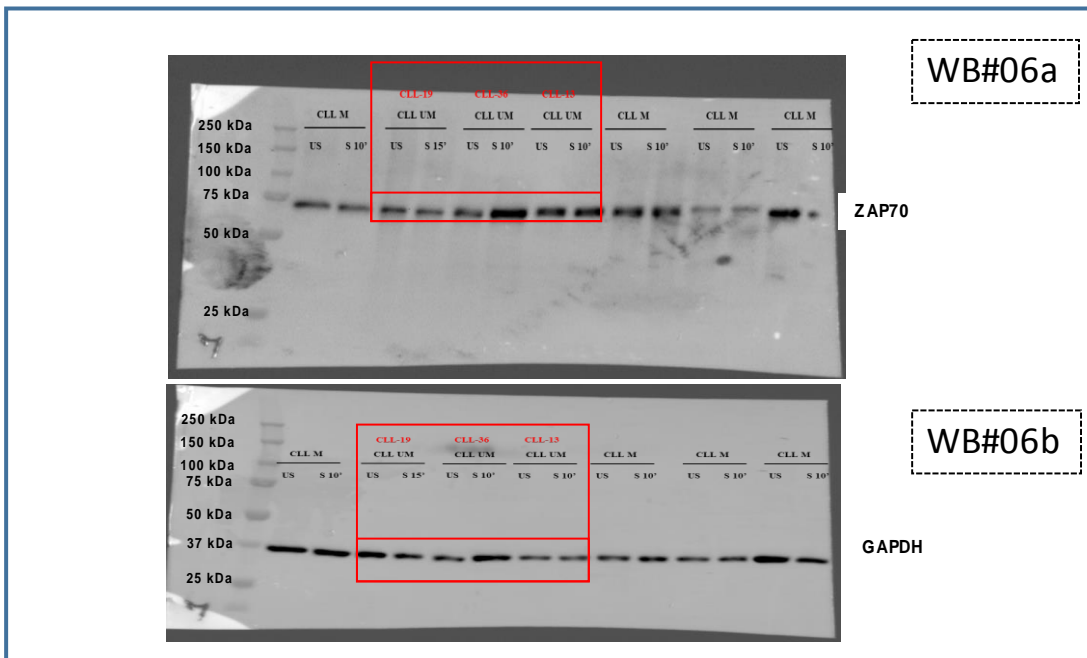
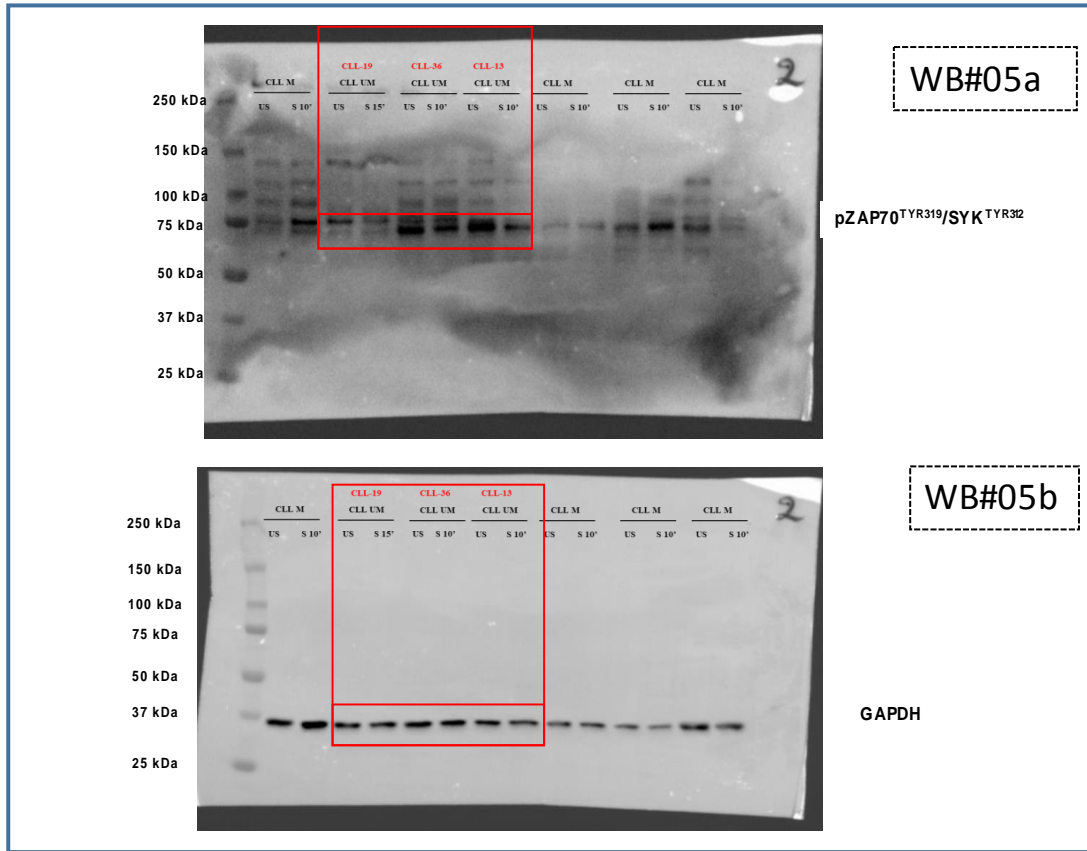
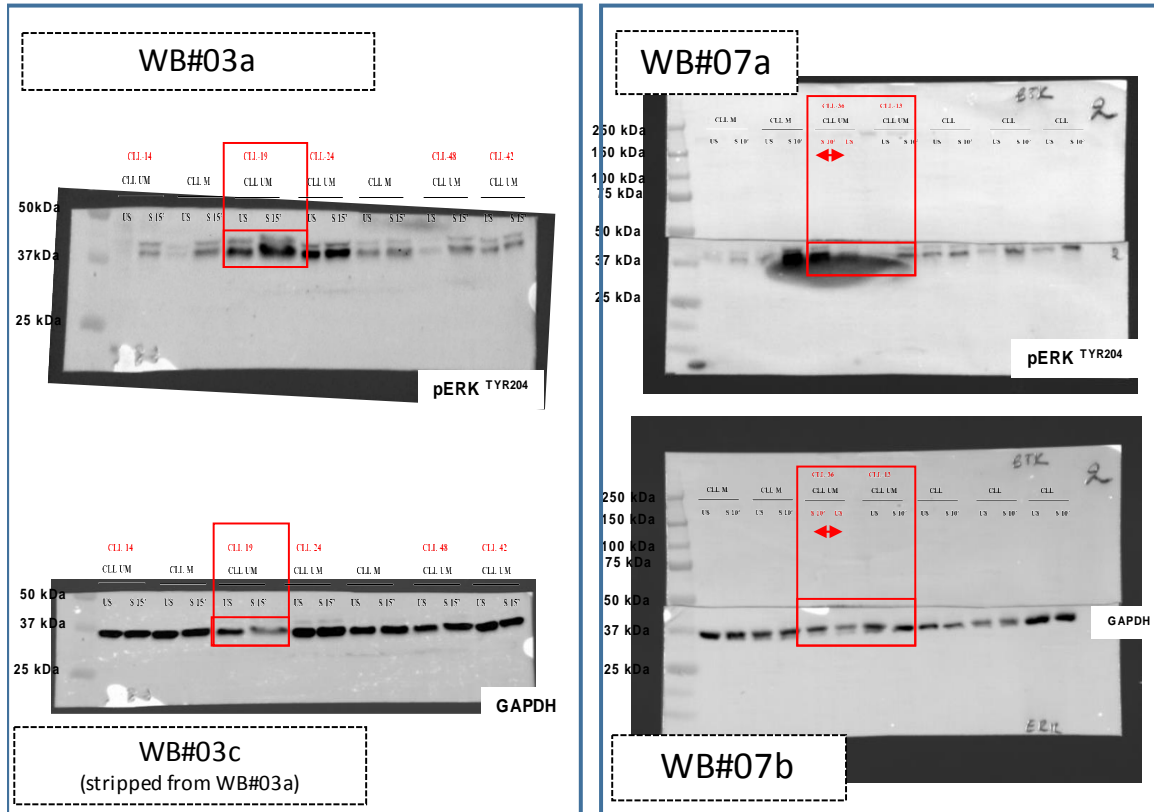


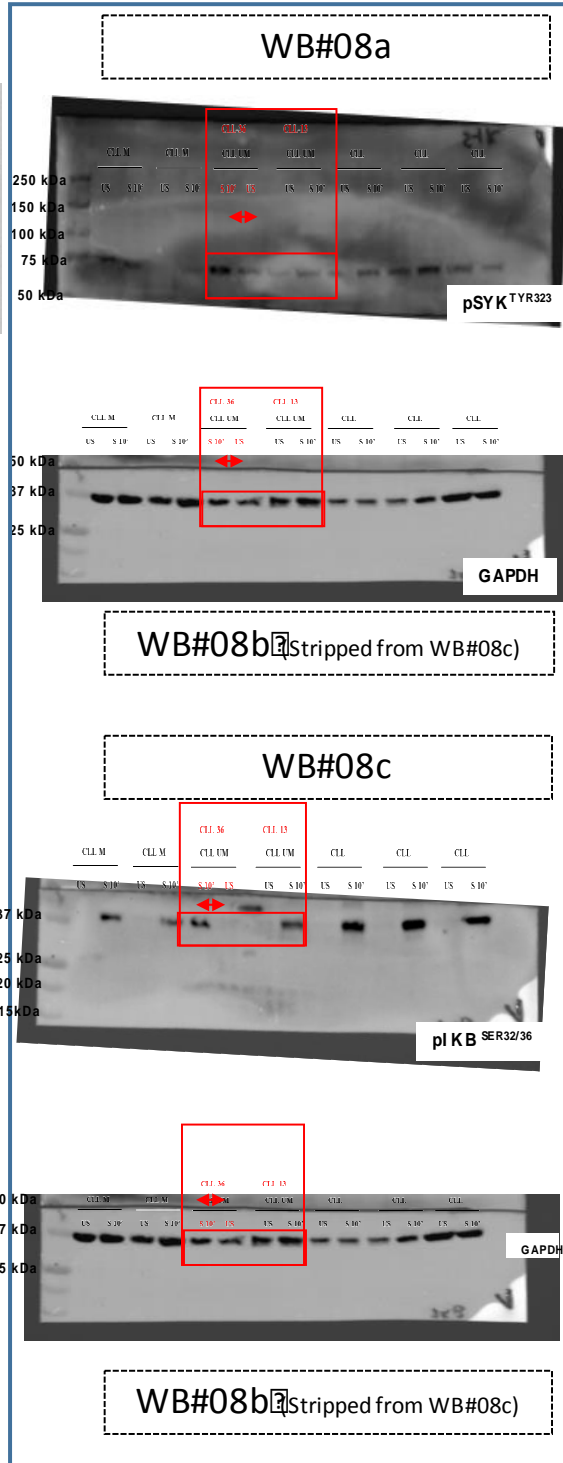
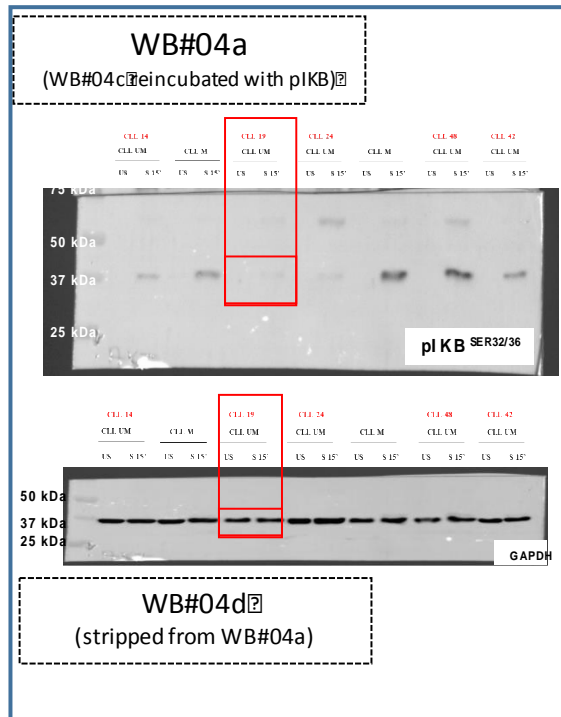
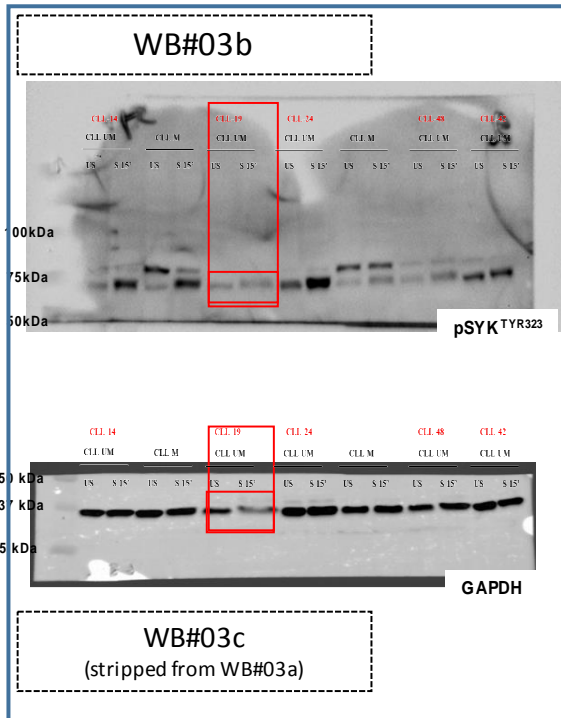
Figure S8 B



Résultats







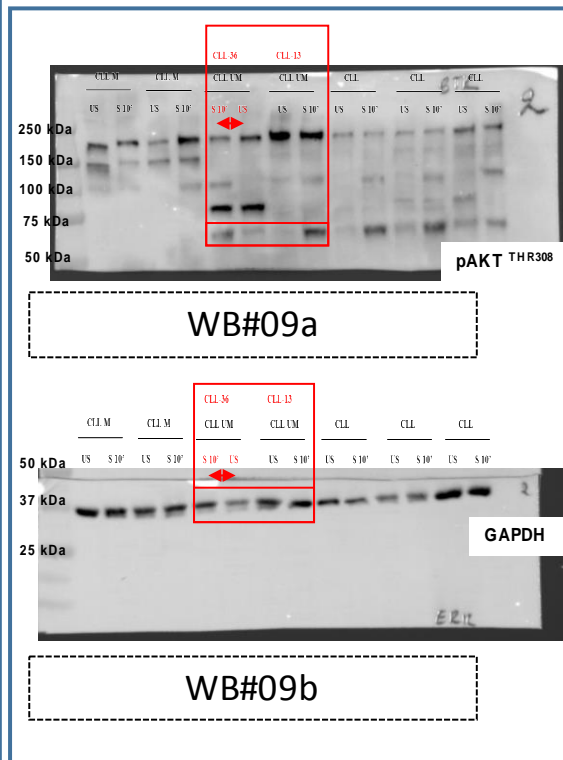
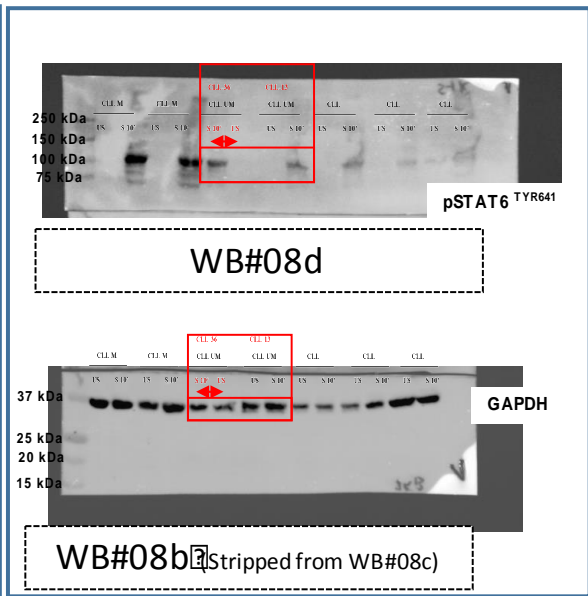
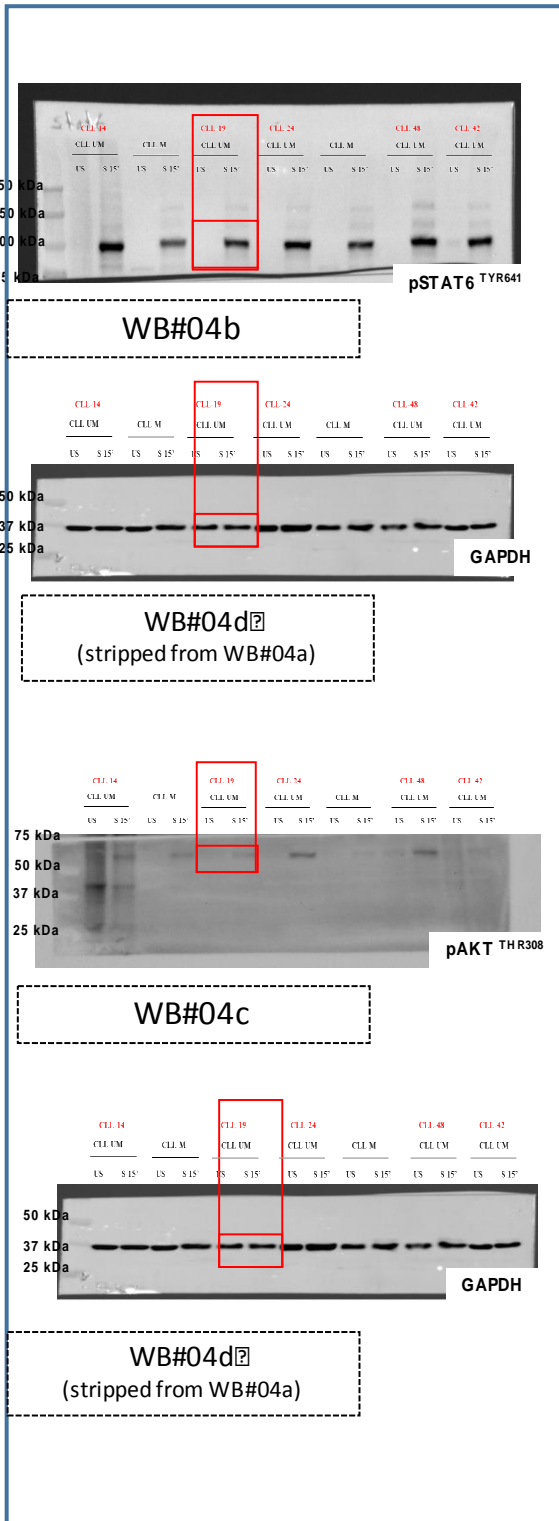
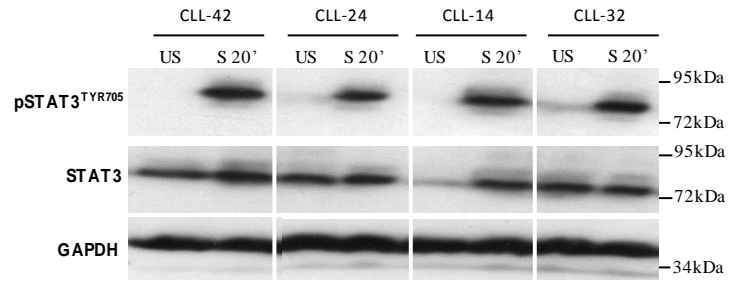


Figure S9 A

A



Résultats

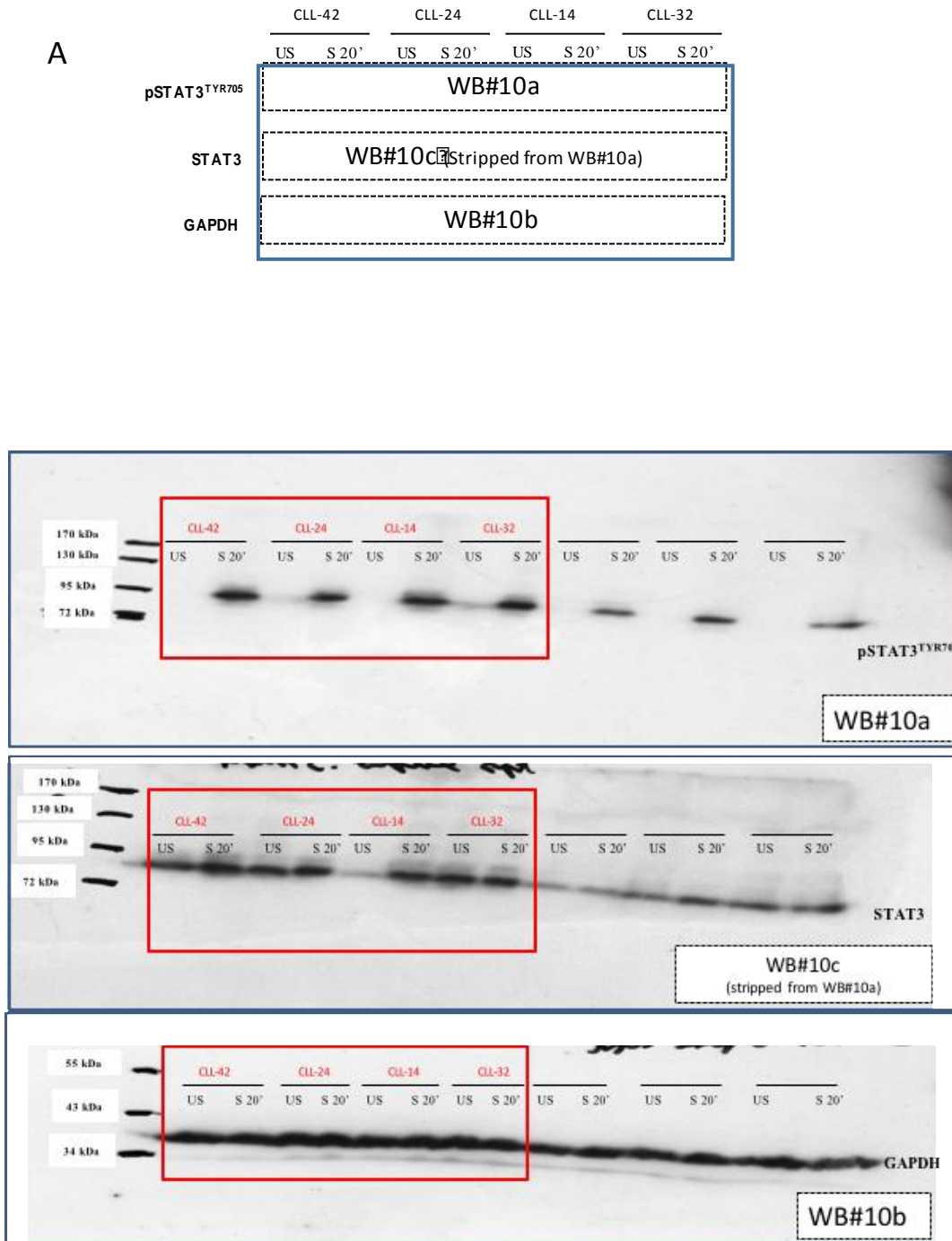
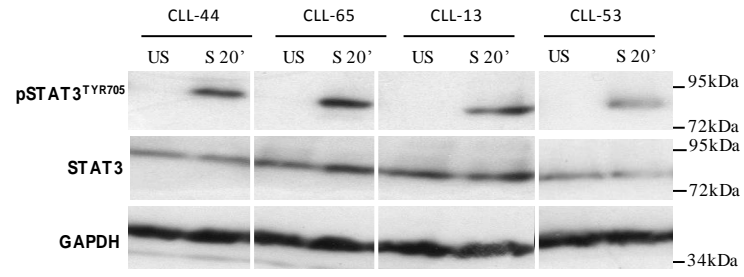
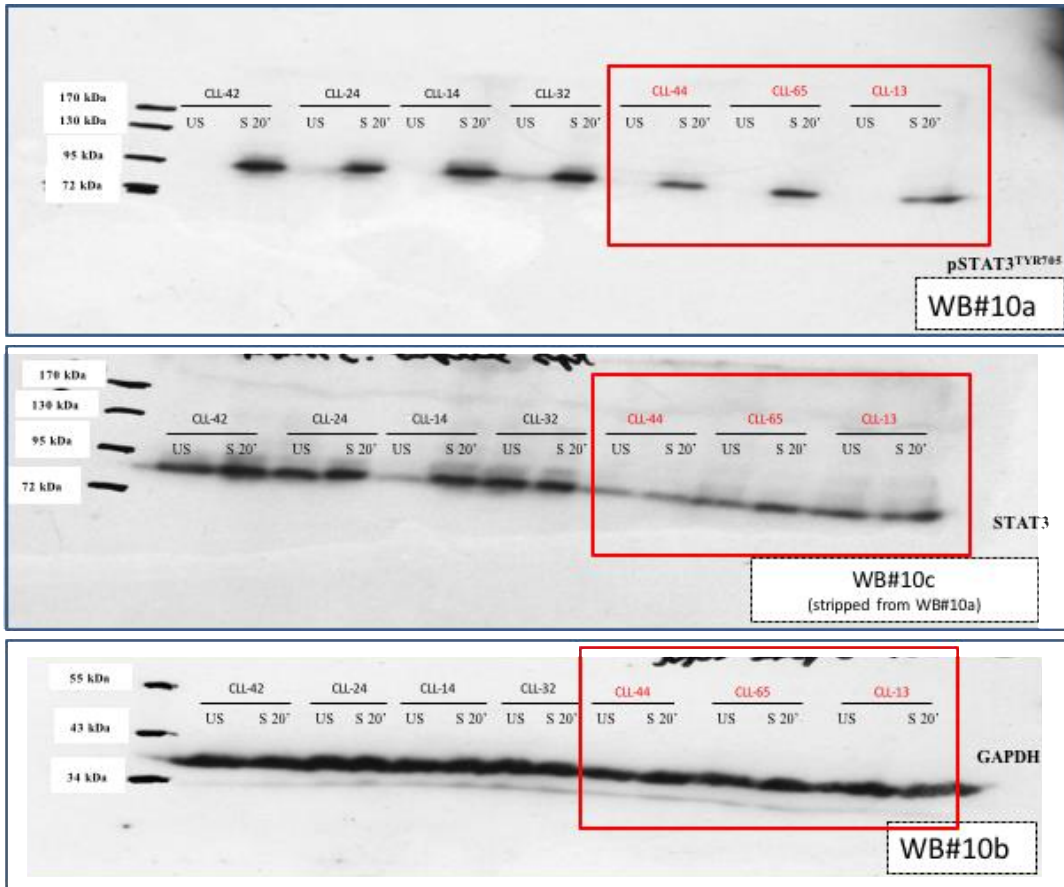
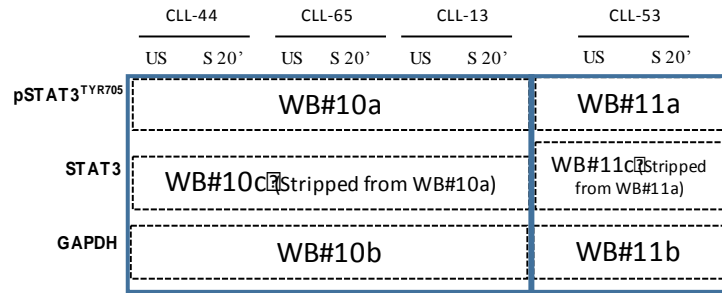


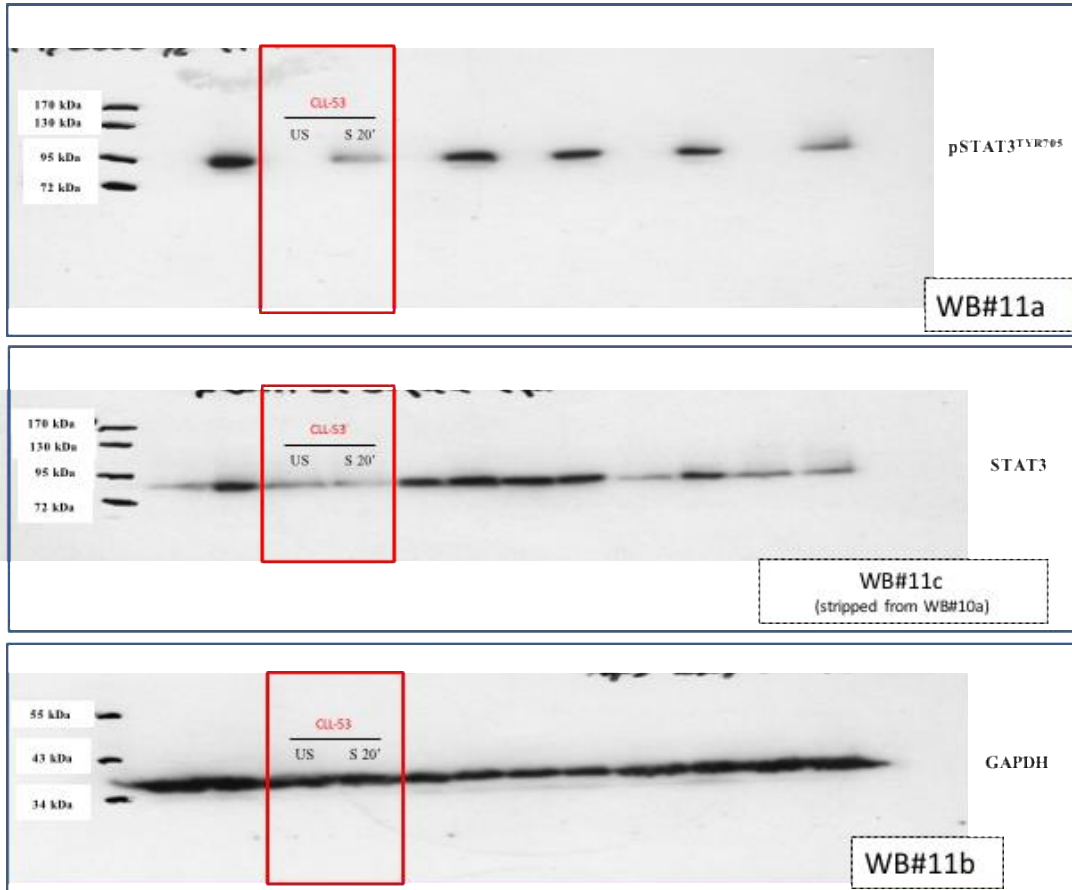
Figure S9 B

B



B





Manuscrit 2 : A core proliferative program induced by B-cell receptor stimulation in chronic lymphocytic leukemia

Les résultats obtenus font l'objet d'un manuscrit qui sera soumis pour publication.

Grâce au modèle de stimulation induisant une prolifération de LB issus de patients porteurs de LLC ([Schleiss et al., 2019](#)), nous pouvons maintenant répondre au second objectif de ma thèse qui est **d'analyser les réponses transcriptionnelles et protéomiques dynamiques induite lors de la prolifération de LB issus de patients porteurs de la forme agressive de LLC**. Pour cela, nous avons réalisé une inférence conjointe (gènes/protéines) afin de décrire le réseau de régulation génique et protéomique spécifique de LB-LLC prolifératifs. Cette analyse nous a permis d'identifier des gènes clés qui constituent de possibles cibles d'interventions pour moduler leur prolifération.

Notre étude a été conduite sur des patients présentant des caractéristiques cliniques et biologiques homogènes, à savoir une forme de LLC de stade A, non traitée et des LB présentant des IgVH Non Mutés (NM) et exprimant la protéine ZAP-70. Avant stimulation du BCR (T0) et à huit temps après stimulation, un recueil des cellules en culture a été réalisé afin d'extraire des ARN et des protéines des mêmes patients entre le T0 et le quatrième jour (Figure S2). Nous avons ainsi inclus 3 patients dont les cellules prolifèrent après stimulation (P) et 3 patients dont les cellules ne prolifèrent pas (NP) dans les mêmes conditions (Figure S1).

L'analyse du transcriptome (RNAseq), du protéome (spectrométrie de masse) et le traitement des échantillons ont été réalisés selon le protocole décrit dans la figure S3 et ont permis d'obtenir une sélection statistique de gènes et de protéines différentiellement exprimés entre le groupe des échantillons prolifératif (P) et le groupe des non-prolifératif (NP).

Après un filtrage des données (suppression des petits ARN non codants et des gènes exprimés sous un certain seuil), une analyse en composante principale et un clustering hiérarchique non supervisé, basés sur les 500 premiers gènes les plus exprimés (Figure 1), a permis de démontrer dans un premier temps un effet de la stimulation avec une expression génique comparable au cours du temps de l'ensemble des échantillons (Figure 1A). Dans un second temps, une analyse supervisée (Figure 1B) a mis en évidence une réponse transcriptomique spécifique des LB-LLC qui prolifèrent (gènes DE entre les cellules qui prolifèrent et les celles qui ne répondent pas). L'analyse protéique (Figure 2) retrouve ces différences d'expression essentiellement aux temps tardifs (à 48 et 96h).

Une analyse supervisée a ensuite été réalisée à l'aide des fonctions glmRLT et glmTreat du package edgeR ([McCarthy et al., 2012](#)) afin de rechercher l'ensemble des gènes significativement différentiellement exprimés (DE) et l'ensemble des protéines significativement différentiellement abondantes (DA) après la stimulation dans chaque groupe (NP et P) entre un temps donné et le temps contrôle initial (T vs T0 ; signature temporelle). Cette sélection a permis de mettre en évidence 2782 gène DE et 1107 protéines DA exprimés dans le groupe prolifératif (Figure 3). Parmi ces différents

gènes DE et protéines DA au sein du groupe répondeur, 421 symboles communs sont présents (Figure 3).

La comparaison de l'expression entre les échantillons prolifératif et non prolifératif (P vs NP ; signature de la réponse), met en évidence 754 gènes DE et 437 protéines DA au cours du temps après stimulation cellulaire (Figure 3). L'intersection des gènes et protéines de la signature temporelle du groupe prolifératif avec la signature de la réponse permet de définir une « signature proliférative » dans notre modèle composée de 430 gènes et 374 protéines.

Nous avons démontré la pertinence de cette « signature proliférative » en analysant la réponse transcriptionnelle des cellules LLC d'un patient porteur d'une forme particulièrement rare de la maladie. Les cellules leucémiques de ce patient étaient composées de deux sous-clones de cellules CLL (VH 1-69, CDR3 identique). La stimulation de ces deux sous-clones a mis en évidence une réponse proliférative pour l'un et une absence de réponse pour le second (Figure S1 ; CLL12). Compte tenu de la relation clonale entre ces deux sous-populations de cellules de la LLC, nous avons étudié leur réponse transcriptionnelle respective après une stimulation *ex vivo* afin de mettre en évidence des éléments transcriptionnels cruciaux concernant la signature proliférative caractérisée ci-dessus. Une analyse de l'évolution de l'expression des gènes de la signature proliférative sur les quatre premiers temps montre une corrélation à au moins un temps entre notre groupe prolifératif et le clone qui prolifère et entre le groupe NP et le clone NP pour 74% des gènes. De plus, nous retrouvons 10 gènes qui sont identiques sur les 4 temps du dataset (TNFAIP3, FGFR1, IGSF3, CCR7, CD86, GSPT1, IER3, MYC, PADI2, TXN). Une analyse statistique à l'aide de test par permutation a montré l'importance de l'enrichissement de ces 62 gènes (enrichissement non dû au hasard).

La représentation temporelle de l'expression des 2782 gènes DE et 1107 protéines DA dans le groupe prolifératif (Figure 4A/B) montre une augmentation importante de l'activité transcriptionnelle dès les premiers temps, avec un pic à 3h30 (T3) et plus de 500 gènes régulés à la hausse et 600 gènes régulés à la baisse dans ces trois premières heures. En parallèle, nous observons une diminution de l'abondance de protéines jusqu'à 3h30, suivie ensuite d'une augmentation de l'activité traductionnelle. On observe également une augmentation du nombre de gènes DE/protéines DA sur-, ou sous-exprimés (par rapport à T0) spécifiquement chez les répondeurs au cours du temps.

L'analyse de l'expression des gènes et des protéines a montré une corrélation globale de 53%. Cette corrélation augmente au cours du temps pour atteindre 82% aux temps plus tardifs après la stimulation des cellules qui prolifèrent (Figure 4C).

La comparaison de l'expression au cours du temps (de T1 à T8) d'un gène et de sa protéine correspondante (symboles communs) montre une concordance entre ARN et Protéines (Figure 4D). En effet, on observe dans la plupart des cas, qu'une augmentation de l'expression d'un gène s'accompagne, dans les temps suivants, d'une augmentation de la protéine correspondante.

Les différents processus biologiques (Figure 5) associés aux 1107 protéines DA ont été analysés et représentés avec le nombre de protéines augmentées et diminuées correspondantes. On observe différentes périodes de réponse aboutissant à la prolifération cellulaire au sein de cellules en prolifération. Dans les temps précoces (T1-T3), le faible nombre de protéines régulés positivement ne permet pas de mettre en avant un enrichissement particulier. Au cours du temps, on retrouve tout d'abord des protéines intervenant dans la transcription et sa régulation. Ensuite, on observe une surreprésentation de fonctions impliquées dans des processus de signalisation et de métabolisme. Des protéines impliquées dans les processus de prolifération, d'apoptose et de différenciation sont surreprésenté essentiellement aux temps tardifs, ce qui semble en corrélation avec l'apparition de la prolifération cellulaire au temps 8.

L'ensemble de ces données transcriptomiques et protéomiques ont permis de réaliser une inférence conjointe du réseau de régulation gènes/protéines mis en place dans un LB-LLC qui prolifère dans nos conditions de stimulation. Au total, 5733 acteurs ont été retenus.

Le modèle statistique inféré (réalisé en collaboration avec F. BERTRAND, UFR Mathématiques, UDS) associe une matrice F , qui modélise les effets dépendants du temps d'un groupe (clustering des gènes ou protéines avec un profil d'expression semblable) sur un autre, et une matrice Ω qui modélise un lien indépendant du temps (la possibilité d'une action) entre les acteurs du réseau. La formalisation du modèle mis en place pour réaliser l'inférence permet de déterminer les relations autorisées entre deux gènes, deux protéines ou encore un gène et une protéine (Figure S4A) et d'assigner un coefficient d'interaction entre deux groupes en fonction du temps (Figure S4B). Un groupe ne peut influencer un autre groupe seulement si le premier temps d'action (premier temps auquel le niveau d'expression dépasse un certain seuil) est postérieur au sien. Les interactions prédites entre les différents acteurs sont pondérées en fonction des connaissances biologiques à l'aide de la base de données TransRegNet ([Liu et al., 2015](#)).

La représentation graphique de ce réseau montre un nombre limité de gènes et de protéines avec des liaisons multiples qui dirigent la structure de ce programme cellulaire (Figure S6). Cette modélisation permet de mettre en évidence la dynamique du réseau de régulation, avec l'apparition au cours du temps des différents gènes DE et protéines DA sur- ou sous-exprimés à chaque temps, dans une cellule ayant proliféré (Figure 6). Cette représentation temporelle montre la chronologie des gènes DE et des protéines DA après la stimulation cellulaire et révèle la propagation du signal transcriptionnel et protéomique temporel après stimulation du BCR.

Ce travail de modélisation nous a permis de rechercher comment la stimulation du BCR aboutit à l'initiation de la prolifération des LB-LLC. Pour cela, nous avons recherché les protéines DA aux derniers temps après stimulation et impliquées dans la prolifération. Nous avons alors utilisé la

représentation graphique du réseau d'interaction pour individualiser le sous-réseau de gènes et protéines exprimés en amont de ces protéines (Figure 7). Le sous-réseau majoritaire aboutissant aux protéines participant à la prolifération est composé de 388 acteurs. A noter que 41% de ces acteurs sont retrouvés dans la « signature proliférative » et participent donc à ce programme lymphoprolifératif de base dans le LB-LLC après une stimulation par BCR.

Un grand nombre des protéines de ce réseau et impliquées dans la prolifération (83 au total) sont régulées à la baisse. L'analyse de l'enrichissement fonctionnel de ces protéines a révélé une surreprésentation des protéines impliquées dans la signalisation en aval du BCR (BLK, BTK, LCK, SYK, NCK associées) reflétant potentiellement la régulation de la voie du BCR.

Parmi les protéines régulées positivement dans ce réseau, on retrouve des protéines intéressantes puisqu'elles sont impliquées dans le processus de transition G1 / S, la réplication de l'ADN (PCNA, CDK2, CUL1, RANBP1, MCM) ou dans le processus de signalisation (MAPK, JAK3, RASAL3, STAT, CALR).

On remarque également, dans ce sous-réseau, l'expression dans les premières heures des protéines EGR1, EGR2 et NF κ B2, connues comme les principaux facteurs de transcription en aval de la signalisation du BCR dans les lymphocytes. Ce sous-réseau non supervisé comprend également TANK (un activateur de NF- κ B), RHOF (un homologue RAS), SNX8 et le proto-oncogène SKIL. Plusieurs de ces gènes et protéines apparaissent comme des « hubs » dans ce sous-réseau, et pourraient jouer un rôle essentiel dans ce modèle prolifératif.

Dans l'ensemble, ce travail nous a permis de mettre en évidence un réseau de régulation transcripionnelle et protéomique activé dans un LB-LLC suite à une stimulation du BCR et aboutissant à l'expression de protéines impliquées dans la prolifération.

A core proliferative program induced by B-cell receptor stimulation in chronic lymphocytic leukemia

Cedric Schleiss^{1,2}, Raphael Carapito^{1,2,3}, Luc-Matthieu Fornecker^{4,5}, Leslie Muller⁶, Nicodème Paul^{1,2}, Angélique Pichot^{1,2}, Laurent Mauvieux^{4,7}, Raoul Herbrecht^{4,5}, Myriam Maumy-Bertrand^{2,8}, Jean-Noël Freund⁴, Christine Carapito⁶, Seiamak Bahram^{1,2,3}, Frédéric Bertrand^{2,8} * **, Laurent Vallat^{1,2,3,4,7} ** *

¹ Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR_S 1109, LabEx Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

² Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Omicare, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

³ Laboratoire d'Immunologie, Plateau Technique de Biologie, Pôle de Biologie, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

⁴ Université de Strasbourg, INSERM, IRFAC UMR_S 1113, Strasbourg, France

⁵ Service d'Hématologie Adulte, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

⁶ Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC, UMR 7178, Strasbourg, France

⁷ Laboratoire d'Hématologie, Pôle de Biologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

⁸ Institut de Recherche Mathématique Avancée, CNRS UMR 7501, LabEx IRMIA, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

* equal contributions.

** corresponding authors: Laurent Vallat vallat@unistra.fr ; Frédéric Bertrand fbertran@math.unistra.fr

*** present address : 4 and 7.

ABSTRACT

The B-cell antigen receptor (BCR) signaling is crucial in the pathophysiology of most leukemias/lymphomas originating from mature B-lymphocytes and has emerged as a new therapeutic target, especially in chronic lymphocytic leukemia (CLL). However, the precise mechanisms by which BCR signaling controls neoplastic B-cell proliferation are ill characterized. Here, we study the temporal transcriptional and proteomic response leading to the proliferation of CLL cells after BCR engagement ex vivo. Of the 5,733 genes and/or proteins whose expressions were modulated by BCR activation, we identify a CLL proliferative signature comprising 430 genes and 374 proteins. A mathematical modeling approach highlighted the structured organization of this multi-level temporal response and revealed a nested sub-regulatory network including transcriptional factors activated within hours after cell activation linked to proteins involved in cell proliferation days after stimulation. The mining of this core cellular program sustaining primary human cancer cell proliferation may provide evidence based-resources for innovative therapeutics.

Key words

Leukemogenesis, B-cell receptor (BCR), lymphoproliferation, chronic lymphocytic leukemia (CLL), transcriptome and proteome, temporal response, modelling, biological network reverse-engineering, cellular program.

INTRODUCTION

The B-cell antigen receptor (BCR) is a major driver of the B-lymphocyte's behavior (Niuro and Clark, *Nat Rev Immunol*, 2002). During the physiological development of B-lymphocyte progenitors within bone marrow, the progressive expression of this receptor is mandatory for their differentiation into B-cells. Signals from the BCR also induce progenitors' proliferation, resulting in the production of billions of mature lymphocytes from few hematopoietic stem cells (Murphy, 2012). After the exit of mature B-lymphocytes from the bone marrow, the BCR allows recognition of pathogens. When this recognition takes place within lymphoid organs, with the help of T-cells, these B-lymphocytes generate a germinal center where they undergo differentiation and controlled proliferation in order to initiate the adapted immune response with secretion of pathogen-specific antibodies (Murphy, 2012).

In chronic lymphocytic leukemia (CLL), as well as in most leukemias and lymphomas arising from mature lymphocytes, it is now widely acknowledged that BCR engagement sustains the aberrant behavior leading to uncontrolled proliferation (Fabbri and Dalla-Favera, *Nature reviews Cancer*, 2016; Stevenson and Caligaris-Cappio, *Blood*, 2004). The antigen recognized by the BCR and initiating the proliferative response can be of different origin, such as yeast, fungus or self (Hoogeboom, *J Exp Med*, 2013; Messmer, *J Exp Med*, 2004; Zenz, *Nature reviews Cancer*, 2010); BCR self-activation has also been described for a particular CLL sub-group (Duhren-von Minden, *Nature*, 2012). The leukemic BCR engagement takes place in proliferative centers within lymphoid organs, where cytokines secreted by T-lymphocytes have a predominant co-stimulating role (Caligaris-Cappio, *Br J Haematol*, 2003; Patten, *Blood*, 2008; Schmid and Isaacson, *Histopathology*, 1994). Within minutes after BCR engagement, signals propagate to the cell nucleus. In the most evolutive form of CLL (characterized by germline sequences of IGHV genes coding the BCR immunoglobulin heavy chains, unmutated CLL (UM-CLL) (Hamblin, *Blood*, 1999; Rassenti, *The New England journal of medicine*, 2004)), this signaling is reinforced by the ectopic expression of the protein kinase ZAP70, which is physiologically present in T and NK cells but not in B cells (Gobessi, *Blood*, 2007). Although recent developments of specific inhibitors directed against key signaling proteins of the BCR pathway (BTK, PI3K) have resulted in therapeutic progress in CLL (Herman, *Blood*, 2011), tumor cell escape has been observed and the most evolutive CLL forms remain incurable. Moreover, the signaling process occurring within minutes after BCR engagement is only the initial step of the lymphocyte response. The ultimate proteins activated downstream of the signaling are transcription factors (TF) that activate expression of thousands of genes, some of them being TF for multiple other genes. These successive

and finely coordinated waves of transcriptional activation lead to protein abundance modulations responsible for cell cycle entrance and lymphocyte proliferation. This transcriptional and proteomic program involving thousands of actors within days after BCR engagement is still ill-characterized, preventing development of innovative therapies as well as a better understanding of CLL's pathophysiology.

Partial information on these cellular programs has been generated by analyzing the transcriptional response in *ex vivo* cultures of primary CLL cells, subjected to anti-IgM-mediated BCR signaling activation (Guarini, Blood, 2008; Pede, PLoS One, 2013; Vallat, Blood, 2007). However, such an isolated *ex vivo* BCR activation, without additional environmental co-stimulations, does not induce the proliferation of these cancerous CLL cells *ex vivo* (Yoshida, International immunology, 2000). In a previous study, we analyzed the response to isolated BCR ligation during the first six hours post-activation and showed a specific transcriptional signature of the most evolutive CLL form (i.e. UM- and ZAP70-positive CLL) (Vallat, Blood, 2007). The specificity of this transcriptional response has since been confirmed in the same experimental conditions by other groups (Guarini, Blood, 2008; Pede, PLoS One, 2013). Moreover, a signature of this BCR engagement has been identified in lymphoid organs (Herishanu, Blood, 2011), where the *MYC* gene which is involved in leukemogenesis of most of leukemias and lymphomas originated from mature B lymphocytes (Basso, Nat Genet, 2005), appeared as a key actor in the transcriptional response (Herishanu, Blood, 2011; Vallat, Blood, 2007; Yeomans, Blood, 2016). Finally, a preliminary analysis of the proteomic response after isolated BCR engagement also revealed a signature of the most evolutive form of CLL (Perrot, Blood, 2011).

Here, we applied a recently developed experimental model of *ex vivo* BCR stimulation that enables the induction of a synchronized proliferation and multi-omics trackable response of primary UM ZAP70-positive CLL cells (Schleiss, Sci Rep, 2019). This model was used to analyze simultaneously the transcriptional and proteomic responses during the four days after cell activation and provide evidence for a specific signature of genes and proteins linked to proliferation after BCR engagement. In order to identify key actors and to deconvolute multiple levels of this response, we refined and validated with a synthetic dataset, previously developed reverse engineering tools (Jung, Bioinformatics, 2014; Vallat, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013). This modelling approach described the temporal structure of this transcriptional and proteomic proliferative response, revealing the existence of a nested core proliferative program within the CLL BCR response.

RESULTS

Experimental design and dataset

Untreated patients at initial stage of CLL (Binet stage A / Rai 0) were included in the study. Leukemia cells of all patients presented biological characteristics of evolutive form of CLL (unmutated IGHV genes and ZAP70 protein expression) (Table 1). In order to reproduce the primary leukemogenic steps occurring *in vivo*, these CLL cells were activated by BCR ligation (with anti-IgM) and minimal mandatory co-stimulating factors (CD40L, IL-4 and IL-21) required to resume cell proliferation *ex vivo* (Schleiss, Sci Rep, 2019). We defined the functional proliferative response of the CLL samples at day 6 after stimulation based on the presence of proliferative clusters and > 25% of divided CLL cells within the cell culture. Given the lack of established physiological counterpart of CLL cells, we also included three control CLL samples that did not proliferated in the same culture conditions and hereafter designed as non-proliferative samples (Fig. S1). Transcriptional and proteomic responses of three proliferative and three non-proliferative CLL samples were analyzed.

Before stimulation (T0) and at eight time points after stimulation, gene expression was analyzed by RNA-seq at T0 and 1h, 1h30, 3h30, 6h30, 12h, 24h, 48h and 96h after cell stimulation (n=54 data points), the latest time point corresponding to the observation of the first clusters of proliferation in the cell cultures. In parallel, mass spectrometry-based proteomics was performed from the same clonal cell cultures at T0 and 1h, 2h, 4h, 7h, 12h, 24h, 48h and 96h post-stimulation (n=54 data points) (Fig. S2).

A total of 23,348 transcripts and 50,503 unique peptides, corresponding to 4,664 proteins were identified and quantified. After quality-based filtering, 13,066 transcripts and 4,027 proteins, expressed at least in one sample were retained for further analyses.

Statistical analysis of genes and proteins expression identified a structured proliferative signature

Unsupervised analysis

Unsupervised gene expression analysis highlighted (i) a transcriptional response for all CLL samples after stimulation, and (ii) a specific response of proliferative CLL samples compared to non-proliferative samples. Principal component analysis (PCA) indeed distinguished proliferative and non-proliferative samples at T0 and this difference was maintained after stimulation, revealing consistent transcriptional differences at each time point. The PCA also distinguished early (T1 to T4) from late (T5 to T8) time points, with a well-structured temporal signature after stimulation (Fig. 1A). Hierarchical clustering of all samples confirmed this temporal organization of samples, where proliferative and non-proliferative cells are still distinguishable (Fig. 1B). Unsupervised temporal gene expressions analysis revealed clusters of temporal patterns of expression after cell stimulation (Fig. 1C). Most of these patterns showed structured expression modulations with peaks at different time points during the time course of the experiment, which is characteristic of a transcriptional response after pulsed exogenous stress (Hao and Baltimore, *Nat Immunol*, 2009; Yosef and Regev, *Cell*, 2011). Similarly, unsupervised analysis of protein abundances after cell stimulation revealed differences between early (T1 to T6) and late time points (T7-T8) (Fig. 2A). For the two later time points (T7-T8), samples showed a tendency for segregation according to their proliferative response. Overall, the proteomic response appeared less structured than the transcriptional one, at least at early time points after stimulation. This result was confirmed by the hierarchical clustering that showed a temporal proteomic signature with a weaker clustering at the early time points but a stronger clustering at T7-T8 (Fig.2B). Temporal proteomic profiles analysis after stimulation also identified structured temporal patterns with maximum of abundance at different time points after stimulation (Fig. 2C).

Supervised analysis

In order to gain insight into the transcriptional and proteomic temporal responses, we searched for statistically significant up- and down-regulated genes and proteins in the stimulated samples (T1 to T8) compared to the unstimulated samples (designed hereafter as T v T0 comparison). For the proliferative CLL samples, we identified 2,782 differentially expressed (DE) genes and 1,107 differentially abundant (DA) proteins after stimulation, representing 3,468 unique symbols (Fig. 3, Table S1). The two lists of DE genes and DA proteins had 421 pairs of symbols.

In parallel, the comparison of proliferative versus non-proliferative samples after cell stimulation (defined hereafter as proliferative v non-proliferative comparison) identified 754 DE genes and 437 DA proteins (Fig.3). The combination of the temporal signature (T v T0) and the response signature (proliferative v non-proliferative) showed 430 DE genes and 374 DA proteins in proliferating compared to the non-proliferating samples (Fig.3, Table S1). These 430 genes and 374 proteins,

representing 779 unique symbols unveiled a “proliferative signature” (Table S1), sought to contain important transcripts and proteins sustaining the proliferative response of these cells.

A statistical comparison of proliferative and non-proliferative samples performed at T0 revealed that seven transcripts of this proliferative signature were already DE between these two groups at the steady state (before stimulation) (five transcripts were up-regulated: *SIK1*, *SELL*, *SERPIN89*, *HIST1H2BH/G* and two down-regulated: *FGFR1* and *H1FX*). The same analysis performed on the proteomic dataset also revealed six proteins already DA in proliferative samples compared to non-proliferative samples at steady state (five were up-regulated: NTSE, PIP, IGHG1, SAMHD1, DOK3 and one down-regulated: LMNA).

Although not leading to cell proliferation, these results also showed transcriptional and proteomic responses of control non-proliferative CLL cell samples after *ex vivo* stimulation. This response included 1,822 DE genes and 760 DA proteins in stimulated compared to non-stimulated samples (T v T0 comparison), and represented 2,359 unique symbols of which 223 symbols were common between DE genes and DA proteins list (Fig. 3, Table S1).

As expected, the number of DE genes and DA proteins evolved at each time point after cell activation, depending on the temporal profile of expression of each gene and protein. In proliferating cells, the number of DE genes increased rapidly after cell stimulation, with up to 511 and 622 genes up- and down-regulated respectively, after 3h post-stimulation (Fig. 4A). Unlike the DE genes, the number of DA protein, either up- or down-regulated, remained limited within the first 24h after stimulation (Fig. 4B). Interestingly, genes and proteins belonging to the “proliferative signature” were distributed among the DE genes and DA proteins at different time points after cell stimulation (Fig. 4A-B).

Analysis of genes and proteins expression showed 53% of overall correlation during the course of the study. This correlation increased drastically during time with up to 82% at later time points after stimulation in proliferating cells (Fig. 4C).

Moreover, focusing on the expression of the 421 pairs of genes and corresponding proteins of the temporal signature showed a concordant modulation (either up- or down-regulation) and a gene modulation preceding corresponding proteins in 90% of the cases (Fig. 4D). For these pairs, a median delay of 3h was observed between genes expression and proteins level modulation. Together, these results suggested that BCR engagement induced a structured transcriptional and proteomic temporal response leading to proliferation in CLL cells.

We next thought to analyze the biological function of the 1,107 DA proteins up- and down-regulated at each time point after cell stimulation in the temporal signature of proliferative CLL cells. Biological processes annotations (BP) were collected in order to calculate the number of proteins involved in

different BP at each time point. This analysis showed an increased number of up-regulated proteins involved in signaling, transcriptional activity and cell activation between 7h and 24h (T4 to T6) (Fig. 5). From day 2 to day 4 (T7-T8), the number of up-regulated proteins involved in signaling, metabolism and transcriptional processes further increased. In addition, the most represented functions during this last period were related to cell cycle regulation, DNA replication and proliferation, consistent with the beginning of cellular proliferation observed in these cells after four days of culture. At the same time, proteins participating in antigen processing and presentation expected to be upregulated upon BCR stimulation were indeed upregulated. In parallel, analyzing BP for down-regulated proteins revealed that within 1h (T1) after cell activation, a transitory down-regulation of proteins involved in signaling, metabolism and differentiation was observed. Then, between 2h and 24h (T2 to T6), the number of down-regulated protein decreased, so that no particular BP enrichment could be displayed. Finally, the day 2-day 4 (T7-T8) period showed a secondary increase in the number of down-regulated proteins involved in signaling, transcription and cell cycle, potentially associated to the regulatory mechanisms alongside cell proliferation activation.

Relevance of the proliferative signature in a rare case of CLL

To stress the relevance of the “structured proliferative signature”, we analyzed the transcriptional response of CLL cells from a patient (CLL#12) with a particularly rare form of the disease. Leukemic cells of this patient were composed of two CLL cells sub-clones, identified by flow cytometry, and whose clonal relationship was assessed by IGHV sequences analysis since both sub-clones were VH 1-69 and had an identical CDR3 sequence. Noteworthy, *ex vivo* BCR-stimulation of these CLL cells revealed a proliferative response for one of the sub-clones and a lack of response for the second one (Fig. S1). Given the clonal relationship between these two CLL cells sub-populations, we investigated to which extend their respective transcriptional response to *ex vivo* stimulation might contain common transcriptional elements with the proliferative signature characterized above. For this purpose, the two sub-clones were sorted, stimulated *ex vivo* as described above and cell samples were collected at T0 and T1 to T4 for RNA-seq analysis. Comparison of the list of DE genes in the proliferating versus non-proliferating sub-clones to the list of 430 genes of the proliferative signature regulated during T1-T4 period revealed 62 genes exhibiting a similar pattern after cell stimulation (Table S1). Statistical analysis with permutation tests demonstrated the significance of the enrichment of these 62 genes within the transcriptional response of the proliferative sub-clone.

Modeling of the CLL proliferative program

Genes and proteins selection for modeling

Since the genes and proteins response to *ex vivo* activation of CLL cells is organized into structured temporal patterns of expression (Fig.1C-1D), we sought to reconstruct the structure of the cellular program leading to cell proliferation. In order to engineer a common frame for all CLL samples and to capture all relevant actors of this program, we included the DE genes and DA proteins selected in the supervised analysis, namely 2,782 genes and 1,107 proteins within proliferative samples and 1,822 genes and 760 proteins within non-proliferative CLL cells, representing a total of 3,097 unique genes and 1,209 unique proteins symbols. Additionally, we hypothesized that genes or proteins with a remarkable temporal pattern of expression, for instance a peak at one or several time points after stimulation irrespective of the level of expression, may indicate a putative involvement in the cellular response. This led to the selection of 2,566 and 1,078 additional genes and proteins, yielding a total of 5,722 genes and 2,548 proteins representing 5,733 unique symbols with 2,537 pairs of genes and corresponding proteins.

Model formalization

To model the cellular program, we used the reverse engineering approach based on regression and systems of equation that already proved its efficiency in our previous study (Vallat, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013). This unsupervised approach required prior model formalization allowing the imposition of biological constraints before inference with temporal genes and proteins expression datasets. The first constraint limits the authorized links between actors in the model in order to enhance the biological relevance (Fig. S4A). A link between a gene and its corresponding protein is the first level of interaction in this program, influenced by translation mechanisms and complex protein metabolism, and was modeled with a primary matrix of interactions (Fig.S4B). In addition, links between proteins and other genes reflect the transcriptional processes and links among proteins reflect protein-protein interactions sustaining the cellular response. Modeling of these protein-gene and protein-protein interactions was performed with a second matrix (Fig.S4C) taking in account biological knowledge implemented from the RegNetWork database (Liu, Database (Oxford), 2015). The second constraint is imposed by the temporality of the cellular response after cell stimulation. For each temporal cluster of expression, the first time point of up- or down-regulation determines the time from which this cluster of genes and proteins can have a potential effect on other actors of the cell response. A temporal label was

then assigned to each gene and protein, restricting its potential interaction to actors with later temporal labels (see supplemental methods).

Model inference with temporal gene and protein expression datasets

Temporal gene and protein expression datasets were used to infer the formalized model. Matrix of interactions were estimated by mean of penalized regression using weighted variant of stability selection algorithm (Meinshausen and Bühlmann, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 2010) in order to retain the best potential regulators of each gene or protein actor of the network and to determine the timing of these interactions after cell stimulation. To ascertain the robustness of this inference, matrix estimations were reiterated by cross validation and the best result was retained by linear regression estimation. Performances of the resulting model, including sensitivity, precision, predictive positive value and F-score were validated with simulated data (supplemental methods). These results were then compared with the performances of our previous algorithm (*Cascade* package (Jung, *Bioinformatics*, 2014; Vallat, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013), a Lasso-version of *Cascade* and a non-weighted Stability selection algorithm, confirming the quality of the current model (Fig. S5).

The temporal model inferred with genes and proteins expression datasets of proliferating CLL cells resulted in a regulatory network composed of 2,167 genes and 1,074 proteins representing 2,848 unique symbols among which 395 gene-protein pairs, connected by 53,131 directed statistical interactions (table S2). The graphical representation of this network showed a scale-free topology, where a limited number of genes and proteins with multiple links drive the structure of this cellular program (Fig S6). A detailed temporal graphical representation allowed reconstructing the timeline of this cellular network (Fig. 6). This temporal representation showed DE genes and DA proteins at each time points after cell stimulation and revealed the transcriptional and proteomic temporal signal propagation after BCR stimulation in proliferative CLL cells.

CLL proliferative program

The cellular modeling was used to understand how BCR stimulation triggers cell proliferation initiation in CLL cells. Among the actors of this network, we identified 267 proteins associated to the gene ontology (GO) terms “cell-cycle regulation” and “proliferation”. These seeding proteins and

their neighbors in the network led to the identification of a nested sub-network of 388 genes and proteins, representing 302 unique symbols (Fig.7, Table S2). Strikingly, 124 (41%) of these actors belong to the “proliferative signature”.

This sub-network included 173 of the 267 seed proteins involved in cell proliferation, leaving out 94 proteins in other minor sub-networks. Surprisingly, 83 of these 173 proteins are down-regulated. Functional analysis (GO) of these proteins showed an enrichment in proteins involved in signalling downstream of the BCR (BLK, BTK, LCK, SYK, NCK associated) and other kinases (n=18), potentially reflecting regulatory mechanisms after BCR engagement. The other down-regulated proteins are phosphatases (PTPN6, PTPRC) and proteins involved in DNA damage and repair (n=10). While 6/173 proteins are down-, then up-regulated at ulterior time points, 84/173 are up-regulated after BCR stimulation. The number of up-regulated proteins increases during time after stimulation in the network (T1:0, T2:0, T3:0, T4:3, T5:9, T6:16, T7:59, T8:76). Most of these proteins are involved in G1/S transitional process, DNA-replication (PCNA, CDK2, CUL1, RANBP1, MCM) or in signaling process (MAPK, JAK3, RASAL3, STAT, CALR). Some of these proteins are involved in antigen processing and presentation.

This sub-network is also composed of 71 genes coding some of these 173 seeding proteins involved in proliferation process. The positive weighting of genes and their corresponding proteins during the model formalization could, in part, explain this high concordance (41%) between genes and proteins. Nevertheless, a closer analysis of these interactions showed that all these genes exhibit a significant regulation (DE T v T0) always anterior to their coding protein abundance modulation and always consistent with the direction of the regulation (up- or down-).

Finally, this sub-network is also composed of 50 genes and 94 proteins (including 15 pairs of gene and its corresponding protein).

Interestingly, this group of genes and proteins includes at the first time point EGR1, EGR2 and NFKB2, known as the main transcriptional factors downstream of BCR signaling in lymphocyte. This unsupervised sub-network also includes TANK (NFKB activator), RHOF (RAS homologue), SNX8 and the proto-oncogene SKIL. Several of these genes and proteins appear as hubs in this sub-network, driving the topology and the signal transmission in this proliferative model. Among these hubs, NFKB1 is a major protein involved in leukemogenesis of most lymphomas and leukemias (Staudt, Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010) and YBX1 is associated with cancer cell proliferation (Martin, J Biol Chem, 2017).

We next asked if a sub-network could also be found within the non-proliferating cells. With the same approach, a functional analysis of the 760 proteins DA in the non-proliferating samples revealed that 193 of these proteins are involved cell cycle or proliferation (171/193 belong to the previous list of 267 proliferative proteins). A search for the neighbors of these 193 proteins within the global gene

and protein network of the non-proliferating cells identified a prominent sub-network comprising 114 actors (37 genes, 77 proteins and 86 unique symbols). Comparison of the actors of the proliferative and non-proliferative sub-network showed that 328 genes and proteins are missing in the last one, among them major BCR transcriptional factors EGR1, EGR2, NFKB1 and NFKB2. Furthermore, analysis of connectedness between actors of the non-proliferating sub-network showed a lower number of interactions and the lack of several major hubs, as NFKB1, which are not detected in this network.

Overall, this modeling step allowed, from proteins involved in the proliferation expressed at late time points in proliferative cells, to go back to the initial transcription factors expressed one hour after cell stimulation, and suggested the existence of a central nested proliferation program sustaining the proliferation of CLL cells.

DISCUSSION

Results summary

The characterization of a cellular program sustaining CLL cells proliferation after BCR engagement is a major step for a better understanding of CLL leukemogenesis. Here, *ex vivo* BCR engagement of primary CLL cells permitted the simultaneous quantification of genes and proteins modulations and revealed a transcriptional and proteomic proliferative signature after cell stimulation. Reverse engineering of this BCR response further showed a temporal structured transcriptional and proteomic regulatory network. These results suggest the existence of a proliferative sub-network, comprising TFs activated within minutes after BCR engagement, connected to proteins expressed days after cell activation and involved in cell proliferation initiation.

Experimental conditions

Studying primary CLL cells is challenging because they do not spontaneously proliferate *ex vivo*. Proliferation is dependent on BCR engagement and co-stimulations by additional factors that need to be present in the culture conditions (Coscia, Leukemia, 2011). To our knowledge, all previous studies of CLL transcriptional response reported in the literature were performed after isolated BCR stimulation using soluble or immobilized anti-IgM (Deglesne, Cancer Res, 2006; Guarini, Blood, 2008; Herishanu, Blood, 2011; Pede, PLoS One, 2013). Such isolated stimulations are known to induce

lymphocyte apoptosis (Yoshida, *International immunology*, 2000) and are therefore not adapted to study the proliferative response of these cells. Furthermore, even if a prolonged stimulation (e.g. co-culture with feeder cells) have been shown to induce CLL cells proliferation (Hamilton, *Br J Haematol*, 2012), a pulsed cell stimulation is preferred to trace the proliferative program within the cellular transcriptional and proteomic noise and to avoid cyclic phenomena (Ideker, *Cell*, 2011). In this study, we used BCR engagement associated to minimal mandatory BCR co-stimulating agents (CD40L, IL-4 and IL-21) for the induction of cell proliferation (Schleiss, *Sci Rep*, 2019). These co-factors were all supplemented once in the culture at T0, except IL-21 that was added at 24h. By using this methodology we reproduced a pulsed stimulation that induced the synchronized response of the clonal CLL cells, which was confirmed by the resulting structured and non-cyclic temporal patterns of expression.

The proliferative program is a dynamic process that requires time-series measurements to be characterized. Several studies have reported shorter mRNA half-lives during the first hours of a transcriptional response following an environmental pulsed stimulation (Bar-Joseph, *Nat Rev Genet*, 2012; Hao and Baltimore, *Nat Immunol*, 2009; Yosef and Regev, *Cell*, 2011). These observations have been confirmed by previous studies of gene expression in CLL (Guarini, *Blood*, 2008; Vallat, *Blood*, 2007). In order to identify a maximum of genes and proteins involved in BCR response, we analyzed 8 time-points until day 4 after BCR stimulation, including 4 time-points within the first six hours post-stimulation that previously allowed capturing the early transcriptional response after anti-IgM stimulation (Vallat, *Blood*, 2007). As protein abundance changes after cell activation are influenced by post-transcriptional modifications and specific half-life of each protein (Schwanhauser, *Nature*, 2011), we have set a 30-minutes delay between mRNA and proteins measurement during the 6 first hours in order to capture proteins with short half-lives. These early time points also proved efficient at capturing differential abundance of proteins in a previous study after anti-IgM stimulation (Perrot, *Blood*, 2011).

CLL is an heterogeneous leukemia including several sub-classes defined by the IGHV mutational status. UM-CLL are characterized by a shorter survival, whereas M-CLL have a more indolent evolution (Hamblin, *Blood*, 1999). These two sub-classes of CLL have already been shown to have a different transcriptional response after isolated BCR engagement (Guarini, *Blood*, 2008; Rodriguez, *Leukemia*, 2007; Vallat, *Blood*, 2007). The expression of ZAP70, an additional protein of the BCR signaling cascade enhances BCR responsiveness (Chen, *Blood*, 2008) and is associated with the worst prognosis in UM-CLL patients (Rassenti, *The New England journal of medicine*, 2004). In this study, we focused on the analysis of this extreme phenotype i.e. UM-CLL and ZAP70 positive. Another difficulty with CLL-cells studies come from the lack of characterization of its normal counterpart,

precluding the use of healthy B-cells as control of BCR responsiveness. The experimental conditions used for BCR engagement in this study allowed discerning proliferating and non-proliferating CLL cells among this group of UM-ZAP70pos-CLL cells (Schleiss, *Sci Rep*, 2019). Using three proliferating and three non-proliferating CLL cell samples from this group, we highlighted the specificity of the CLL proliferating program. We further narrowed this comparison with a remarkable CLL form, analyzing the genes and proteins response of a proliferative sub-clone and compared it with the original non-proliferative clone of the same patient. This unique observation provided an optimal cellular control and a valuable validation of the “proliferative signature”.

Correlation between transcriptional and proteomic temporal expression.

Recent developments of whole proteome measurement by mass-spectrometry now allow quantitative analyses of multiple proteomic samples, but large studies involving multiple transcriptional and proteomic temporal cell-responses are still rare. In yeast, three analyses of transcriptional and proteomic temporal response after cell stimulation by mean of microarrays and mass-spectrometry have reported 312, 328 and 798 pairs of genes and their corresponding proteins involved in the response to cell stimulation (Fournier, *Mol Cell Proteomics*, 2010; Jayapal, *PLoS One*, 2008; Waldbauer, *PLoS One*, 2012). These studies revealed a weak (30%) correlation between gene expressions and protein abundances at the steady state (before stimulation) that increases up to a 40-60% correlation 4 to 6 hours after cell stimulation (Fournier, *Mol Cell Proteomics*, 2010; Jayapal, *PLoS One*, 2008). A milestone study performed with murine fibroblasts after amino-acids and nucleotides labeling revealed that about 40% of proteomic variation are explained by mRNA modulation in these mammalian cells (Schwanhausser, *Nature*, 2011). In human cancerous cell lines, an analysis (microarrays and mass-spectrometry) after cell stimulation showed 446 genes and corresponding proteins pairs with 40% of correlation (Waters, *PLoS One*, 2012). Correlation between genes and corresponding proteins in primary human cancer cells has not been investigated before the present study. We measured here gene expressions and protein abundances (RNAseq and mass-spectrometry) in the same monoclonal cellular population and found 421 genes and corresponding proteins, representing 38% of correlation between gene and protein expression after BCR engagement in the proliferative CLL cells. Strikingly, this correlation increased up to 82% at the later time points of the cell response.

In the study performed in yeast cited above, Jayapal et al. pondered the 40% of genes and proteins correlation given the observation of divergent temporal pattern of gene and corresponding proteins abundance (e.g. gene up-regulated and corresponding protein down-regulated) (Jayapal, *PLoS One*,

2008). Our results showed that, in most cases (90%), protein abundance modulation is preceded by its corresponding gene modulation in a concordant direction. Our results also showed a delay of several hours (median: 3-6 hours) between a gene expression modulation and its corresponding protein modulation. This delay could explain the lack of temporal structure revealed by the unsupervised PCA of protein abundance early after cell stimulation (Fig 2A). A comparable long delay of 3-6 hours has already been noticed in yeast studies and appeared to be conserved here in human cells (Fournier, *Mol Cell Proteomics*, 2010; Waldbauer, *PLoS One*, 2012).

Transcriptional and proteomic temporal expression modelization.

In order to unravel the structure of the transcriptional and proteomic response and to search for key genes and proteins driving this structure, we developed a new modeling approach. The aim of this modeling was to search for potential regulatory relationships between genes and proteins involved in the observed temporal patterns of expression. The existing methods used for modelling of biological processes include four main approaches: i) theoretical information, ii) graphical Gaussian model, iii) Bayesian methods, and iv) models with equations (Hecker, *Biosystems*, 2009). Due to the size of our dataset comprising thousands of genes and proteins, the temporality of the measurement and the need to infer a joint transcriptional and proteomic network, the only possible approach was a model with equations, which is commonly used to infer transcriptional networks (Yosef and Regev, *Cell*, 2011). In our previous study, this approach has proven its efficacy for the reconstruction of a synthetic dataset-based regulatory network that achieved better performances compared to other existing methods (Jung, *Bioinformatics*, 2014; Vallat, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013). This method is model-driven and requires a formalization step before the inference with expression dataset. This formalization allowed imposing constraints (e.g. temporality) that guaranty the biological relevance of the resulting model and weighted some interactions, whereas the global statistical interactions between genes and proteins within the network are unsupervised. The resulting inferred model was able to track the transcriptional and proteomic response after BCR engagement and succeeded in reconstructing the structure of the response, highlighting the role of genes and proteins specifically expressed in the proliferating CLL cells. Another major result obtained with our modeling is the observation of a proliferative sub-network nested within the global CLL cell response. Of interest, this sub-network included some important TFs downstream the BCR pathway, suggesting that the model was able to reconstruct the relationships from firsts TF one hour after BCR engagement to proteins sustaining proliferation days after stimulation. This nested sub-network is a first approach of a core leucemogene proliferative program in these primary leukemic cells. Previous published studies based

on temporal genes and proteins measurements in human cancer cells were focused on signaling pathways reconstruction after receptor engagement (Koksal, Cell Rep, 2018). Here, we focused on the transcriptional and proteomic regulatory network activated downstream of the signaling cascades which represents the first attempt to analyze these complex processes in human primary cancer cells. The modeling of the transcriptional and proteomic program sustaining CLL cell proliferation is an important step in the understanding of CLL cell leukemogenesis and to unravel new cancer cellular pathways for innovative therapies developments.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and B cell isolation

B-cells from peripheral blood were obtained from seven untreated CLL patients. All subjects gave written informed consent for this study, which was approved by the institutional review board of the Strasbourg University Hospitals. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. CLL B-cells were negatively selected from fresh blood samples using the RosetteSep B cell enrichment cocktail (StemCell Technologies, Grenoble, France) and density gradient centrifugation (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare Life sciences, Velizy-Villacoublay, France). Cell purity was then controlled by flow cytometry on a Cytomics FC500 System (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) after CD19+/CD5+ staining (Beckman Coulter, Villepinte, France) and ranged from 96% to 99% (median 97%).

Cell activation and culture conditions

CLL cells were stimulated with 10 µg/ml of soluble F(ab')₂ anti-human IgM (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), 100 ng/ml of CD40L (Enzo Life Science, Villeurbanne, France), 10 ng/ml of IL-4 (R&D Systems-Bio-Techne, Lille, France) and 25 ng/ml of IL-21 (Invitrogen, Maryland, USA) as described previously (Schleiss, Sci Rep, 2019). Anti-IgM, IL-4 and CD40L were added at T0 and IL-21 was added at 24h. Cells were then cultured in RPMI 1640 Medium (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (Dutscher, Brumath, France) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, New York, USA) at 37°C, in an atmosphere enriched with 5% CO₂.

CFSE-based proliferation and viability assays

Freshly isolated B cells were stained with 0.5 µM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (CellTrace, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and incubated for 10 min at 37°C in the dark. Washed

Résultats

CFSE-labeled cells were stimulated as previously described and cultured at 37°C/5% CO₂. Six days after activation, B cell proliferation was evidenced by decrease in CFSE staining intensity as evaluated by flow cytometry. Fluorescence data were analyzed with the Kaluza software (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Cell apoptosis was monitored using FITC annexin-V Apoptosis detection kit and propidium iodide (PI) (both from BD Pharmingen, BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Cells (10⁶) were washed in phosphate-buffered saline and re-suspended in annexin buffer before the addition of FITC annexin-V and incubated for 20 min on ice in the dark. PI was then added for 5 min before flow cytometry analysis.

mRNA samples preparation

Before cell stimulation (T0), and at eight time points after stimulation (1h, 1h30, 3h30, 3h30, 6h30, 12h 24h, 48h, 96h), 4.10⁶ cells were collected, washed and resuspended in 1mL TRIzol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Total RNA was isolated using chloroform and Phase Lock Gel tube (5 Prime, Hilden, Germany) and was purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendation.

RNA integrity was assessed with the Agilent total RNA Pico Kit on a 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Ribosomal RNA was depleted with the Low Input RiboMinus™ Eukaryote System v2 kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) following manufacturer's instructions.

RNaseq analysis and data preprocessing

The sequencing library was prepared with the Ion Total RNA-seq kit v2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instructions. The libraries were loaded two by two at a concentration of 20 pM on an Ion PI™ Chip using the Ion Chef Instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The sequencing was performed on an Ion Proton sequencer with the Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Raw sequencing data were preprocessed according to Life Technologies recommendations. Adapter sequences were removed, and reads shorter than 18bp were excluded. Reads were then mapped against the human genome (Hg19) and a virtual reference transcriptome using TopHat2 (Kim, Genome Biol, 2013). Unmapped reads were mapped to the reference Hg19 using Bowtie2 in local mode (Langmead and Salzberg, Nat Methods, 2012). The total reads (SAM format) was used to count reads with the default union-counting mode of the tool htseq-count of the Python package HTSeq (Anders, Bioinformatics, 2015).

We used the edgeR package (McCarthy, Nucleic Acids Res, 2012), to derive the reads per kilobase per million (rpkm) values from read counts and gene lengths. These rpkm values were used for differential analysis study and their Voom transformed values for modeling inference (Law, Genome Biol, 2014).

Proteomic samples preparation

Before cell stimulation (T0), and at eight time points after stimulation (1h, 2h, 4h, 7h, 12h, 24h, 48h, 96h), 8.10^6 cells were collected, washed and resuspended in 100 μ l of lysis buffer (Urea 8M, Thiourea 2M, Chaps 4%, DTT 1%, Triton 10%, TLCK 0,05%, protease inhibitors). After centrifugation (5min, 8000g), 6 volumes of glacial acetone were added to the supernatant and samples were incubated overnight at -20°C. The protein were pelleted and were resuspended in buffer (Urea 7M ; Thiourea 2M ; Chaps 4% ; Tris pH8,8 30mM) at a concentration > 5 μ g/ μ l.

After denaturation at 100 °C for 10 min in loading buffer (2% SDS, 0,1M DTT, 10% glycerol, 62.5 mM Tris pH 6.8), 10 μ g of proteins of each sample were concentrated in one stacking-gel band using a 4% SDS-PAGE gel. The gels were fixed with 45% methanol/3% acetic acid and stained with colloidal Silver Blue. Each band was excised and cut in four pieces prior to in-gel digestion. The gel pieces were washed four times with 100 μ L of 75% acetonitrile (ACN) and 25% ammonium bicarbonate buffer (NH₄HCO₃) at 25 mM and dehydrated with 50 μ L of ACN. The cysteine residues were reduced by adding 10 mM DTT for 30 min at 60°C and 30 min at room temperature, and alkylated by adding 55 mM IAA for 20 min in the dark. The bands were then washed three times by adding 50 μ L of 25 mM NH₄HCO₃ and 50 μ L of ACN. Gel pieces were dehydrated twice with 50 μ L ACN prior to enzymatic digestion. Proteins were cleaved in an adequate volume to cover the gel pieces with a modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) solution at a 1:50 w/w enzyme:protein ratio. Digestion was performed overnight at 37°C. Tryptic peptides were extracted twice under agitation, first with 40 μ L of 60% ACN in 0.1% formic acid (FA) for 1 h and then with 30 μ L of 100% ACN for 40 min. The collected extracts were pooled, the excess of ACN was vacuum dried, and the samples were resolubilized with 25 μ L of H₂O/ACN/FA (98/2/0.1 v/v/v) and sonicated in ice during 10 min prior to nanoLC-MS/MS analysis.

Mass spectrometry analysis and data preprocessing

NanoLC-MS/MS analyses were performed on a nanoAcquity UPLC device (Waters Corporation, Milford, USA) coupled to a Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Peptide separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH130 C18 column (250 mm \times 75 μ m with 1.7 μ m diameter particles) and a Symmetry C18 precolumn (20 mm \times 180 μ m with 5 μ m diameter particles, Waters). The solvent system consisted of 0.1% FA in water (solvent A) and 0.1%

Résultats

FA in ACN (solvent B). The samples were loaded into the enrichment column over 3 min at 5 μ L/min with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Peptides were eluted at 450 nL/min with the following gradient of solvent B: from 1 to 35% over 120 min and 35 to 90% over 1 min.

The MS capillary voltage was set to 1.8 kV at 250 °C. The system was operated in Data-Dependant Acquisition (DDA) mode with automatic switching between MS (50 ms/scan over a 300–1800 m/z range with R = 70,000) and MS/MS (100 ms/scan over a 200–2000 m/z range with R = 17,500) modes. The ten most abundant ions (intensity threshold 2×10^5) were selected on each MS spectrum for further isolation and higher energy collision dissociation (HCD) fragmentation, excluding unassigned and monocharged ions. The dynamic exclusion time was set to 60 s.

Raw data collected during NanoLC-MS/MS were processed using MaxQuant (version 1.5.5.1) (Cox, Molecular & cellular proteomics : MCP, 2014). Peaks were assigned with the Andromeda search engine with trypsin/P specificity. The database used for the searches contained all human entries extracted from UniProtKB-SwissProt including canonical sequences and isoforms (26 September 2016; 42,145 entries). The minimum peptide length required was seven amino acids and a maximum of one trypsin missed cleavage was allowed. The precursor mass tolerance was set to 20 ppm for the first search and 4.5 ppm for the main search. The fragment ion mass tolerance was set to 20 ppm. Methionine oxidation was set as a variable modification and carbamidomethylation of cysteines as a fixed modification. The maximum false discovery rate was 1% at peptide and protein levels with the use of a decoy strategy. The “match between runs” option was used.

The dataset was made of 53 measurements of 50503 peptides (outlying sample CLL99 24h was excluded) and we used the data preprocessing pipeline recommended by the MSqRob package (Goeminne, Molecular & cellular proteomics : MCP, 2016). First, the data were log₂ transformed and we applied quantile normalization. Then we removed proteins groups for which any of its member proteins is present in a smaller protein group. We filtered peptides that could be assessed as contaminant and we removed proteins that were only identified by peptides carrying one or more modification sites. Finally, peptide sequences that were identified only once in a single sample were removed because with only one identification, the model was perfectly confounded. We retrieved the gene symbols for every proteins, for which it was possible, in any protein groups using data from the UniProt database, The UniProt Consortium 2017 (Chen, Methods Mol Biol, 2017), using the proteins API (Nightingale, Nucleic Acids Res, 2017).

Gene expression Analysis

Small Nucleolar RNA (snor, 370 entries) and the microRNAs (MIR*, 1,651 entries) were filtered out. The initial dataset was composed of 23,348 entries for 54 measurements (6 subjects x 9 time points).

In order to improve FDR (Bourgon, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010), we filtered out low expressed genes. Instead of using a preset rule, such as “remove features without at least 1 read per million in n of the samples, where n is the size of the smallest group of replicates” (here $n=3$), we used a data-driven method with independent filtering performed by the HTSFilter package (Rau, Bioinformatics, 2013). The selection of DE genes is then carried out by the edgeR package on rpkm RNA expressions values.

The differential analysis was made using the glmLRT and the glmTreat (for differential expression above a threshold) functions of the edgeR package (McCarthy, Nucleic Acids Res, 2012). The scheme of the analysis was: (1) DE genes in each group. Separate group analysis to find genes significantly differentially expressed, with glmLRT or glmTreat, at the 5% or 1% FDR level at a given time ($T_i, i>0$) versus control ($T_0=0$) in each of the P and NP groups. Bi-clusterings were made for each of these selections to investigate relationships between the genes and the subjects. An additional analysis between the unstimulated (US) (T_0) and stimulated (S) (T_1 to T_8) measurement was performed using glmLRT only. (2) Genes responding at group x timepoint interaction. glmLRT and glmTreat detect genes that respond differently in the NP and P groups at any of the times (with respect to control time values). It can also be viewed as the group (NP/P) x stimulation interaction (US/S). Bi-clusterings were made for each of these selections to investigate relationships between the genes and the subjects. (3) One by one interaction analysis between groups and time. Bi-clusterings were made for each of these selections to investigate relationships between the genes and the subjects.

We also used the HTScluster package (Rau, Bioinformatics, 2015), to cluster those selections of genes. We performed a single run of HTScluster looking up to $K = 1, \dots, 35$ clusters, using the Trimmed Means of M-values (TMM) normalization (Robinson and Oshlack, Genome Biol, 2010), and the splitting small-EM strategy. In HTScluster, model selection may be performed using the DDSE calibration for slope heuristics, Djump calibration for slope heuristics, Bayesian Information Criterion (BIC), and Integrated Completed Likelihood (ICL) criterion. In cases where the slope heuristics approach may be applied, we used the capushe package (Arlot, R package, 2016), to provide diagnostic plots for this slope heuristics in order to ensure that sufficiently complex models have been considered.

Proteomic Data Analysis

We used a graphical method to straightforwardly and visually assess the proteins p-value well-calibration (Giai Gianetto, Proteomics, 2016). According to calibration plots, p-values distributions were not standard and hence the use of the cp4p package (Giai Gianetto, Proteomics, 2016), to perform more involved FDR correction was required. Almost all the choices of the FDR control method provided by the cp4p package led to the same numbers of DA proteins. We selected the

two-stage Benjamini and Hochberg procedure (Benjamini, Biometrika, 2006) because it can limit the FDR to a given level: for the DA analysis, it was set to 0.05.

The differential analysis was made using the *test.contrast_adjust* function of the *MSqRob* package (Goeminne, Molecular & cellular proteomics : MCP, 2016). The scheme of the analysis was (*identical as the one used for gene analysis// et supprimer la fin du paragraphe*): (1) *Protein groups DA in each group. Separate group analysis to find protein groups significantly differentially abundant at the 5 % or 1% FDR level at a given time (Ti, i>0) versus control (T0=0) in each of the P and NP groups. Bi-clusterings, volcano plots, boxplots and scatter plots were made for each of these selections to investigate relationships between the proteins and the subjects. An additional analysis between the US (unstimulated, T0) and S (stimulated, T1 to T8) measurement was performed.* (2) *Protein groups responding at group x timepoint interaction. It aims to detect protein groups that respond differently in the NP and P groups at any of the times (with respect to control time values). It can also be viewed as the group (NP/P) x stimulation interaction (US/S). Bi-clusterings, volcano plots, boxplots and scatter plots were made for each of these selections to investigate relationships between the proteins and the subjects.* (3) *One by one interaction analysis between groups and time. Bi-clusterings, volcano plots, boxplots and scatter plots were made for each of these selections to investigate relationships between the proteins and the subjects.*

Merging gene and protein dataset

We merged the gene and protein groups datasets and we performed several checks to assess the effect of filtering the genes or inferring protein abundancies. Matching protein groups with gene names was also done cautiously. For instance, we had to deal with protein groups that featured multiple gene names, hopefully the number of these cases was very low.

Genes and protein groups selection

The selection of the actors of the networks was made in three steps. First we included genes DE for a TREAT test or proteins DA at the 1% FDR level. We then added to that selection DE genes or DA proteins at the 5% level in the NPvsP comparisons for any of the 24 tests. Finally, we added to the previous selection genes and proteins selected according to their temporal profile within the P, NP or NPvsP groups -looking for peaks- and their DE or DA ranking. In those profile based selections, we got 4023 unique genes, 1690 unique proteins group and 5099 unique gene ID after merging the geneid selected as genes and the gene ID selected as proteins. Several Venn diagrams were made to get more insights on the selection process. The number of unique gene ID in the final selection is 5733. Among those, 5722 genes were observed by RNA-seq and 2548 protein groups were measured in proteomics.

Clustering and Network reverse engineering

We aim to perform a network reverse engineering both for the NP and the P networks. We first needed to split the genes and proteins into clusters according to their temporal-profile. We first adjusted the range of the genes expressions and of the proteins abundancies in order to improve the similarities between the genes and proteins groups values. We used the Mfuzz package (Futschik and Carlisle, J Bioinform Comput Biol, 2005; Kumar and M, Bioinformatics, 2007) to derive a soft clustering of the log fold changes of our selection. First, using only the gene expression data and after some experiments, a total number of 20 time-clusters was selected since it showed homogeneous time-clusters with temporal patterns featuring expected patterns such as waves or peaks. Then we refined further that clustering for gene ID featuring both gene expressions and proteins abundancies and got 21 additional time-clusters.

We had to model $N = 7747$ actors for the reverse engineering across $T = 8$ timepoints and for $P = 3$ individuals; we denote by x_{npt} the observed value (gene expression or protein abundance) of the actor n for an individual p at a timepoint t .

For any actor of the network n among the $N = 7747$ ones, the mathematical model was written this way:

$$\tilde{x}_{np} = \sum_{n'=1}^N \omega_{n'm} F_{m(n')m(n)} \tilde{x}_{n'p} + \varepsilon_{np}, \quad 1 \leq p \leq P.$$

- N is the total number of actors,
- $k \mapsto m(k)$, is the function that maps an actor to its time-cluster,
- F_{ij} , is a T square matrix that describes the action of the actors belonging to cluster i on an actor that belongs to cluster j ,
- ω_{kl} is the strength of the connection from actor k towards actor l ,
- ε_{np} , $1 \leq p \leq P$, is a T dimensional random vector with zero mean and unit variance I_T .

So, in this model $\tilde{x}_{n..}$ is the regulated actor and $\tilde{x}_{n_0..}$, $1 \leq n_0 \neq n \leq 7747$, are the regulators $-n_0 \neq n$ to not allow self regulation.

It is known that genes or proteins tend to be regulated by few genes or proteins whereas a given gene or protein can regulate many other genes or proteins. Hence we chose to carry out the fitting of the model using penalized regression. In addition, in order to select only the more relevant and stable regulators for given actor, we used a weighted variant of stability selection (Meinshausen and

Bühlmann, Journal of the Royal Statistical Society: series B (Statistical methodology), 2010) combined with nonnegative least squares and a coordinate ascent approach by alternatively supposing the F_{ij} matrices known or the ω matrix known. To get a more robust result, the estimation of the \widehat{F}_{ij} matrices was done several times by cross-validation. Furthermore, to avoid computational issues, the new solution was chosen by a linear combination between the old and the new solution.

The result of the estimation process was threefold:

- a connectivity network described by the nonzero elements of $\widehat{\omega}$, if $\widehat{\omega}_{n'n} \neq 0$ means that an action of n' on n was detected,
- any \widehat{F}_{ij} matrix catches if there is an effect of cluster i on cluster j and at which time(s) those effects arise.
- the evolution through time –the signal through the network– of the action of actor n' on actor n . It can be derived by computing the product $\widehat{\omega}_{n'n} \widehat{F}_{m(n')m(n)}$ through can be derived by combining the ω and F_{ij} .

TABLE 1: CLINICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CLL PATIENTS.

Sample	Sex	Age at diagnosis	I _{GHV} status*	VH identity (%)	ZAP70 status**	CD38 ***	cytogenetic	Binet stage	Lymphocytes (G/L)	BCR response
CLL-P1	F	70	UM	100	pos	neg	trisom12	A	18	P
CLL-P2	M	67	UM	99	pos	nd	trisom12	A	22	P
CLL-P3	F	72	UM	100	pos	pos	del13q	A	11	P
CLL-NP1	F	58	UM	100	pos	neg	0	A	28	NP
CLL-NP2	M	61	UM	100	pos	pos	0	A	56	NP
CLL-NP3	F	55	UM	99	pos	neg	del13q	A	15	NP
CLL-P/NP4	M	77	UM	100	pos	pos	trisom12	B	155	P/NP

* $\geq 98\%$ of VH identity for defining unmutated (UM) CLL cells (Damle, Blood, 1999). ** < 7 threshold of T-cells / CLL cells ratio of ZAP70 mean fluorescence intensity expression for defining ZAP70 positive CLL cells (Letestu, Cytometry B Clin Cytom, 2006). *** $\geq 30\%$ threshold for defining CD38 positive CLL. nd indicates non determined. Proliferative (P), non-proliferative (NP) response measured at day6 after initial B-cell receptor activation.

Figure legends

Figure 1: Unsupervised statistical analysis of genes expression.

(A) Multidimensional scaling plot analysis (principal coordinate analysis) based on the expression of the 500 most expressed genes (among a total of 23,248 normalized gene expressions) analyzed before (T0) and at eight time points (T1 to T8) after ex vivo cell activation for six CLL patients. Each dot represents the transcriptional profil of one CLL cell sample at a specific time point. A color code represents the different time points. Successive time points of a same cell sample are linked in the graph. **(B)** Hierarchical clustering of all samples and all time points (clustered image map), based on the expression of the 500 most expressed genes. **(C)** Temporal cluster representation.

Figure 2: Unsupervised statistical analysis of proteins expression.

(A) Multidimensional scaling plot analysis (principal coordinate analysis) based on the expression of the 500 most abundant proteins analyzed before and after ex vivo cell activation for six CLL patients. Each dot represents the proteome of one CLL cell sample at a specific time point before (T0) and at eight time points (T1 to T8) after cell stimulation. A color code represents the different time points. Successive time points of a same cell sample are linked in the graph. **(B)** Hierarchical clustering of all samples and all time points, based on the expression of the 500 most abundant proteins. **(C)** Temporal cluster representation.

Figure 3: Supervised statistical analysis of genes and proteins temporal expression.

i) Temporal signature (T v T0 comparison, horizontally). Number of genes differentially expressed (DE) and proteins differentially abundant (DA) in proliferating (n=3) and non-proliferating cells (n=3) across time after cell stimulation (T1 to T8), compared to initial (T0) expression/abundance (FDR=1%). **ii) Response signature** (proliferative v non-proliferative comparison, vertically). Number of DE genes and DA proteins in proliferative CLL cells, compare to non-proliferative cells (FDR 5%). **iii) Proliferative signature** (combination of T v T0 and proliferative v non-proliferative comparisons). Comparison of the list of DE genes and DA proteins expressed in proliferative samples after BCR engagement, compared to T0 (T v T0), and the list of DE genes and DA proteins in these proliferative samples compared to the non-proliferative samples (proliferative v non-proliferative). Comparison of these two lists showed a “proliferative signature” of genes and proteins specifically DE/DA after stimulation in proliferative samples.

Figure 4: Supervised statistical analysis of genes and proteins temporal expression in proliferating CLL cells.

(A) Number of DE genes and (B) Number of DA proteins at each time point after cell stimulation in proliferating CLL cells. At each time point (T1 to T8), the number of genes and proteins up- or down-regulated (T v T0 Log2FC) are shown in orange or blue, respectively. The number of genes and proteins specifically up- or down-regulated in proliferative compare to non-proliferative cells are shown in dark-orange or dark-blue respectively in the graph. (C) Correlation (D) Temporal expression/abundance of the 421 gene-protein pairs in the proliferating cells. At each time point, up-regulated (T v T0 positive Log2FC) or down-regulated (T v T0 negative Log2FC) genes and proteins are shown in red or blue, respectively.

Figure 5: Temporal representation of biological functions (BP) of up- or down-regulated proteins in proliferating CLL cells.

The heat map shows, with a color code, the number of proteins differentially up-regulated (red) or down-regulated (blue) assigned to a particular Gene Ontology (GO) function, at each time point after cell stimulation in the proliferating cells. The GO Biological processes have been selected after DAVID database functional enrichment analysis (Huang da, Nat Protoc, 2009) of the 1,107 differentially up- or down-regulated proteins in the proliferating cell samples. The retained GO functions are organized within functional clusters in the graph. First eight columns show the number of differentially up-regulated proteins at each time point (T1 to T8). The second eight columns show the number of differentially down-regulated proteins assigned to the same GO at each time point.

Figure 6: Temporal signal propagation in the transcriptional and proteomic network induced after BCR stimulation in proliferating cells.

Temporal graphical representation of statistical interactions (arrows) between genes (circle) and/or proteins (square) across time in the proliferating CLL cells after B-cell receptor stimulation. A color code represents genes and proteins differentially (DE/DA T v T0) up- (red) or down-regulated (blue) at each time point after cell activation. Genes or proteins specifically up- or down-regulated in proliferating cells from the proliferative signature (DE/DA T v T0 and DE/DA P v NP) are represented in orange or light blue, respectively. Graphical representation made with Cytoscape software (Shannon, Genome Res, 2003).

Figure 7: Nested temporal proliferative program induced after BCR stimulation in proliferating cells.

Résultats

Proteins differentially expressed at least at one of the time point (DA T v T0) in proliferating CLL cells after cell activation and assigned to a particular GO biological process related to “cell cycle” or “proliferation” were selected in the global regulatory network. Genes and proteins linked to these proteins at previous time points (upstream neighbors) were also selected. The resulting temporal subnetwork is represented in the time ordered graph, with genes (circle) and proteins (square) represented at their first time point of differential expression after cell activation (first time DE/DA T v T0). Genes and proteins up- or down-regulated are represented in red or blue, respectively and size of circles and squares are proportional to fold-changes ($\text{Log}_2\text{FC T v T0}$). The 173 seeding proteins involved in “cell cycle” or “proliferation” are grouped in the upper part of the graph. The 71 genes coding some of these 173 proteins are represented in the middle. The 50 genes and 94 proteins also included in this proliferative sub-network are grouped in the lower part of the graph.

Acknowledgments

We would like to thank Drs XXX for critical reading of this manuscript. We are grateful to Ouria Tahar, Antoine Hanauer (Inserm UMR S_1109) and Nathalie Perrusson (Inserm UMR S-1113) for technical help. Drs Laurent Miguët, Anne-Cécile Galoisy and Caroline Mayeur-Rousse (Laboratoire d'Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France) for CLL cell characterization, Beatrice Uring-Lambert (Laboratoire d'Immunologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France) for help with flow cytometry, , as well as Elise Toussaint and Blandine Guffroy (Service d'Hématologie Adulte, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France) for providing CLL samples, and Dr Jozo Delic (Commissariat à l'Energie Atomique, Fontenay-aux-roses, France) for helpful suggestions

This work was supported by grants from the Institut Thématique Multi-Organism (ITMO) cancer initiative within the framework plan cancer 2009-2013 "GenPred project", Inserm UMR-S1109, Initiative d'Excellence-CNRS, the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), Alsace Cancer association to LV. The Strasbourg School of Medicine Next Generation Sequencing center, the Institut Universitaire de France (IUF), the Ligue contre le Cancer, the LABEX Transplantex [ANR-11-LABX-0070_Transplantex] (French National Research Agency; ANR) and Inserm UMR-S1109 to SB and the CNRS UMR 7501, the LABEX IRMIA [ANR-11-LABX-0055] to FB.

Authorship contributions

CS performed biological experiments and analyzed data. LMF, LM and CC performed proteomic analysis and analyzed data. AP, RC, NP, SB performed RNAseq analysis and analyzed data. LM performed CLL cells biological characterization. RH provided CLL samples and clinical informations. FB and MMB designed and performed statistical analysis and modeling. LV, CS and JNF wrote the manuscript. LV designed, supervised the study and analyzed data. All authors read and concurred with the manuscript and its contents.

Conflict-of-interest Disclosure

The authors declare no competing interests – financial and non-financial - with the present work.

References:

- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* *31*, 166-169.
- Arlot, S., Brault, V., Baudry, J.P., Maugis, C., and Michel, B. (2016). capushe: CALibrating Penalties Using Slope HEuristics. R package version 1.1.1. R package.
- Bar-Joseph, Z., Gitter, A., and Simon, I. (2012). Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. *Nat Rev Genet* *13*, 552-564.
- Basso, K., Margolin, A.A., Stolovitzky, G., Klein, U., Dalla-Favera, R., and Califano, A. (2005). Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat Genet* *37*, 382-390.
- Benjamini, Y., Krieger, A.M., and Yekutieli, D. (2006). Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika* *93*, 491-507.
- Bourgon, R., Gentleman, R., and Huber, W. (2010). Independent filtering increases detection power for high-throughput experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 9546-9551.
- Caligaris-Cappio, F. (2003). Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* *123*, 380-388.
- Chen, C., Huang, H., and Wu, C.H. (2017). Protein Bioinformatics Databases and Resources. *Methods Mol Biol* *1558*, 3-39.
- 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.
- Coscia, M., Pantaleoni, F., Riganti, C., Vitale, C., Rigoni, M., Peola, S., Castella, B., Foglietta, M., Griggio, V., Drandi, D., Ladetto, M., Bosis, A., Boccadoro, M., and Massaia, M. (2011). IGHV unmutated CLL B cells are more prone to spontaneous apoptosis and subject to environmental prosurvival signals than mutated CLL B cells. *Leukemia* *25*, 828-837.
- Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *13*, 2513-2526.
- Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 1840-1847.
- Deglesne, P.A., Chevallier, N., Letestu, R., Baran-Marszak, F., Beitar, T., Salanoubat, C., Sanhes, L., Nataf, J., Roger, C., Varin-Blank, N., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (2006). Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* *66*, 7158-7166.
- Duhren-von Minden, M., Ubelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M.P., Buchner, M., Hofmann, D., Surova, E., Follo, M., Kohler, F., Wardemann, H., Zirlik, K., Veelken, H., and Jumaa, H. (2012). Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* *489*, 309-312.

- Fabbri, G., and Dalla-Favera, R. (2016). The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer* *16*, 145-162.
- Fournier, M.L., Paulson, A., Pavelka, N., Mosley, A.L., Gaudenz, K., Bradford, W.D., Glynn, E., Li, H., Sardu, M.E., Fleharty, B., Seidel, C., Florens, L., and Washburn, M.P. (2010). Delayed correlation of mRNA and protein expression in rapamycin-treated cells and a role for Ggc1 in cellular sensitivity to rapamycin. *Mol Cell Proteomics* *9*, 271-284.
- Futschik, M.E., and Carlisle, B. (2005). Noise-robust soft clustering of gene expression time-course data. *J Bioinform Comput Biol* *3*, 965-988.
- Giai Gianetto, Q., Combes, F., Ramus, C., Bruley, C., Coute, Y., and Burger, T. (2016). Calibration plot for proteomics: A graphical tool to visually check the assumptions underlying FDR control in quantitative experiments. *Proteomics* *16*, 29-32.
- 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.
- Goeminne, L.J., Gevaert, K., and Clement, L. (2016). Peptide-level Robust Ridge Regression Improves Estimation, Sensitivity, and Specificity in Data-dependent Quantitative Label-free Shotgun Proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *15*, 657-668.
- Guarini, A., Chiaretti, S., Tavolaro, S., Maggio, R., Peragine, N., Citarella, F., Ricciardi, M.R., Santangelo, S., Marinelli, M., De Propriis, M.S., Messina, M., Mauro, F.R., Del Giudice, I., and Foa, R. (2008). BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* *112*, 782-792.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 1848-1854.
- Hamilton, E., Pearce, L., Morgan, L., Robinson, S., Ware, V., Brennan, P., Thomas, N.S., Yallop, D., Devereux, S., Fegan, C., Buggins, A.G., and Pepper, C. (2012). Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* *158*, 589-599.
- Hao, S., and Baltimore, D. (2009). The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol* *10*, 281-288.
- Hecker, M., Lambeck, S., Toepfer, S., van Someren, E., and Guthke, R. (2009). Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models-a review. *Biosystems* *96*, 86-103.
- Herishanu, Y., Perez-Galan, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., Raghavachari, N., Liu, P., McCoy, J.P., Raffeld, M., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C., Sherry, R., Arthur, D.C., Maric, I., White, T., Marti, G.E., Munson, P., Wilson, W.H., and Wiestner, A. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *117*, 563-574.
- Herman, S.E., Gordon, A.L., Hertlein, E., Ramanunni, A., Zhang, X., Jaglowski, S., Flynn, J., Jones, J., Blum, K.A., Buggy, J.J., Hamdy, A., Johnson, A.J., and Byrd, J.C. (2011). Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* *117*, 6287-6296.

- Hoogeboom, R., van Kessel, K.P., Hochstenbach, F., Wormhoudt, T.A., Reintjes, R.J., Wagner, K., Kater, A.P., Guikema, J.E., Bende, R.J., and van Noesel, C.J. (2013). A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J Exp Med* *210*, 59-70.
- Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* *4*, 44-57.
- Ideker, T., Dutkowsky, J., and Hood, L. (2011). Boosting signal-to-noise in complex biology: prior knowledge is power. *Cell* *144*, 860-863.
- Jayapal, K.P., Philp, R.J., Kok, Y.J., Yap, M.G., Sherman, D.H., Griffin, T.J., and Hu, W.S. (2008). Uncovering genes with divergent mRNA-protein dynamics in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* *3*, e2097.
- Jung, N., Bertrand, F., Bahram, S., Vallat, L., and Maumy-Bertrand, M. (2014). Cascade: a R package to study, predict and simulate the diffusion of a signal through a temporal gene network. *Bioinformatics* *30*, 571-573.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* *14*, R36.
- Koksal, A.S., Beck, K., Cronin, D.R., McKenna, A., Camp, N.D., Srivastava, S., MacGilvray, M.E., Bodik, R., Wolf-Yadlin, A., Fraenkel, E., Fisher, J., and Gitter, A. (2018). Synthesizing Signaling Pathways from Temporal Phosphoproteomic Data. *Cell Rep* *24*, 3607-3618.
- Kumar, L., and M, E.F. (2007). Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics* *2*, 5-7.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* *9*, 357-359.
- Law, C.W., Chen, Y., Shi, W., and Smyth, G.K. (2014). voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* *15*, R29.
- Letestu, R., Rawstron, A., Ghia, P., Villamor, N., Boeckx, N., Boettcher, S., Buhl, A.M., Duerig, J., Ibbotson, R., Kroeber, A., Langerak, A., Le Garff-Tavernier, M., Mockridge, I., Morilla, A., Padmore, R., Rassenti, L., Ritgen, M., Shehata, M., Smolewski, P., Staib, P., Ticchioni, M., Walker, C., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (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.
- Liu, Z.P., Wu, C., Miao, H., and Wu, H. (2015). RegNetwork: an integrated database of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks in human and mouse. *Database (Oxford)* *2015*.
- Martin, M., Hua, L., Wang, B., Wei, H., Prabhu, L., Hartley, A.V., Jiang, G., Liu, Y., and Lu, T. (2017). Novel Serine 176 Phosphorylation of YBX1 Activates NF-kappaB in Colon Cancer. *J Biol Chem* *292*, 3433-3444.
- McCarthy, D.J., Chen, Y., and Smyth, G.K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* *40*, 4288-4297.
- Meinshausen, N., and Bühlmann, P. (2010). Stability selection. *Journal of the Royal Statistical Society: series B (Statistical methodology)* *72*, 417-473.
- Meinshausen, N., and Bühlmann, P. (2010). Stability selection. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* *72*, 417-473.
- Messmer, B.T., Albesiano, E., Efremov, D.G., Ghiotto, F., Allen, S.L., Kolitz, J., Foa, R., Damle, R.N., Fais, F., Messmer, D., Rai, K.R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2004). Multiple

- distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* *200*, 519-525.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. (2012). *Janeway's immunobiology*, 8th edn (New York: Garland Science).
- Nightingale, A., Antunes, R., Alpi, E., Bursteinas, B., Gonzales, L., Liu, W., Luo, J., Qi, G., Turner, E., and Martin, M. (2017). The Proteins API: accessing key integrated protein and genome information. *Nucleic Acids Res* *45*, W539-W544.
- Niirio, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* *2*, 945-956.
- 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.
- Pede, V., Rombout, A., Vermeire, J., Naessens, E., Mestdagh, P., Robberecht, N., Vanderstraeten, H., Van Roy, N., Vandesompele, J., Speleman, F., Philippe, J., and Verhasselt, B. (2013). CLL cells respond to B-Cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression. *PLoS One* *8*, e60275.
- Perrot, A., Pionneau, C., Nadaud, S., Davi, F., Leblond, V., Jacob, F., Merle-Beral, H., Herbrecht, R., Bene, M.C., Gribben, J.G., Bahram, S., and Vallat, L. (2011). A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *118*, e1-15.
- 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., Kay, N.E., Greaves, A., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2004). ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* *351*, 893-901.
- Rau, A., Gallopin, M., Celeux, G., and Jaffrezic, F. (2013). Data-based filtering for replicated high-throughput transcriptome sequencing experiments. *Bioinformatics* *29*, 2146-2152.
- Rau, A., Maugis-Rabusseau, C., Martin-Magniette, M.L., and Celeux, G. (2015). Co-expression analysis of high-throughput transcriptome sequencing data with Poisson mixture models. *Bioinformatics* *31*, 1420-1427.
- Robinson, M.D., and Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* *11*, R25.
- Rodriguez, A., Villuendas, R., Yanez, L., Gomez, M.E., Diaz, R., Pollan, M., Hernandez, N., de la Cueva, P., Marin, M.C., Swat, A., Ruiz, E., Cuadrado, M.A., Conde, E., Lombardia, L., Cifuentes, F., Gonzalez, M., Garcia-Marco, J.A., Piris, M.A., and Spanish National Cancer, C. (2007). Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia* *21*, 1984-1991.
- Schleiss, C., Ilias, W., Tahar, O., Guler, Y., Miguet, L., Mayeur-Rousse, C., Mauvieux, L., Fornecker, L.M., Toussaint, E., Herbrecht, R., Bertrand, F., Maumy-Bertrand, M., Martin, T., Fournel, S., Georgel, P., Bahram, S., and Vallat, L. (2019). BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation ex vivo. *Sci Rep* *9*, 701.
- Schmid, C., and Isaacson, P.G. (1994). Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology* *24*, 445-451.

- Schwanhausser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* *473*, 337-342.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* *13*, 2498-2504.
- Staudt, L.M. (2010). Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000109.
- Stevenson, F.K., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* *103*, 4389-4395.
- Vallat, L., Kemper, C.A., Jung, N., Maumy-Bertrand, M., Bertrand, F., Meyer, N., Pocheville, A., Fisher, J.W., 3rd, Gribben, J.G., and Bahram, S. (2013). Reverse-engineering the genetic circuitry of a cancer cell with predicted intervention in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 459-464.
- Vallat, L.D., Park, Y., Li, C., and Gribben, J.G. (2007). Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood* *109*, 3989-3997.
- Waldbauer, J.R., Rodrigue, S., Coleman, M.L., and Chisholm, S.W. (2012). Transcriptome and proteome dynamics of a light-dark synchronized bacterial cell cycle. *PLoS One* *7*, e43432.
- Waters, K.M., Liu, T., Quesenberry, R.D., Willse, A.R., Bandyopadhyay, S., Kathmann, L.E., Weber, T.J., Smith, R.D., Wiley, H.S., and Thrall, B.D. (2012). Network analysis of epidermal growth factor signaling using integrated genomic, proteomic and phosphorylation data. *PLoS One* *7*, e34515.
- Yeomans, A., Thirdborough, S.M., Valle-Argos, B., Linley, A., Krysov, S., Hidalgo, M.S., Leonard, E., Ishfaq, M., Wagner, S.D., Willis, A.E., Steele, A.J., Stevenson, F.K., Forconi, F., Coldwell, M.J., and Packham, G. (2016). Engagement of the B-cell receptor of chronic lymphocytic leukemia cells drives global and MYC-specific mRNA translation. *Blood* *127*, 449-457.
- Yosef, N., and Regev, A. (2011). Impulse control: temporal dynamics in gene transcription. *Cell* *144*, 886-896.
- Yoshida, T., Higuchi, T., Hagiya, H., Strasser, A., Nishioka, K., and Tsubata, T. (2000). Rapid B cell apoptosis induced by antigen receptor ligation does not require Fas (CD95/APO-1), the adaptor protein FADD/MORT1 or CrmA-sensitive caspases but is defective in both MRL+/+ and MRL-lpr/lpr mice. *International immunology* *12*, 517-526.
- Zenz, T., Mertens, D., Kuppers, R., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer* *10*, 37-50.

Supplemental methods

Clustering and Network reverse engineering

The selection and reverse engineering steps were carried out using the new Patterns R package

The selection of the actors of the networks was made in three steps:

- Base selection = Treat 1% FDR DE genes for any of the 24 tests and 1% FDR DA protein groups for any of the 24 tests.
- Enrichment 1 = NP v P 5% DE genes or DA protein groups for any of the 24 tests (without FDR correction for the 24 tests)
- Enrichment 2 = Based on temporal profiles.

More precisely, a gene could be selected by the profile based enrichment if:

Its DE ranking is less than 200 and it features:

- A single peak at a single time.
- A single peak for two consecutive times.
- A single peak for three consecutive times.

We used the Mfuzz package (Futschik and Carlisle, J Bioinform Comput Biol, 2005; Kumar and M, Bioinformatics, 2007) to derive a soft clustering of the log fold changes of our selection. We adjusted the range of the genes expressions and of the proteins abundancies in order to improve the similarities between the genes and proteins groups values, so that we could try to cluster the merged dataset of genes expressions and proteins groups abundancies. First, using only the gene expression data and after some experiments, a total number of 20 clusters was selected since it showed homogeneous clusters with temporal patterns featuring expected patterns such as waves or peaks. Then we refined further that clustering for gene ID featuring both gene expressions and proteins abundancies and got 21 additional clusters.

Then we designed groups for both the NR and R network inferences in the following way:

1. For the 3707 gene expression data of the gene ID with gene expression data only, we used the previously derived 20 clusters, numbered from 1 to 20. The minimum size of a group is 68.
2. For the 2015 gene expression data of the gene ID with both gene expression and protein abundancies data, we used the previously derived 21 clusters, numbered from 21 to 41. The minimum size of a group is 44.
3. For the 2025 protein abundancies data of the gene ID with protein abundancies data –and for 2015 of them gene expression data–, we used the previously derived 21 clusters, numbered from 42 to 62. We had to infer, using random forest imputation and the mice R package (Van Buuren and

Groothuis-Oudshoorn, Journal of Statistical Software, 2011) the group membership values for the 10 proteins that only featured protein abundancies. The minimum size of a group is 44.

We will denote by G2P the action of a cluster of genes expressions on a cluster of protein abundancies, G2G the action of a cluster of genes expressions on a cluster of genes expressions, P2G the action of a cluster of protein abundancies on a cluster of genes expressions and P2P the action of a cluster of protein abundancies on a cluster of protein abundancies.

For any given cluster i among those 62 clusters, we set, for all of them and by analyzing the time course profiles of the cluster members, the first timepoint, denoted by O_i , for which it might begin to have an effect on the other actors of the networks.

In order to take into account relevant biological knowledge, we designed a weighted inference. The algorithm aims to reveal the links between the actors of the network –genes or proteins–. A weight, can favor or disfavor such a link. It ranges from 0, always in, to $+\infty$, always exclude; a unit weight being neutral.

Information on regulators, targets, as well as confidence (High, Low, Medium) and evidence (Experimental, Predicted), are provided by TransRegNet (34,1207 links) (Liu, Database (Oxford), 2015). The weight values were modulated according to the actual confidence and evidence values.

We chose several thresholds for the weights and matched them with the uncertainty of the biological knowledge of a given action of an actor of the network on another:

$$\text{always}=0 < + < + < + < + < + < 1 < - < - < + \text{Inf} = \text{exclude}$$

The weights also take several biological given or modelling assumption into account:

- If both gene expressions and protein abundancies were measured for a given gene ID, only the protein abundancy measurement must be used to infer its effect in the network.
- No actions within a cluster. The members of a given cluster (of genes or proteins) cannot be used to infer the expressions of the abundancies of other members of the same cluster. It makes since members of the same cluster share similar time profiles.
- No loop action (either for a gene on itself or for a protein on itself)

The core of the statistical model combined a F matrix –a square matrix of size $8 \times 62 = 496$ – that models the time dependent effects between clusters and a ω matrix –a square matrix of size 7747 – that captures a non-time dependent link (the possibility of an action) between the actors of the network. More precisely, a cell F_{ij} –itself a square matrix of size T – of the F matrix models the effect of cluster i on cluster j . Notice that if an actor of the network n_0 belongs to cluster i and an actor of the network n belongs to cluster j , the matrix F_{ij} allows the link between the actors n_0 and n to be time dependent. To enforce temporal causality, we used the two following time constraints.

- A cluster i cannot affect another cluster j , if $C_i \geq C_j$: this ensures that a cluster i cannot affect a cluster j if the first action time C_j of cluster j precedes the first action time of cluster i . Hence, if $C_i \geq C_j$, then the F_{ij} cell of the F matrices is set to 0 ($F_{ij}=0$). Figures 1 and 2 shows nonzero F_{ij} matrices for the R and NR network reverse engineering. These are the same for these data but could have happened to be different.
- If $C_i < C_j$, then the F_{ij} matrix is a lower triangular square matrix of size T . Its shape is chosen so that the measurement of an actor of the network at time t_k can influence another the measurement of an actor of the network at time t_{k_0} if and only if $k < k_0$. The only exception being the G2P case of the action of a cluster of genes i for which we also measured the proteins ($21 \leq i \leq 41$) on its protein cluster (the cluster of the proteins abundancies with the same Genelds numbered $i + 21$). In that case we choose. It is one of the main reason that accounts for creating the same clusters for both gene and proteins when possible.

The size of the F_{ij} was increased in order to cope with the G2P actions and the sub-diagonals and the diagonal of matrices F were no longer supposed to be invariant since the experimental timepoints were not equally distributed throughout the experiment –the times differences range from 30 minutes to 2 days–. Nevertheless, we assumed that for similar time steps, the interactions should depend only on time index differences rather than absolute time index. Hence some parts of the diagonal and sub-diagonal of the F_{ij} matrices are constant.

We have selected $N = 7747$ actors for the reverse engineering across $N = 8$ timepoints and for $P = 3$ individuals; we denote by x_{npt} observed value (gene expression of protein abundancy) of the actor n for an individual p at timepoint t .

For any actor of the network n among the $N = 7,747$ ones, the mathematical model can be written this way:

$$\tilde{x}_{n..} = \sum_{n'=1}^N F_{m(n')m(n)} \omega_{nn'} \tilde{x}_{n'..} + \varepsilon_n$$

- N is the total number of actors,
- $k \mapsto m(k)$, is the function that maps an actor to its time-cluster,
- F_{ij} , is a T square matrix that describes the action of the actors belonging to cluster i on an actor that belongs to cluster j ,
- ω_{kl} is the strength of the connection from actor k towards actor l ,
- ε_n is a zero mean and unit variance error vector of length T .

So, in this model $\tilde{x}_{n..}$ is the regulated actor and $\tilde{x}_{n_0..}$, $1 \leq n_0 \neq n \leq 7747$, are the regulators – $n_0 \neq n$ to not allow self regulation.

The fitting of the model was carried out using penalized regression in order to select only the more relevant regulators for given actor. More precisely, we used a weighted variant of stability selection, (Meinshausen and Bühlmann, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 2010) and a coordinate ascent approach by alternatively supposing the F_{ij} matrices known or the ω matrix known. To get a more robust result, the estimation of the \hat{F}_{ij} matrices is done several times by cross-validation. Furthermore, to avoid computational issues, the new solution is chosen by a linear combination between the old and the new solution.

The result of the estimation process is threefold:

- a connectivity network described by the nonzero elements of $\hat{\omega}$, if $\hat{\omega}_{n'n} \neq 0$ means that an action of n' on n was detected,
- any \hat{F}_{ij} matrix catches if there is an effect of cluster i on cluster j and at which time(s) those effects arise.
- the evolution through time –the signal through the network– of the action of actor n' on actor n . It can be derived by computing the product $\hat{F}_{m(n')m(n)}\hat{\omega}_{n'n}$ through can be derived by combining the ω and F_{ij} .

References supplemental methods

- Bertrand, F., and Maumy-Bertrand, M. (2018). Patterns: patterned networks reverse engineering. R package.
- Futschik, M.E., and Carlisle, B. (2005). Noise-robust soft clustering of gene expression time-course data. *J Bioinform Comput Biol* 3, 965-988.
- Kumar, L., and M, E.F. (2007). Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics* 2, 5-7.
- Liu, Z.P., Wu, C., Miao, H., and Wu, H. (2015). RegNetwork: an integrated database of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks in human and mouse. *Database (Oxford)* 2015.
- Meinshausen, N., and Bühlmann, P. (2010). Stability selection. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 72, 417-473.
- Van Buuren, S., and Groothuis-Oudshoorn, K. (2011). mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *Journal of Statistical Software* 45, 1-67.

Supplemental Figure legends

Figure S1: CLL cells functional response measured at day 6 after B-cell receptor activation

CLL cells samples from six patients have been negatively selected (Rosetsep) and efficacy of this cell selection has been controlled after CD5 and CD19 staining. All cell samples have been stained with CFSE at T0 before BCR stimulation. At day six after stimulation, percentage of proliferating cells and number of cell generations was analyzed with flow cytometry. Proliferation was defined by percentage of proliferating cells (CFSE^{dim}) > 20% and number of cell generations >= 2. This study included three proliferating CLL samples and three non-proliferating samples. These last ones were used as controls for the analysis. One supplementary patient bearing two sub-clones, one proliferating and the other non-proliferating. These two sub-clones have been cell sorted and cell samples have been stimulated separately (giving an optimal control for the proliferative response).

Figure S2: experimental design

Three proliferative and three non-proliferative samples have been included. BCR engagement was performed at T0 and cell samples were collected at T0 and 8 time points after cell stimulation for gene expression and protein abundance measurements. At day six, cell proliferation has been quantified by flow cytometry after initial staining with CFSE.

Figure S3: methods outline

Summary of mRNA expression quantification, protein abundance quantification and mathematical analysis

Figure S4: model

(A) Genes and proteins are represented by circles and squares, respectively. Genes or proteins differentially expressed at least at one of the time point after cell stimulation in our experiment are represented with a full lined circle or square. Genes or proteins not measured in our experiment are represented with a dot line. Authorized links between genes and/or proteins in the formalized model are represented by arrows (gene to protein (G2P), gene to gene (G2G), protein to gene (P2G), protein to protein (P2P)). Weighted links between genes and proteins with the same gene symbol (after translation of protein accession numbers in gene symbols (e.g. gene_A and protein_A) are represented in bold. Weighted links between a protein with transcriptional factor activity and its known gene target (e.g. gene_B, or the corresponding protein_B if the gene_B is not measured in our experiment) based on database information (e.g. RegNetWork (Liu, Database (Oxford), 2015), are

also represented in bold. **(B)** Matrix of temporal interactions shows authorized links between couple of time points for G2G, P2G, P2P and G2P. Each letter symbolizes a weight for a particular temporal link.

Figure S5: model validation

To test our model (Bertrand and Maumy-Bertrand, R package, 2018), we analyzed the sensitivity (A), predictive positive value (B) and F-score (C) with Cascade algorithm (Jung, Bioinformatics, 2014), a non-weighted, appropriately weighted and an incorrectly weighted version of our algorithm, a non-weighted stability selection (Sill, Journal of Statistical Software, 2014) based version of our algorithm. To simulate the measurements of the actors based on a regulatory network, we designed an algorithm that is inspired by the preferential attachment (Barabasi and Oltvai, Nat Rev Genet, 2004). Then, we adapted it to temporal nested networks. We then used our model to make some simulations, using Laplace laws to set the values of the measurements of the actors at the first time point.

Figure S6: Global modeling of genes and proteins temporal interactions after BCR stimulation in proliferating CLL cells.

Visualization of the joint inference of statistical interactions between genes and proteins differentially expressed at least at one of the time point ($T \neq T_0$) after cell stimulation in proliferating cells. Circles represent genes, squares represent proteins and edges represent inferred links between genes and /or proteins across time. The graphical representation (generated with Cytoscape software, (Shannon, Genome Res, 2003)) includes 2,167 genes and 1,074 proteins (for a total of 2,846 unique symbols). Potential interactions (represented in the graph when $\omega \geq .01$, see methods section) between genes and/or proteins expression over time are represented by time-directed arrows.

References supplemental figures:

Barabasi, A.L., and Oltvai, Z.N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 5, 101-113.
 Bertrand, F., and Maumy-Bertrand, M. (2018). Patterns: patterned networks reverse engineering. R package.
 Jung, N., Bertrand, F., Bahram, S., Vallat, L., and Maumy-Bertrand, M. (2014). Cascade: a R package to study, predict and simulate the diffusion of a signal through a temporal gene network. *Bioinformatics* 30, 571-573.

- Liu, Z.P., Wu, C., Miao, H., and Wu, H. (2015). RegNetwork: an integrated database of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks in human and mouse. *Database (Oxford)* 2015.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13, 2498-2504.
- Sill, M., Hielscher, T., Becker, N., and Zucknick, M. (2014). Extended Inference with Lasso and Elastic-Net Regularized Cox and Generalized Linear Models. *Journal of Statistical Software* 62, 1-22.

Global Reference list

- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* *31*, 166-169.
- Arlot, S., Brault, V., Baudry, J.P., Maugis, C., and Michel, B. (2016). capushe: CALibrating Penalties Using Slope HEuristics. R package version 1.1.1. R package.
- Bar-Joseph, Z., Gitter, A., and Simon, I. (2012). Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. *Nat Rev Genet* *13*, 552-564.
- Barabasi, A.L., and Oltvai, Z.N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* *5*, 101-113.
- Basso, K., Margolin, A.A., Stolovitzky, G., Klein, U., Dalla-Favera, R., and Califano, A. (2005). Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat Genet* *37*, 382-390.
- Benjamini, Y., Krieger, A.M., and Yekutieli, D. (2006). Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika* *93*, 491-507.
- Bertrand, F., and Maumy-Bertrand, M. (2018). Patterns: patterned networks reverse engineering. R package.
- Bourgon, R., Gentleman, R., and Huber, W. (2010). Independent filtering increases detection power for high-throughput experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 9546-9551.
- Caligaris-Cappio, F. (2003). Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* *123*, 380-388.
- Chen, C., Huang, H., and Wu, C.H. (2017). Protein Bioinformatics Databases and Resources. *Methods Mol Biol* *1558*, 3-39.
- 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.
- Coscia, M., Pantaleoni, F., Riganti, C., Vitale, C., Rigoni, M., Peola, S., Castella, B., Foglietta, M., Griggio, V., Drandi, D., Ladetto, M., Bosia, A., Boccadoro, M., and Massaia, M. (2011). IGHV unmutated CLL B cells are more prone to spontaneous apoptosis and subject to environmental prosurvival signals than mutated CLL B cells. *Leukemia* *25*, 828-837.
- Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *13*, 2513-2526.
- Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 1840-1847.
- Deglesne, P.A., Chevallier, N., Letestu, R., Baran-Marszak, F., Beitar, T., Salanoubat, C., Sanhes, L., Nataf, J., Roger, C., Varin-Blank, N., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (2006). Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* *66*, 7158-7166.

- Duhren-von Minden, M., Ubelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M.P., Buchner, M., Hofmann, D., Surova, E., Follo, M., Kohler, F., Wardemann, H., Zirlik, K., Veelken, H., and Jumaa, H. (2012). Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* **489**, 309-312.
- Fabbri, G., and Dalla-Favera, R. (2016). The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer* **16**, 145-162.
- Fournier, M.L., Paulson, A., Pavelka, N., Mosley, A.L., Gaudenz, K., Bradford, W.D., Glynn, E., Li, H., Sardu, M.E., Fleharty, B., Seidel, C., Florens, L., and Washburn, M.P. (2010). Delayed correlation of mRNA and protein expression in rapamycin-treated cells and a role for Ggc1 in cellular sensitivity to rapamycin. *Mol Cell Proteomics* **9**, 271-284.
- Futschik, M.E., and Carlisle, B. (2005). Noise-robust soft clustering of gene expression time-course data. *J Bioinform Comput Biol* **3**, 965-988.
- Giai Gianetto, Q., Combes, F., Ramus, C., Bruley, C., Coute, Y., and Burger, T. (2016). Calibration plot for proteomics: A graphical tool to visually check the assumptions underlying FDR control in quantitative experiments. *Proteomics* **16**, 29-32.
- 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.
- Goeminne, L.J., Gevaert, K., and Clement, L. (2016). Peptide-level Robust Ridge Regression Improves Estimation, Sensitivity, and Specificity in Data-dependent Quantitative Label-free Shotgun Proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **15**, 657-668.
- Guarini, A., Chiaretti, S., Tavolaro, S., Maggio, R., Peragine, N., Citarella, F., Ricciardi, M.R., Santangelo, S., Marinelli, M., De Propriis, M.S., Messina, M., Mauro, F.R., Del Giudice, I., and Foa, R. (2008). BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* **112**, 782-792.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848-1854.
- Hamilton, E., Pearce, L., Morgan, L., Robinson, S., Ware, V., Brennan, P., Thomas, N.S., Yallop, D., Devereux, S., Fegan, C., Buggins, A.G., and Pepper, C. (2012). Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* **158**, 589-599.
- Hao, S., and Baltimore, D. (2009). The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol* **10**, 281-288.
- Hecker, M., Lambeck, S., Toepfer, S., van Someren, E., and Guthke, R. (2009). Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models-a review. *Biosystems* **96**, 86-103.
- Herishanu, Y., Perez-Galan, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., Raghavachari, N., Liu, P., McCoy, J.P., Raffeld, M., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C., Sherry, R., Arthur, D.C., Maric, I., White, T., Marti, G.E., Munson, P., Wilson, W.H., and Wiestner, A. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563-574.

- Herman, S.E., Gordon, A.L., Hertlein, E., Ramanunni, A., Zhang, X., Jaglowski, S., Flynn, J., Jones, J., Blum, K.A., Buggy, J.J., Hamdy, A., Johnson, A.J., and Byrd, J.C. (2011). Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* *117*, 6287-6296.
- Hoogeboom, R., van Kessel, K.P., Hochstenbach, F., Wormhoudt, T.A., Reinten, R.J., Wagner, K., Kater, A.P., Guikema, J.E., Bende, R.J., and van Noesel, C.J. (2013). A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J Exp Med* *210*, 59-70.
- Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* *4*, 44-57.
- Ideker, T., Dutkowsky, J., and Hood, L. (2011). Boosting signal-to-noise in complex biology: prior knowledge is power. *Cell* *144*, 860-863.
- Jayapal, K.P., Philp, R.J., Kok, Y.J., Yap, M.G., Sherman, D.H., Griffin, T.J., and Hu, W.S. (2008). Uncovering genes with divergent mRNA-protein dynamics in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* *3*, e2097.
- Jung, N., Bertrand, F., Bahram, S., Vallat, L., and Maumy-Bertrand, M. (2014). Cascade: a R package to study, predict and simulate the diffusion of a signal through a temporal gene network. *Bioinformatics* *30*, 571-573.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* *14*, R36.
- Koksal, A.S., Beck, K., Cronin, D.R., McKenna, A., Camp, N.D., Srivastava, S., MacGilvray, M.E., Bodik, R., Wolf-Yadlin, A., Fraenkel, E., Fisher, J., and Gitter, A. (2018). Synthesizing Signaling Pathways from Temporal Phosphoproteomic Data. *Cell Rep* *24*, 3607-3618.
- Kumar, L., and M, E.F. (2007). Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics* *2*, 5-7.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* *9*, 357-359.
- Law, C.W., Chen, Y., Shi, W., and Smyth, G.K. (2014). voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* *15*, R29.
- Letestu, R., Rawstron, A., Ghia, P., Villamor, N., Boeckx, N., Boettcher, S., Buhl, A.M., Duerig, J., Ibbotson, R., Kroeber, A., Langerak, A., Le Garff-Tavernier, M., Mockridge, I., Morilla, A., Padmore, R., Rassenti, L., Ritgen, M., Shehata, M., Smolewski, P., Staib, P., Ticchioni, M., Walker, C., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (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.
- Liu, Z.P., Wu, C., Miao, H., and Wu, H. (2015). RegNetwork: an integrated database of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks in human and mouse. *Database (Oxford)* *2015*.
- Martin, M., Hua, L., Wang, B., Wei, H., Prabhu, L., Hartley, A.V., Jiang, G., Liu, Y., and Lu, T. (2017). Novel Serine 176 Phosphorylation of YBX1 Activates NF-kappaB in Colon Cancer. *J Biol Chem* *292*, 3433-3444.
- McCarthy, D.J., Chen, Y., and Smyth, G.K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* *40*, 4288-4297.

- Meinshausen, N., and Bühlmann, P. (2010). Stability selection. *Journal of the Royal Statistical Society: series B (Statistical methodology)* *72*, 417-473.
- Meinshausen, N., and Bühlmann, P. (2010). Stability selection. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* *72*, 417-473.
- Messmer, B.T., Albesiano, E., Efremov, D.G., Ghiotto, F., Allen, S.L., Kolitz, J., Foa, R., Damle, R.N., Fais, F., Messmer, D., Rai, K.R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2004). Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* *200*, 519-525.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. (2012). *Janeway's immunobiology*, 8th edn (New York: Garland Science).
- Nightingale, A., Antunes, R., Alpi, E., Bursteinas, B., Gonzales, L., Liu, W., Luo, J., Qi, G., Turner, E., and Martin, M. (2017). The Proteins API: accessing key integrated protein and genome information. *Nucleic Acids Res* *45*, W539-W544.
- Niiri, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* *2*, 945-956.
- 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.
- Pede, V., Rombout, A., Vermeire, J., Naessens, E., Mestdagh, P., Robberecht, N., Vanderstraeten, H., Van Roy, N., Vandesompele, J., Speleman, F., Philippe, J., and Verhasselt, B. (2013). CLL cells respond to B-Cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression. *PLoS One* *8*, e60275.
- Perrot, A., Pionneau, C., Nadaud, S., Davi, F., Leblond, V., Jacob, F., Merle-Beral, H., Herbrecht, R., Bene, M.C., Gribben, J.G., Bahram, S., and Vallat, L. (2011). A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *118*, e1-15.
- 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., Kay, N.E., Greaves, A., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2004). ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* *351*, 893-901.
- Rau, A., Gallopin, M., Celeux, G., and Jaffrezic, F. (2013). Data-based filtering for replicated high-throughput transcriptome sequencing experiments. *Bioinformatics* *29*, 2146-2152.
- Rau, A., Maugis-Rabusseau, C., Martin-Magniette, M.L., and Celeux, G. (2015). Co-expression analysis of high-throughput transcriptome sequencing data with Poisson mixture models. *Bioinformatics* *31*, 1420-1427.
- Robinson, M.D., and Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* *11*, R25.
- Rodriguez, A., Villuendas, R., Yanez, L., Gomez, M.E., Diaz, R., Pollan, M., Hernandez, N., de la Cueva, P., Marin, M.C., Swat, A., Ruiz, E., Cuadrado, M.A., Conde, E., Lombardia, L., Cifuentes, F., Gonzalez, M., Garcia-Marco, J.A., Piris, M.A., and Spanish National Cancer, C. (2007). Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia* *21*, 1984-1991.
- Schleiss, C., Ilias, W., Tahar, O., Guler, Y., Miguet, L., Mayeur-Rousse, C., Mauvieux, L., Fornecker, L.M., Toussaint, E., Herbrecht, R., Bertrand, F., Maumy-Bertrand, M.,

- Martin, T., Fournel, S., Georgel, P., Bahram, S., and Vallat, L. (2019). BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation ex vivo. *Sci Rep* 9, 701.
- Schmid, C., and Isaacson, P.G. (1994). Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology* 24, 445-451.
- Schwanhaussner, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337-342.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13, 2498-2504.
- Sill, M., Hielscher, T., Becker, N., and Zucknick, M. (2014). Extended Inference with Lasso and Elastic-Net Regularized Cox and Generalized Linear Models. *Journal of Statistical Software* 62, 1-22.
- Staudt, L.M. (2010). Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000109.
- Stevenson, F.K., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103, 4389-4395.
- Vallat, L., Kemper, C.A., Jung, N., Maumy-Bertrand, M., Bertrand, F., Meyer, N., Pocheville, A., Fisher, J.W., 3rd, Gribben, J.G., and Bahram, S. (2013). Reverse-engineering the genetic circuitry of a cancer cell with predicted intervention in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 459-464.
- Vallat, L.D., Park, Y., Li, C., and Gribben, J.G. (2007). Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood* 109, 3989-3997.
- Van Buuren, S., and Groothuis-Oudshoorn, K. (2011). mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *Journal of Statistical Software* 45, 1-67.
- Waldbauer, J.R., Rodrigue, S., Coleman, M.L., and Chisholm, S.W. (2012). Transcriptome and proteome dynamics of a light-dark synchronized bacterial cell cycle. *PLoS One* 7, e43432.
- Waters, K.M., Liu, T., Quesenberry, R.D., Willse, A.R., Bandyopadhyay, S., Kathmann, L.E., Weber, T.J., Smith, R.D., Wiley, H.S., and Thrall, B.D. (2012). Network analysis of epidermal growth factor signaling using integrated genomic, proteomic and phosphorylation data. *PLoS One* 7, e34515.
- Yeomans, A., Thirdborough, S.M., Valle-Argos, B., Linley, A., Krysov, S., Hidalgo, M.S., Leonard, E., Ishfaq, M., Wagner, S.D., Willis, A.E., Steele, A.J., Stevenson, F.K., Forconi, F., Coldwell, M.J., and Packham, G. (2016). Engagement of the B-cell receptor of chronic lymphocytic leukemia cells drives global and MYC-specific mRNA translation. *Blood* 127, 449-457.
- Yosef, N., and Regev, A. (2011). Impulse control: temporal dynamics in gene transcription. *Cell* 144, 886-896.
- Yoshida, T., Higuchi, T., Hagiyaama, H., Strasser, A., Nishioka, K., and Tsubata, T. (2000). Rapid B cell apoptosis induced by antigen receptor ligation does not require Fas (CD95/APO-1), the adaptor protein FADD/MORT1 or CrmA-sensitive caspases but is defective in both MRL-+/+ and MRL-lpr/lpr mice. *International immunology* 12, 517-526.

Zenz, T., Mertens, D., Kupperts, R., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer* 10, 37-50.

Figure 1- Unsupervised statistical analysis of genes expression.

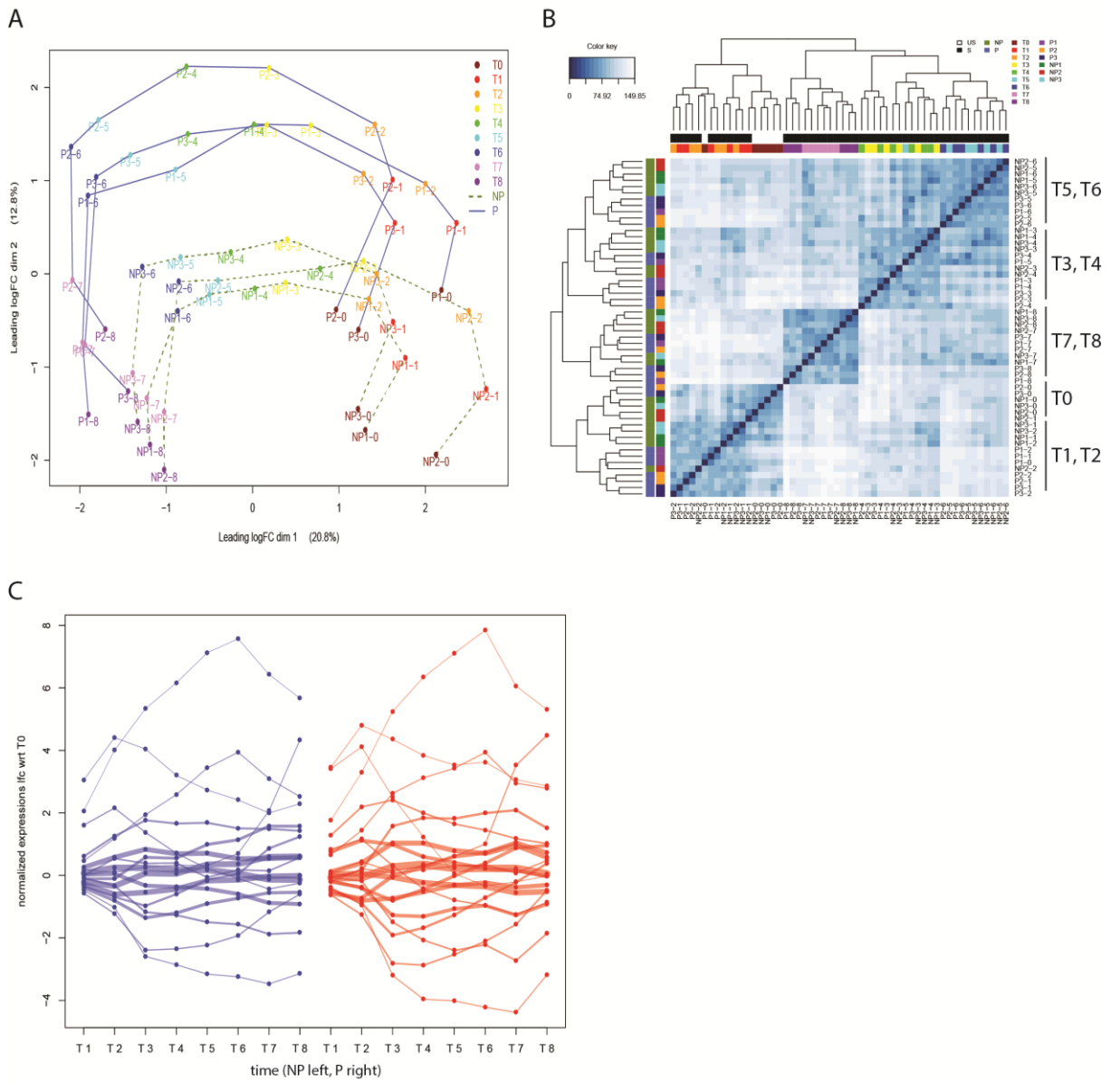


Figure 2- Unsupervised statistical analysis of proteins expression.

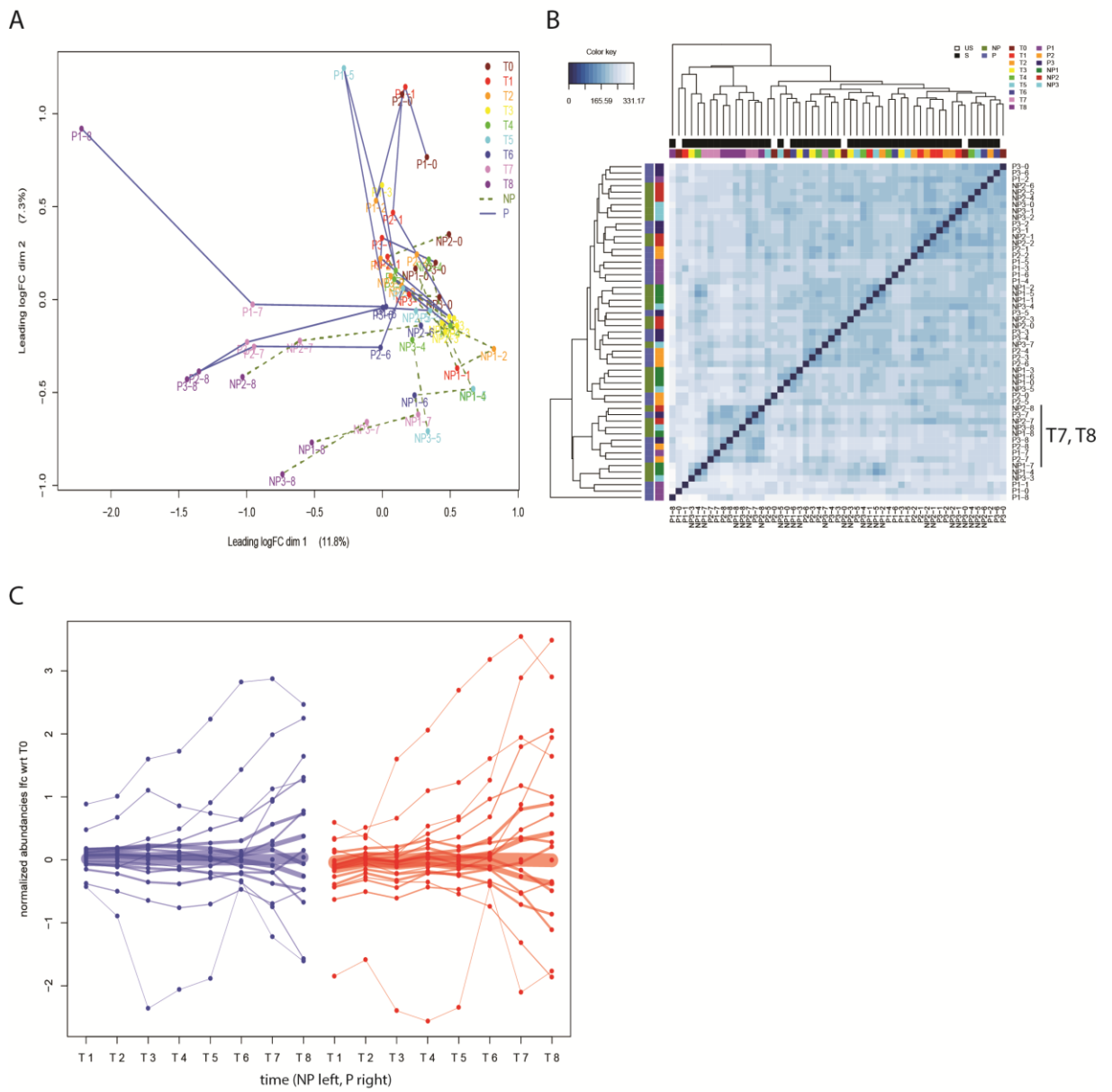


Figure 3- Supervised statistical analysis of genes and proteins temporal expression.

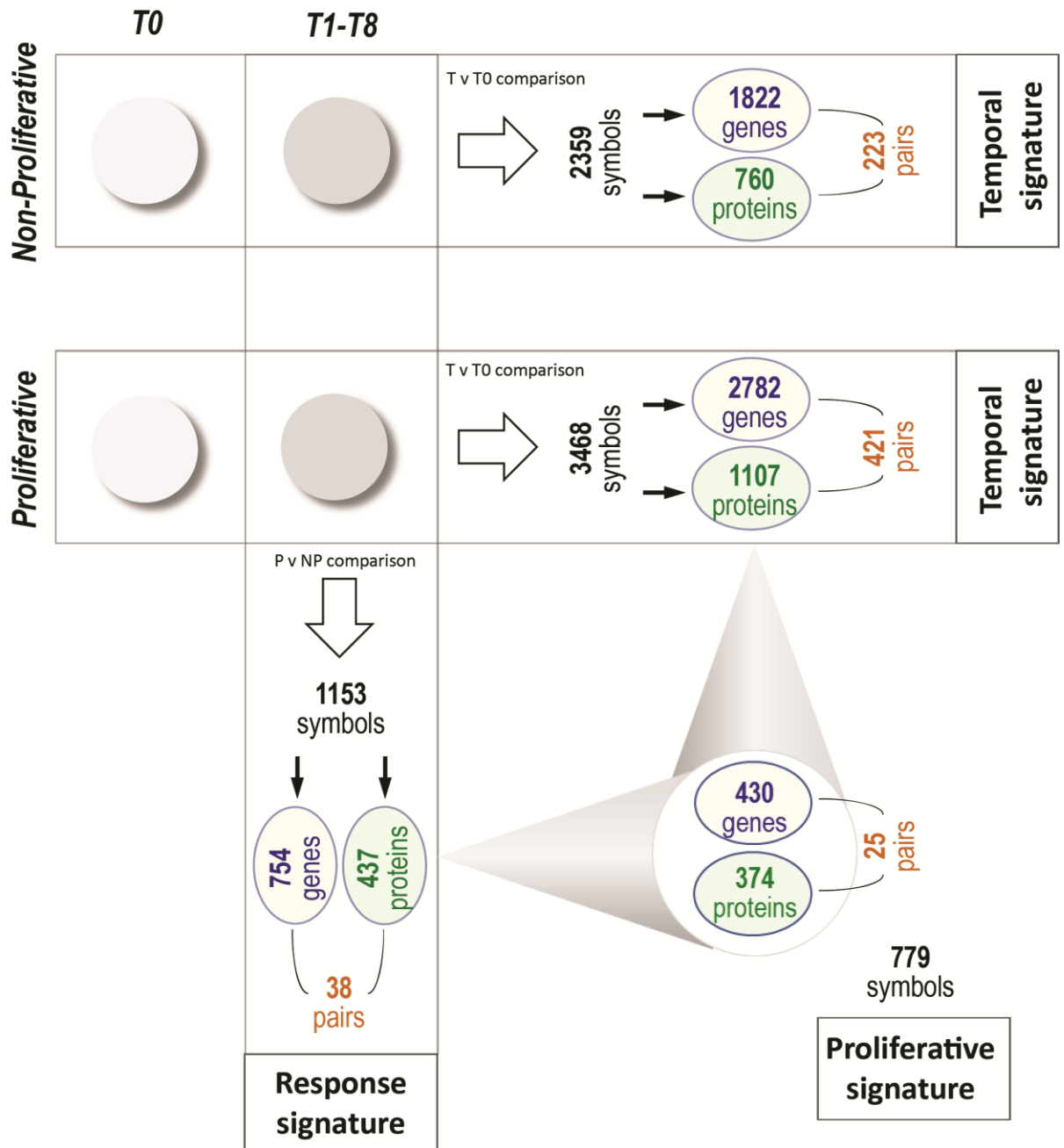
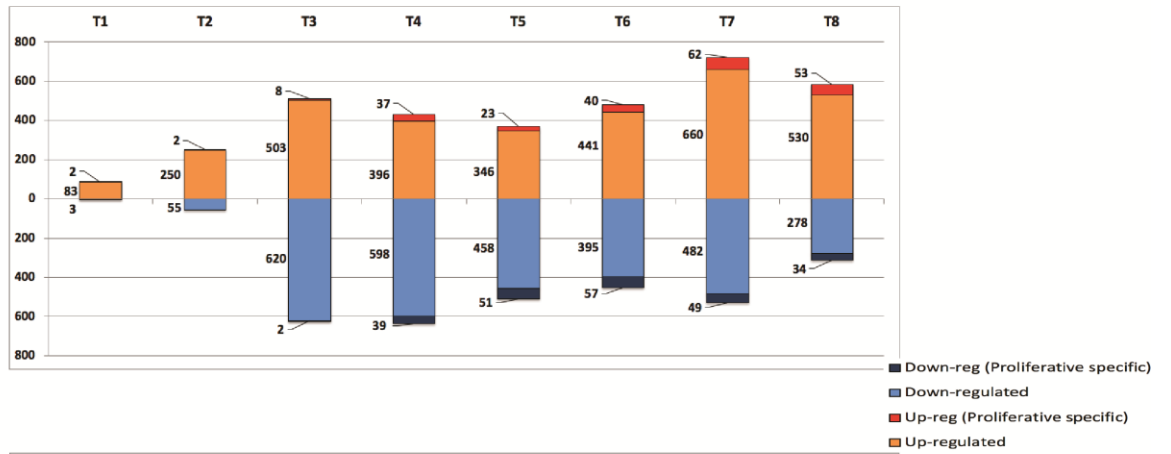
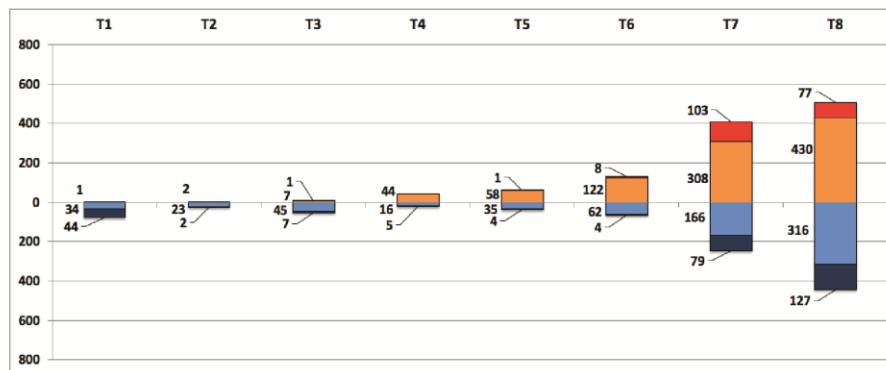


Figure 4: Supervised statistical analysis of genes and proteins temporal expression in proliferating CLL cells.

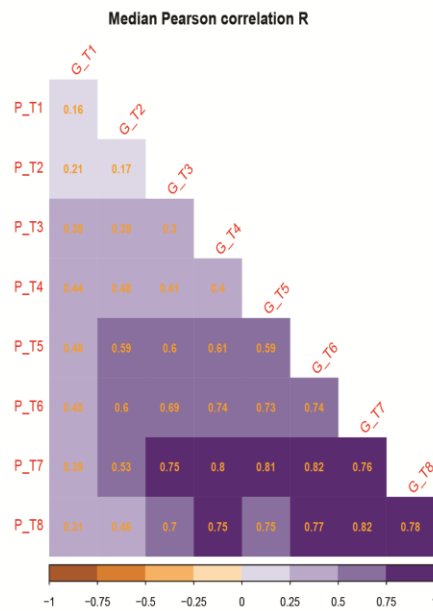
A



B



C



D

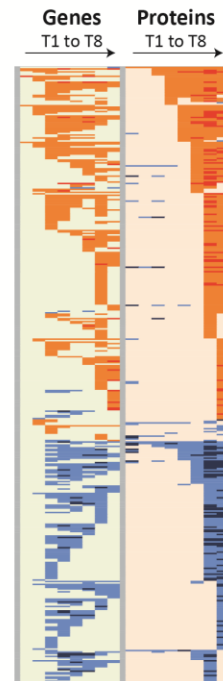


Figure 5: Temporal representation of biological functions (BP) of up- or down-regulated proteins in proliferating CLL cells.

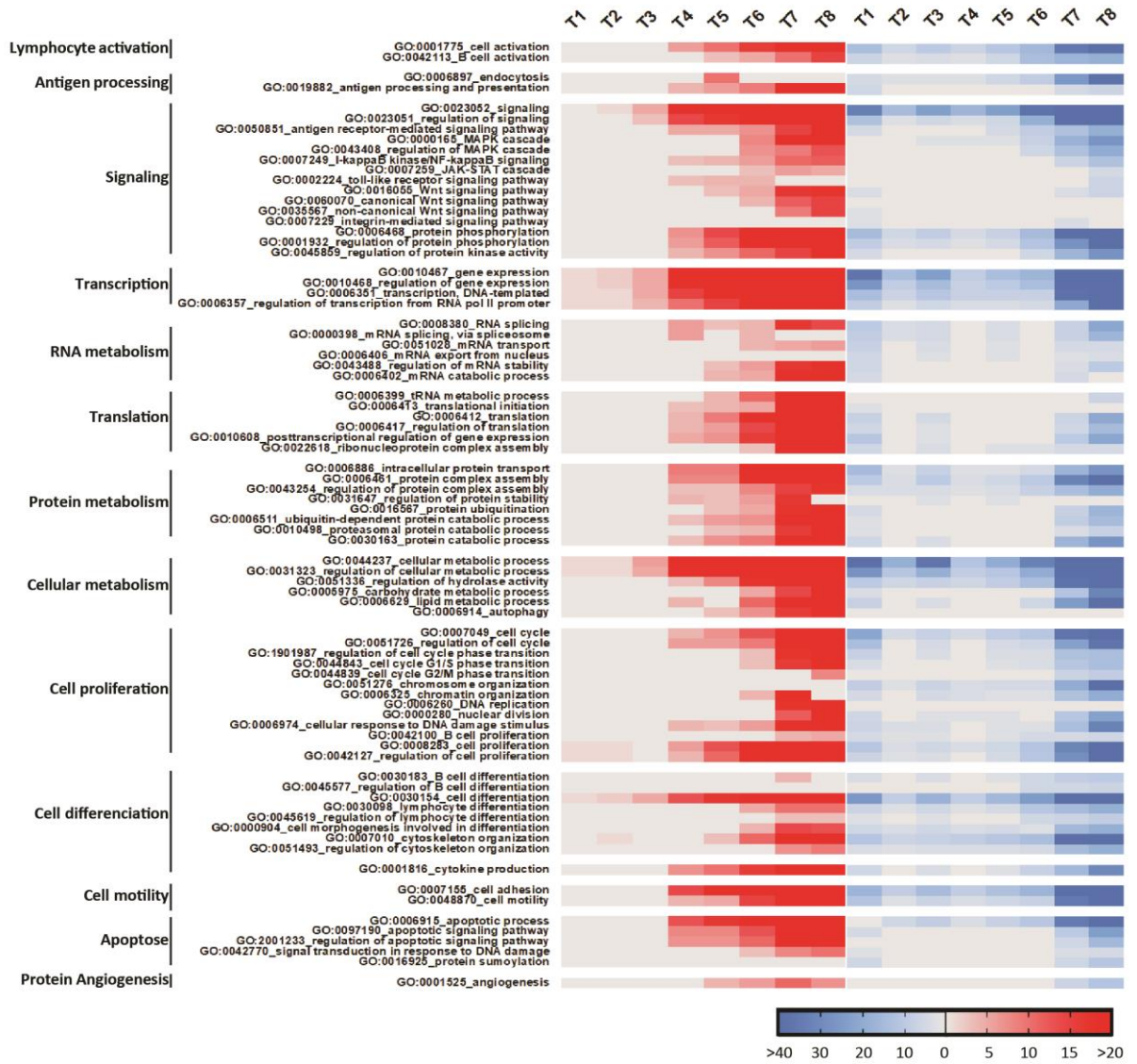


Figure 6: Temporal signal propagation in the response network induced after BCR stimulation in proliferating cells.

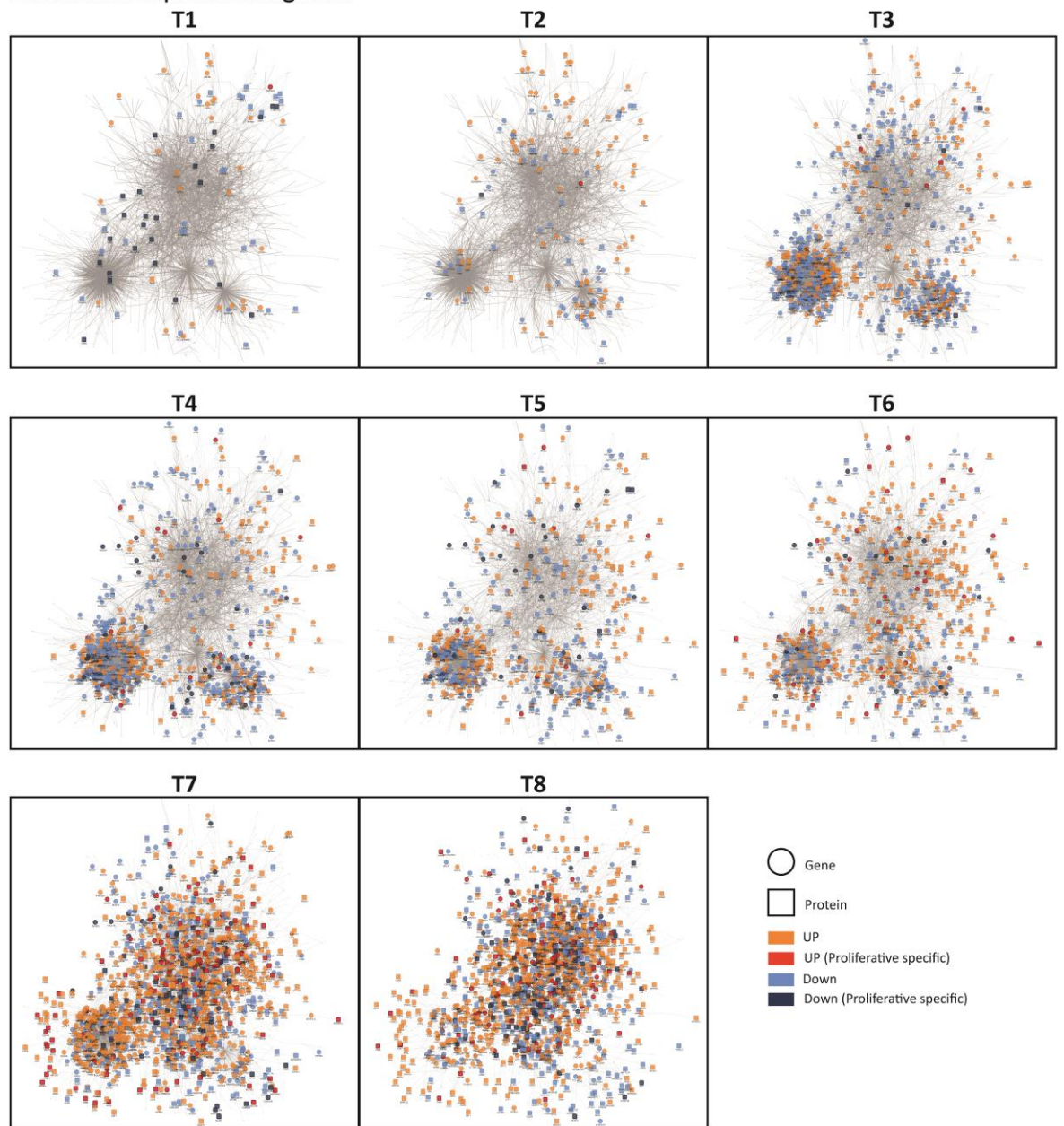


Figure 7: Temporal proliferative program induced after BCR stimulation in proliferating cells.

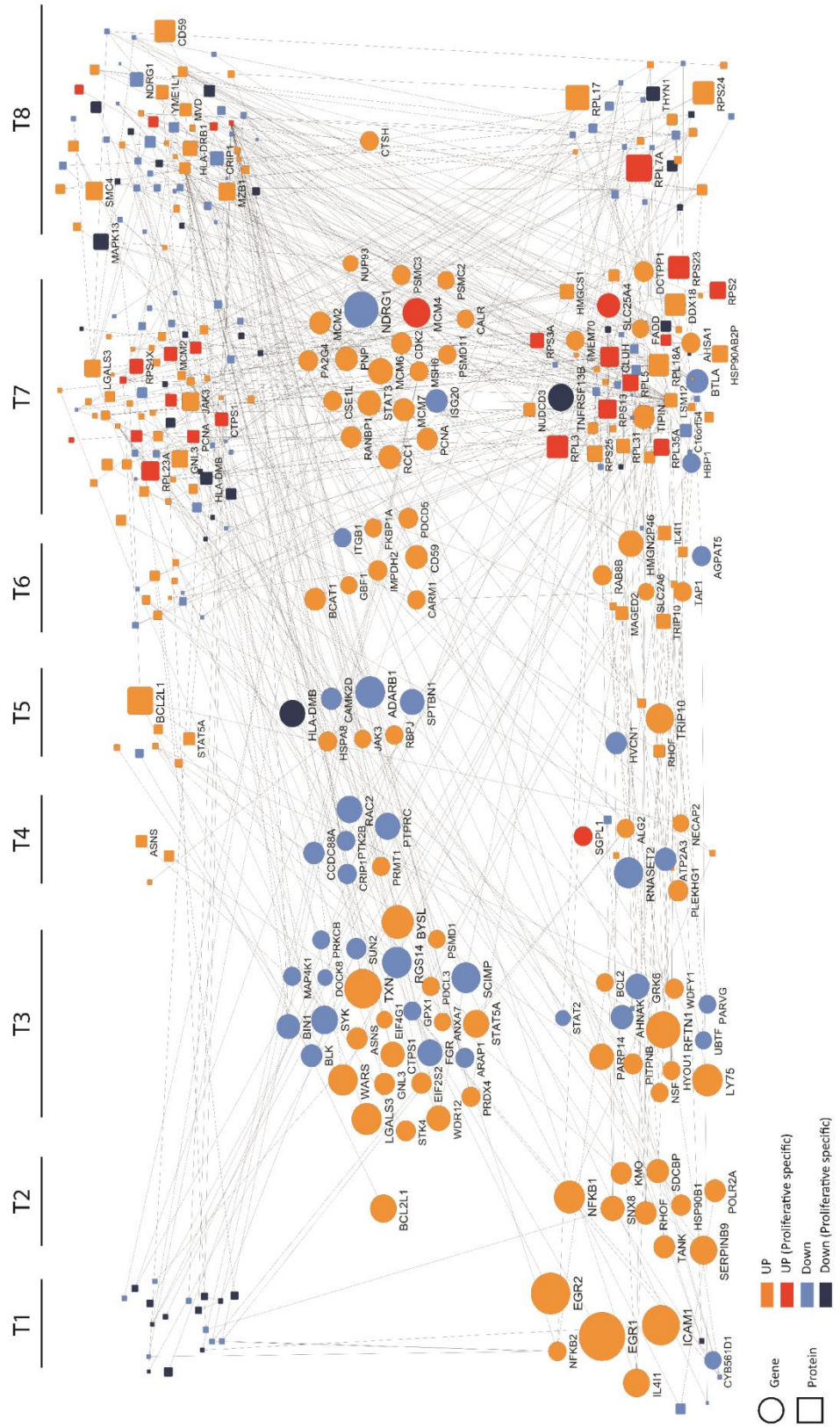


Fig.S1- CLL cells functional responses measured at day 6 after B-cell receptor activation

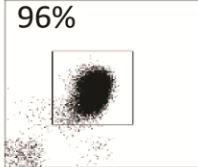
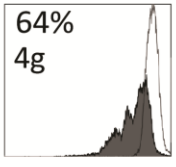
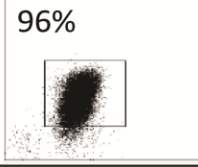
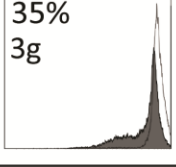
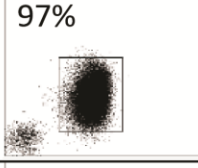
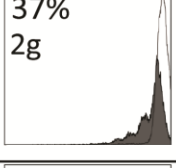
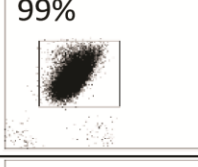
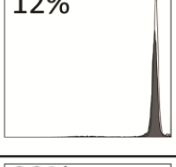
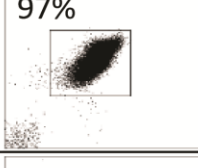
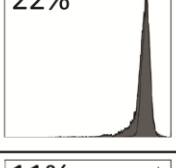
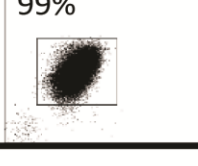
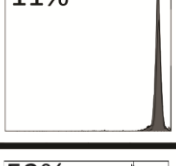
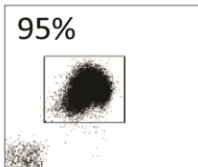
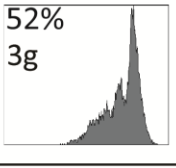
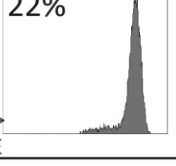
	patient code	CD5 CD19 staining	CFSE Day 6
Proliferating samples	CLL-P1	96% 	64% 4g 
	CLL-P2	96% 	35% 3g 
	CLL-P3	97% 	37% 2g 
Non Proliferating samples	CLL-NP1	99% 	12% 
	CLL-NP2	97% 	22% 
	CLL-NP3	99% 	11% 
Proliferating and Non Proliferating patient	CLL-P4	95%  CD5 CD19	52% 3g 
	CLL-NP4		22%  Count CFSE

Fig.S2- Experimental map

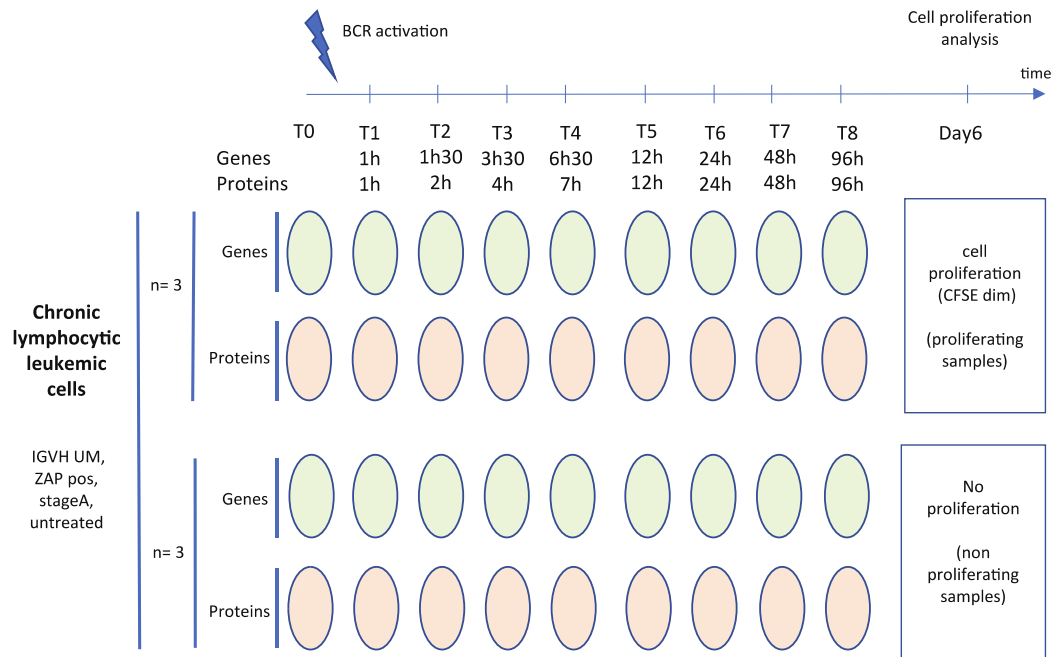


Fig.S3- Methods outline

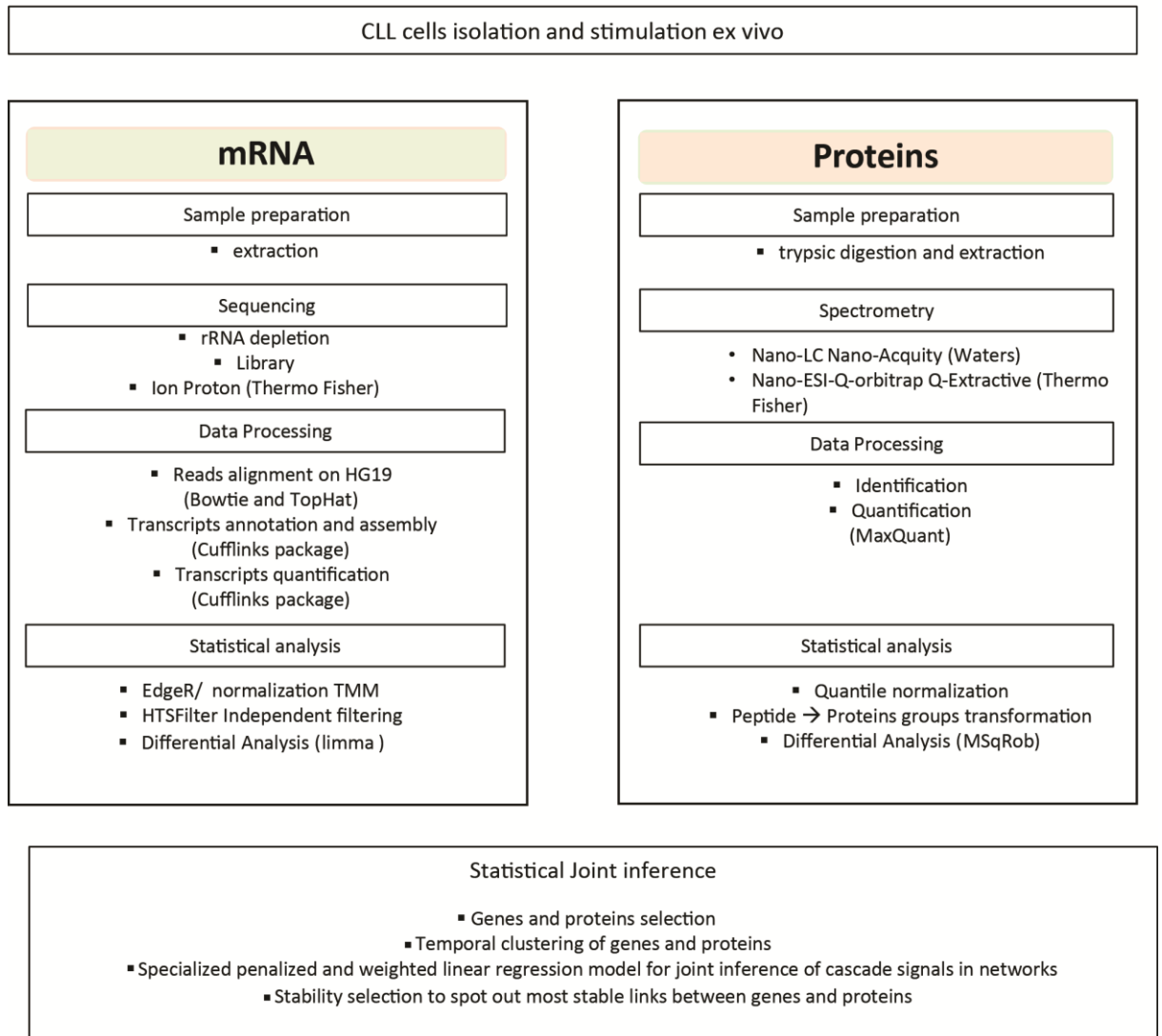
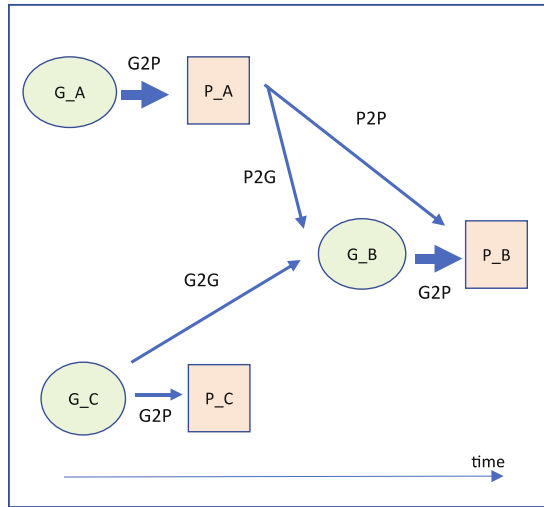


Fig.S4 - model

A



B

F matrix for a G2P action

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	p_{ij}^F	0	0	0	0	0	0	0
2	q_{ij}^F	r_{ij}^F	0	0	0	0	0	0
3	0	0	r_{ij}^F	0	0	0	0	0
4	0	0	0	r_{ij}^F	0	0	0	0
5	0	0	0	0	r_{ij}^F	0	0	0
6	0	0	0	0	0	r_{ij}^F	0	0
7	0	0	0	0	0	0	r_{ij}^F	0
8	0	0	0	0	0	0	0	r_{ij}^F

F matrix for a G2G, P2G, P2P action

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	a_{ij}^F	0	0	0	0	0	0	0
3	b_{ij}^F	a_{ij}^F	0	0	0	0	0	0
4	c_{ij}^F	b_{ij}^F	a_{ij}^F	0	0	0	0	0
5	d_{ij}^F	c_{ij}^F	b_{ij}^F	a_{ij}^F	0	0	0	0
6	0	e_{ij}^F	f_{ij}^F	i_{ij}^F	k_{ij}^F	0	0	0
7	0	0	0	j_{ij}^F	l_{ij}^F	m_{ij}^F	0	0
8	0	0	0	0	0	n_{ij}^F	o_{ij}^F	0

Fig.S5 – model validation

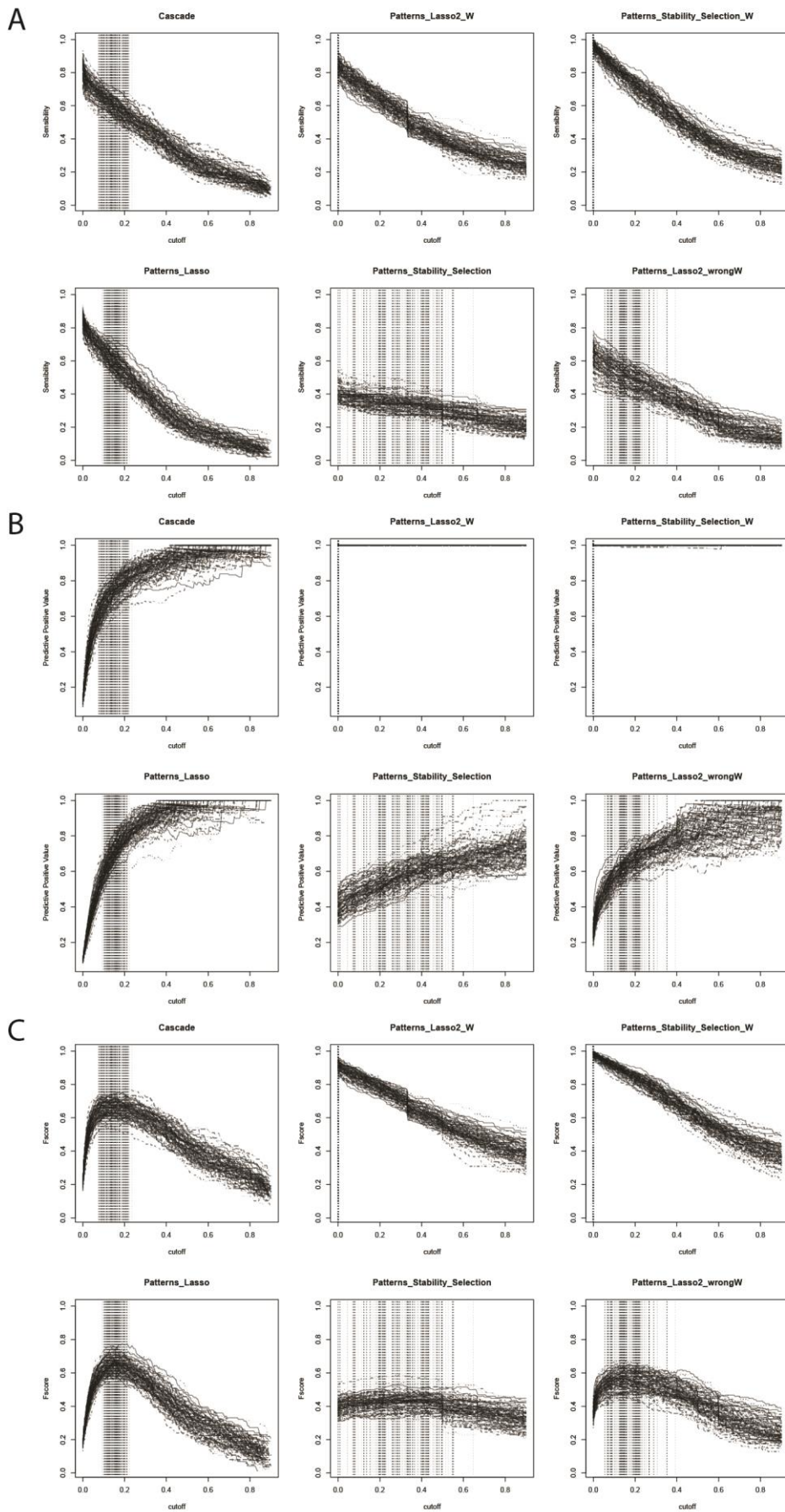
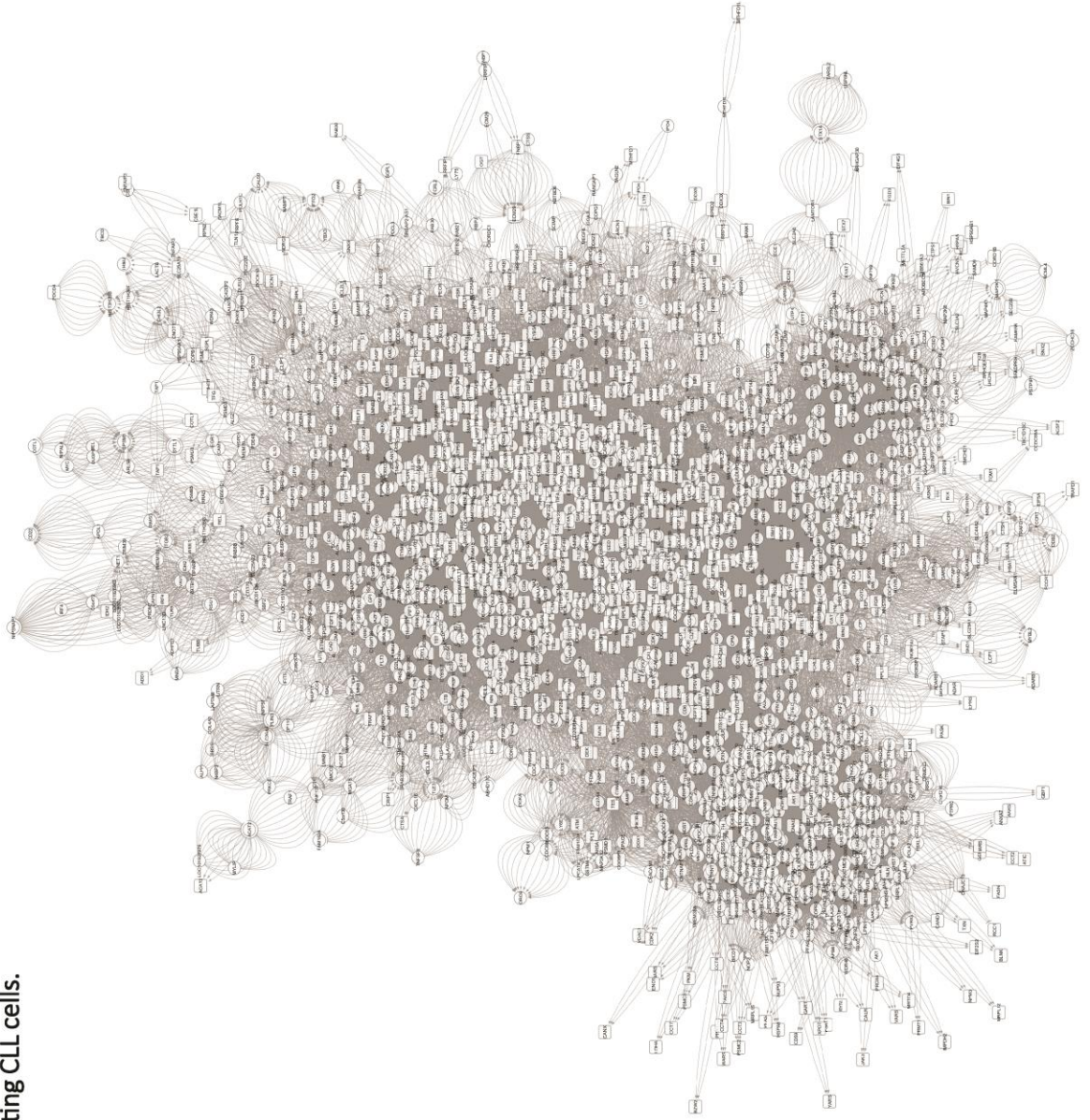


Figure S6: Global modelization of genes and proteins temporal interactions after BCR stimulation in proliferating CLL cells.



Conclusions – Discussion

Ce travail de thèse s'intègre dans un objectif général visant à étudier un programme génique tumoral afin de le caractériser pour, ultérieurement, espérer le moduler afin qu'il ressemble autant que possible à celui d'une cellule saine.

Pour remplir cet objectif, j'ai travaillé sur des LB issus de patients porteurs de LLC (LB-LLC). Ces cellules ne prolifèrent pas *ex vivo* sans stimulation et entrent même en apoptose. Il n'y a aujourd'hui aucun modèle consensus permettant d'induire leur prolifération et, de plus, différents protocoles requièrent l'utilisation d'autres types cellulaires en co-culture, rendant l'identification précise des facteurs nécessaires à la prolifération des LB-LLC impossible à réaliser.

L'engagement du BCR est essentiel dans la pathogénèse de la LLC mais la stimulation isolée de ce récepteur n'entraîne pas de prolifération *ex vivo*, et au contraire, induit une apoptose ([Vallat et al., 2007](#); [Yoshida et al., 2000](#)). Ceci suggère la nécessité de co-stimulations supplémentaires pour aboutir à la prolifération.

La première partie de ma thèse a donc été consacrée à la mise en place d'un modèle de stimulation activant le BCR et induisant une prolifération *ex vivo* de LB-LLC primaires. Plusieurs cytokines suggérées par la littérature ont été testées dans le but de trouver les facteurs nécessaires et suffisants pour induire une prolifération vigoureuse des LB-LLC. Les conditions de stimulation que nous avons retenues associent une activation du BCR (anti-IgM) avec l'utilisation de CD40L (CD154) soluble, d'IL-4 et d'IL-21. Le CD40L est une molécule exprimée à la surface des LT et permet l'activation des voies de signalisation NF- κ B et Ras/MAPK (ERK) des LB, favorisant leur prolifération et leur différenciation ([Graham et al., 2010](#)). L'IL-4 est sécrétée par les LTFH et active la voie Jak/STAT6 dans les LB. Cette voie contribue à leur survie ([Aguilar-Hernandez et al., 2016](#)). L'IL-21, connue pour entraîner l'apoptose lorsqu'elle est utilisée de façon isolée sur les LB-LLC, est ajoutée 24 heures après la stimulation anti-IgM+CD40L+IL-4 afin de permettre la surexpression de son récepteur IL-21R ([de Toter et al., 2006](#)). Dans ces conditions, l'IL-21 permet d'induire une prolifération *via* la voie Jak/STAT1, 3 et 5 ([Ahearne et al., 2013](#)). Bien que ces divers facteurs soient souvent mentionnés dans la littérature pour activer le LB, le modèle mis en place lors de ma thèse induit une prolifération avec une stimulation utilisant peu d'agents de co-stimulation. Il présente aussi l'avantage de ne pas utiliser d'autres types cellulaires en co-culture comme des cellules stromales, des fibroblastes ([Asslaber et al., 2013](#); [Hamilton et al., 2012](#)) ou encore des LT ([Pascutti et al., 2013](#)) qui sécrètent un grand nombre de molécules comme l'IL-6, l'IL-10 ou encore le TGF- β ([Lagneaux et al., 1998](#)). En somme, le modèle que j'ai mis en place au cours de ma thèse ([Schleiss et al., 2019](#)) induit la prolifération de 1/3 des cellules de LLC après 6 jours de culture, avec un avantage prolifératif pour les LB-LLC exprimant la protéine ZAP-70. La présence indispensable des cytokines produites par les LT pour induire une prolifération soutenue confirme le rôle essentiel de ces cellules dans le développement de la LLC. Cette hypothèse est renforcée par la nécessité d'associer des LT CD4+ pour favoriser la prolifération de LB-LLC xéno-greffé chez la souris ([Bagnara et al., 2011](#)). Par

ailleurs, j'ai également montré que ce protocole de stimulation réalisé dans un milieu semi-solide permet d'induire la prolifération de près de 90% des LB-LLC indépendamment de leurs caractéristiques biologiques, ce qui en fait un modèle très efficace. Ce milieu semi-solide pourrait mimer le micro-environnement que les LB rencontrent dans les centres germinatifs *in vivo*, expliquant cette forte réponse.

L'étude des voies de signalisation directement activées dans nos conditions de stimulation, au sein du sous-groupe de patients présentant une forme agressive de LLC (IGVH UM ; ZAP-70 positif), suggère un niveau de phosphorylation de ZAP70/Syk supérieur dès l'état basal dans les cellules répondant par une prolifération. De plus, nous observons une augmentation de la phosphorylation de la protéine STAT6, ce qui suggère un rôle essentiel de la voie IL-4 / IL-4R dans la prolifération des LB-LLC, STAT6 étant en effet un acteur clé dans la transduction du signal en aval de ce récepteur. Ces analyses, si elles demandent cependant à être confirmées sur une cohorte plus importante, confirme cependant la nécessité d'évaluer le rôle des inhibiteurs de cette voie comme agents thérapeutiques d'intérêt dans la LLC.

Ce modèle de stimulation m'a également permis d'étudier les mécanismes d'expression de la protéine *MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A* (MICA) ainsi que son rôle éventuel dans la leucémogénèse (Illias *et al.*, en soumission ; manuscrit en annexe). Cette protéine appartient à la famille des ligands du récepteur *Natural-killer receptor group 2 member D* (NKG2D), un acteur important dans l'immunité anti-tumorale. Dans un premier temps, j'ai montré l'absence d'expression de MICA dans les LB-LLC. Ensuite, dans le modèle de stimulation *ex vivo* que j'ai mis en place, j'ai pu montrer l'induction de l'expression du gène *MICA*, ce qui se traduit par l'expression de la protéine correspondante à la surface des LB-LLC, mais aussi sous forme sécrétée. De plus, mes données révèlent l'existence d'une corrélation entre l'intensité de prolifération des LB-LLC stimulés et le niveau d'expression de MICA dans ces cellules. Ce résultat indique que les LB-LLC conservent la capacité d'expression de MICA, suggérant un rôle éventuel de cette protéine dans l'immunité anti-leucémique. De plus, l'expression de MICA dans les LB-LLC semble antérieure à l'apparition de lésions de l'ADN. En effet, la phosphorylation de l'histone H2Ax, qui est un marqueur spécifique des dommages à l'ADN, est détectée postérieurement à MICA. Par conséquent l'expression de MICA est, dans notre modèle, probablement induite par l'initiation de la prolifération et non par l'induction des dommages à l'ADN, comme cela a déjà été mentionné ([Gasser et al., 2005](#)). Ces travaux semblent donc indiquer l'existence d'une immunité anti-tumorale médiée par l'interaction MICA-NKG2D lors des stades précoces de la leucémogénèse (lorsque les LB sont en phase proliférative et expriment probablement MICA). La possibilité d'induire à nouveau l'expression de MICA dans les LB-LLC aux stades tardifs représente donc une nouvelle hypothèse thérapeutique.

Enfin, notre modèle de stimulation *ex vivo*, induisant la prolifération des LB-LLC, nous a permis de réaliser une étude transcriptionnelle et protéomique dynamique, et ce jusqu'à 4 jours après la stimulation. Toutes les études antérieures sur la réponse transcriptionnelle de la LLC présentées dans la littérature ont été réalisées après une stimulation isolée du BCR (anti-IgM soluble ou immobilisé) ([Guarini et al., 2008](#); [Herishanu et al., 2011](#); [Pede et al., 2013](#)), connue pour induire une apoptose des lymphocytes ([Yoshida et al., 2000](#)) et ces conditions de culture ne permettaient pas d'étudier la réponse proliférative de ces cellules. Notre modèle de stimulation pulsée a permis d'étudier le programme transcriptionnel et protéomique en écartant les phénomènes cycliques ([Ideker et al., 2011](#)) décrits dans des modèles de co-culture. Afin de mettre en évidence le plus grand nombre de gènes et de protéines impliqués dans la réponse du BCR, nous avons analysé 8 points temporels allant jusqu'à 4 jours après la stimulation. Grâce à une collaboration avec une équipe de mathématiciens, nous avons sélectionné les acteurs du réseau de régulation génique et protéiques et modélisé ce programme cellulaire tumoral. Ce travail a permis, à partir de l'identification des protéines impliquées dans la prolifération et exprimée aux temps tardifs, de revenir aux facteurs de transcription initiaux exprimés rapidement après la stimulation cellulaire, et a suggéré l'existence d'un programme de prolifération de base dans ces cellules en prolifération.

Malgré l'apparition, ces dernières années, des techniques de séquençage haut-débit, les études de cellules humaines permettant des analyses temporelles faites simultanément au niveau transcriptomique et protéomique aussi vastes que celle que nous avons réalisée sont assez rares. On retrouve dans la littérature seulement trois études permettant de révéler une corrélation gène/protéines (40 à 60%) après stimulation cellulaire ([Fournier et al., 2010](#); [Jayapal et al., 2008](#); [Waldbauer et al., 2012](#)) Avant notre étude portant sur des cellules CLL primaires, la corrélation entre les gènes et les protéines correspondantes dans les cellules cancéreuses humaines primaires n'avait pas été étudiée. L'ensemble de mon travail de thèse permet, aujourd'hui, de proposer un modèle induisant la prolifération des LB-LLC. Ce modèle a l'avantage d'utiliser un nombre minimal de stimuli. La modélisation du programme d'expression des transcrits et des protéines soutenant la prolifération des cellules LLC est une étape importante dans la compréhension de la leucémogénèse de ces cellules. Mon travail a également dévoilé de nouvelles voies cellulaires qui pourraient servir de cibles pour le développement de thérapies innovantes.

A l'avenir, on pourra envisager une modulation orientée des programmes géniques induits dans les cellules tumorales afin de réduire le phénotype agressif de ces cellules qui pourraient ainsi retrouver un programme génique sain. Pour cela, la « signature proliférative », mise en évidence dans notre modèle, induite par la stimulation du BCR et composée de facteurs de transcription menant à l'expression de protéines impliquées dans la prolifération, fournit un certain nombre de cibles potentielles et permet d'identifier des voies cellulaires qui pourraient être ciblées pour le développement de thérapies innovantes de la LLC.

Bibliographie

- Aalto, Y., El-Rifa, W., Vilpo, L., Ollila, J., Nagy, B., Vihinen, M., Vilpo, J., and Knuutila, S. (2001). Distinct gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia with 11q23 deletion. *Leukemia* *15*, 1721-1728.
- Advani, R.H., Buggy, J.J., Sharman, J.P., Smith, S.M., Boyd, T.E., Grant, B., Kolibaba, K.S., Furman, R.R., Rodriguez, S., Chang, B.Y., *et al.* (2013). Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* *31*, 88-94.
- Aguilar-Hernandez, M.M., Blunt, M.D., Dobson, R., Yeomans, A., Thirdborough, S., Larrayoz, M., Smith, L.D., Linley, A., Strefford, J.C., Davies, A., *et al.* (2016). IL-4 enhances expression and function of surface IgM in CLL cells. *Blood* *127*, 3015-3025.
- Ahearn, M.J., Willimott, S., Pinon, L., Kennedy, D.B., Miall, F., Dyer, M.J., and Wagner, S.D. (2013). Enhancement of CD154/IL4 proliferation by the T follicular helper (Tfh) cytokine, IL21 and increased numbers of circulating cells resembling Tfh cells in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* *162*, 360-370.
- Aiba, Y., Kameyama, M., Yamazaki, T., Tedder, T.F., and Kurosaki, T. (2008). Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. *Blood* *111*, 1497-1503.
- Allen, C.D., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* *27*, 190-202.
- Ameyar, M., Wisniewska, M., and Weitzman, J.B. (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* *85*, 747-752.
- Anderson, M.A., Deng, J., Seymour, J.F., Tam, C., Kim, S.Y., Fein, J., Yu, L., Brown, J.R., Westerman, D., Si, E.G., *et al.* (2016). The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood* *127*, 3215-3224.
- Armitage, R.J., Macduff, B.M., Eisenman, J., Paxton, R., and Grabstein, K.H. (1995). IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol* *154*, 483-490.
- Asslaber, D., Grossinger, E.M., Girbl, T., Hofbauer, S.W., Egle, A., Weiss, L., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2013). Mimicking the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia - where does the journey go? *Br J Haematol* *160*, 711-714.
- Avery, D.T., Bryant, V.L., Ma, C.S., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2008a). IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *Journal of immunology* *181*, 1767-1779.
- Avery, D.T., Ma, C.S., Bryant, V.L., Santner-Nanan, B., Nanan, R., Wong, M., Fulcher, D.A., Cook, M.C., and Tangye, S.G. (2008b). STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells. *Blood* *112*, 1784-1793.
- Bagnara, D., Kaufman, M.S., Calissano, C., Marsilio, S., Patten, P.E., Simone, R., Chum, P., Yan, X.J., Allen, S.L., Kolitz, J.E., *et al.* (2011). A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood* *117*, 5463-5472.
- Banchereau, J., de Paoli, P., Valle, A., Garcia, E., and Rousset, F. (1991). Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science* *251*, 70-72.
- Bansal, M., Belcastro, V., Ambesi-Impiombato, A., and di Bernardo, D. (2007). How to infer gene networks from expression profiles. *Mol Syst Biol* *3*, 78.
- Bar-Joseph, Z., Gitter, A., and Simon, I. (2012). Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. *Nature reviews Genetics* *13*, 552-564.
- Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature reviews Immunology* *9*, 15-27.

- Bellosillo, B., Villamor, N., Colomer, D., Pons, G., Montserrat, E., and Gil, J. (1999). In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 2836-2843.
- Berglund, L.J., Avery, D.T., Ma, C.S., Moens, L., Deenick, E.K., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Wong, M., Adelstein, S., Arkwright, P.D., *et al.* (2013). IL-21 signalling via STAT3 primes human naive B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* *122*, 3940-3950.
- 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.
- Bernal, A., Pastore, R.D., Asgary, Z., Keller, S.A., Cesarman, E., Liou, H.C., and Schattner, E.J. (2001). Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* *98*, 3050-3057.
- Berndt, S.I., Camp, N.J., Skibola, C.F., Vijai, J., Wang, Z., Gu, J., Nieters, A., Kelly, R.S., Smedby, K.E., Monnereau, A., *et al.* (2016). Meta-analysis of genome-wide association studies discovers multiple loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun* *7*, 10933.
- Berry, R., Chen, Z., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2011). Insight into the basis of autonomous immunoreceptor activation. *Trends in immunology* *32*, 165-170.
- Bertolino, E., Reddy, K., Medina, K.L., Parganas, E., Ihle, J., and Singh, H. (2005). Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat Immunol* *6*, 836-843.
- Bhattacharya, N., Reichenzeller, M., Caudron-Herger, M., Haebe, S., Brady, N., Diener, S., Nothing, M., Dohner, H., Stilgenbauer, S., Rippe, K., *et al.* (2015). Loss of cooperativity of secreted CD40L and increased dose-response to IL4 on CLL cell viability correlates with enhanced activation of NF- κ B and STAT6. *Int J Cancer* *136*, 65-73.
- 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.
- Bikah, G., Lynd, F.M., Aruffo, A.A., Ledbetter, J.A., and Bondada, S. (1998). A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *International immunology* *10*, 1185-1196.
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguat, 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.
- Bjorck, P., Paulie, S., and Axelsson, B. (1992). Interleukin-4-mediated aggregation of anti-IgM-stimulated human B cells: inhibition of aggregation but enhancement of proliferation by antibodies to LFA-1. *Immunology* *75*, 122-128.
- Blanchard, D.A., Affredou, M.T., and Vazquez, A. (1997). Modulation of the p27kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor expression during IL-4-mediated human B cell activation. *J Immunol* *158*, 3054-3061.
- Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N., and Mantovani, A. (2003). The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* *102*, 956-963.
- Bray, D. (2003). Molecular networks: the top-down view. *Science* *301*, 1864-1865.
- Bresin, A., D'Abundo, L., Narducci, M.G., Fiorenza, M.T., Croce, C.M., Negrini, M., and Russo, G. (2016). TCL1 transgenic mouse model as a tool for the study of therapeutic targets and microenvironment in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cell Death Dis* *7*, e2071.
- Brown, J.R., Byrd, J.C., Coutre, S.E., Benson, D.M., Flinn, I.W., Wagner-Johnston, N.D., Spurgeon, S.E., Kahl, B.S., Bello, C., Webb, H.K., *et al.* (2014). Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *123*, 3390-3397.
- Buchner, M., Fuchs, S., Prinz, G., Pfeifer, D., Bartholome, K., Burger, M., Chevalier, N., Vallat, L., Timmer, J., Gribben, J.G., *et al.* (2009). Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* *69*, 5424-5432.
- Buggins, A.G., Pepper, C., Patten, P.E., Hewamana, S., Gohil, S., Moorhead, J., Folarin, N., Yallop, D., Thomas, N.S., Muftic, G.J., *et al.* (2010). Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF- κ B activation and de novo gene transcription. *Cancer Res* *70*, 7523-7533.

- Burger, J.A., Burger, M., and Kipps, T.J. (1999). Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* *94*, 3658-3667.
- Burger, J.A., and Chiorazzi, N. (2013). B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol* *34*, 592-601.
- Burger, J.A., Ghia, P., Rosenwald, A., and Caligaris-Cappio, F. (2009a). The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* *114*, 3367-3375.
- Burger, J.A., Quiroga, M.P., Hartmann, E., Burkle, A., Wierda, W.G., Keating, M.J., and Rosenwald, A. (2009b). High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* *113*, 3050-3058.
- Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M., and Kipps, T.J. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* *96*, 2655-2663.
- Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* *22*, 55-79.
- Byrd, J.C., O'Brien, S., and James, D.F. (2013). Ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* *369*, 1278-1279.
- Cahill, N., Bergh, A.C., Kanduri, M., Goransson-Kultima, H., Mansouri, L., Isaksson, A., Ryan, F., Smedby, K.E., Juliusson, G., Sundstrom, C., *et al.* (2013). 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia* *27*, 150-158.
- Caligaris-Cappio, F. (1996). B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood* *87*, 2615-2620.
- Caligaris-Cappio, F. (2003). Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* *123*, 380-388.
- Caligaris-Cappio, F., Gottardi, D., Alfarano, A., Stacchini, A., Gregoretti, M.G., Ghia, P., Bertero, M.T., Novarino, A., and Bergui, L. (1993). The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* *19*, 601-613.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15524-15529.
- Calissano, C., Damle, R.N., Marsilio, S., Yan, X.J., Yancopoulos, S., Hayes, G., Emson, C., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Sison, C., *et al.* (2011). Intracлонаl complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med* *17*, 1374-1382.
- Cambier, J.C., Pleiman, C.M., and Clark, M.R. (1994). Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol* *12*, 457-486.
- Casellas, R., Shih, T.A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M.C. (2001). Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* *291*, 1541-1544.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* *5*, 317-327.
- Catovsky, D., Richards, S., Matutes, E., Oscier, D., Dyer, M.J., Bezares, R.F., Pettitt, A.R., Hamblin, T., Milligan, D.W., Child, J.A., *et al.* (2007). Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* *370*, 230-239.
- Catz, S.D., and Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* *20*, 7342-7351.
- Chaouchi, N., Wallon, C., Goujard, C., Tertian, G., Rudent, A., Caput, D., Ferrera, P., Minty, A., Vazquez, A., and Delfraissy, J.F. (1996). Interleukin-13 inhibits interleukin-2-induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from in vitro apoptosis. *Blood* *87*, 1022-1029.

- Chatzouli, M., Ntoufa, S., Papakonstantinou, N., Chartomatsidou, E., Anagnostopoulos, A., Kollia, P., Ghia, P., Muzio, M., Stamatopoulos, K., and Belessi, C. (2014). Heterogeneous functional effects of concomitant B cell receptor and TLR stimulation in chronic lymphocytic leukemia with mutated versus unmutated Ig genes. *J Immunol* *192*, 4518-4524.
- Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nature reviews Immunology* *4*, 541-552.
- Chen, F.E., and Ghosh, G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* *18*, 6845-6852.
- 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, 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.
- Chiorazzi, N. (2007). Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best practice & research Clinical haematology* *20*, 399-413.
- Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2011). Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* *117*, 1781-1791.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* *352*, 804-815.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., *et al.* (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13944-13949.
- CollaborativeGroup, C.T. (1999). Chemotherapeutic Options in Chronic Lymphocytic Leukemia: a Meta-analysis of the Randomized Trials. *NCI: Journal of the National Cancer Institute* *91*, 861-868.
- Collins, R.J., Verschuer, L.A., Harmon, B.V., Prentice, R.L., Pope, J.H., and Kerr, J.F. (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* *71*, 343-350.
- Contri, A., Brunati, A.M., Trentin, L., Cabrelle, A., Miorin, M., Cesaro, L., Pinna, L.A., Zambello, R., Semenzato, G., and Donella-Deana, A. (2005). Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *The Journal of clinical investigation* *115*, 369-378.
- Coscia, M., Pantaleoni, F., Riganti, C., Vitale, C., Rigoni, M., Peola, S., Castella, B., Foglietta, M., Griggio, V., Drandi, D., *et al.* (2011). IGHV unmutated CLL B cells are more prone to spontaneous apoptosis and subject to environmental prosurvival signals than mutated CLL B cells. *Leukemia* *25*, 828-837.
- Crabtree, G.R., and Olson, E.N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* *109 Suppl*, S67-79.
- 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. *European journal of immunology* *36*, 558-569.
- Damdinsuren, B., Zhang, Y., Khalil, A., Wood, W.H., 3rd, Becker, K.G., Shlomchik, M.J., and Sen, R. (2010). Single round of antigen receptor signaling programs naive B cells to receive T cell help. *Immunity* *32*, 355-366.
- Damle, R.N., Batliwalla, F.M., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Sison, C., Allen, S.L., Kolitz, J., Vinciguerra, V.P., Kudalkar, P., *et al.* (2004). Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* *103*, 375-382.
- Damle, R.N., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Fais, F., Yan, X.J., Sison, C.P., Allen, S.L., Kolitz, J., Schulman, P., *et al.* (2002). B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* *99*, 4087-4093.
- 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.
- Damm, F., Mylonas, E., Cosson, A., Yoshida, K., Della Valle, V., Mouly, E., Diop, M., Scourzic, L., Shiraishi, Y., Chiba, K., *et al.* (2014). Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov* *4*, 1088-1101.

- Dancescu, M., Rubio-Trujillo, M., Biron, G., Bron, D., Delespesse, G., and Sarfati, M. (1992). Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* *176*, 1319-1326.
- de Jong, H. (2002). Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *J Comput Biol* *9*, 67-103.
- de Toter, D., Meazza, R., Capaia, M., Fabbi, M., Azzarone, B., Balleari, E., Gobbi, M., Cutrona, G., Ferrarini, M., and Ferrini, S. (2008). The opposite effects of IL-15 and IL-21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways. *Blood* *111*, 517-524.
- de Toter, D., Meazza, R., Zupo, S., Cutrona, G., Matis, S., Colombo, M., Balleari, E., Pierri, I., Fabbi, M., Capaia, M., *et al.* (2006). Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* *107*, 3708-3715.
- Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C.M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H., and Malavasi, F. (1998). Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *Journal of immunology* *160*, 395-402.
- 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.
- Deaglio, S., Vaisitti, T., Bergui, L., Bonello, L., Horenstein, A.L., Tamagnone, L., Boumsell, L., and Malavasi, F. (2005). CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* *105*, 3042-3050.
- Decker, T., Schneller, F., Sparwasser, T., Tretter, T., Lipford, G.B., Wagner, H., and Peschel, C. (2000). Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* *95*, 999-1006.
- Defrance, T., Carayon, P., Billian, G., Guillemot, J.C., Minty, A., Caput, D., and Ferrara, P. (1994). Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* *179*, 135-143.
- Deglesne, P.A., Chevallier, N., Letestu, R., Baran-Marszak, F., Beitar, T., Salanoubat, C., Sanhes, L., Nataf, J., Roger, C., Varin-Blank, N., *et al.* (2006). Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer research* *66*, 7158-7166.
- Del Giudice, I., Rossi, D., Chiaretti, S., Marinelli, M., Tavoraro, S., Gabrielli, S., Laurenti, L., Marasca, R., Rasi, S., Fangazio, M., *et al.* (2012). NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica* *97*, 437-441.
- Del Poeta, G., Maurillo, L., Venditti, A., Buccisano, F., Epiceno, A.M., Capelli, G., Tamburini, A., Suppo, G., Battaglia, A., Del Principe, M.I., *et al.* (2001). Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *98*, 2633-2639.
- Delic, J., Masdehors, P., Omura, S., Cosset, J.M., Dumont, J., Binet, J.L., and Magdelenat, H. (1998). The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF-alpha-initiated apoptosis. *Br J Cancer* *77*, 1103-1107.
- Di Bernardo, M.C., Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Webb, E., Sellick, G., Wild, R., Sullivan, K., Vijayakrishnan, J., Wang, Y., Pittman, A.M., *et al.* (2008). A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* *40*, 1204-1210.
- Dighiero, G., and Hamblin, T.J. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* *371*, 1017-1029.
- Dighiero, G., Travade, P., Chevret, S., Fenaux, P., Chastang, C., and Binet, J.L. (1991). B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood* *78*, 1901-1914.
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* *343*, 1910-1916.
- Dong, C., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* *20*, 55-72.

- Dono, M., Burgio, V.L., Colombo, M., Sciacchitano, S., Reverberi, D., Tarantino, V., Cutrona, G., Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2007). CD5+ B cells with the features of subepithelial B cells found in human tonsils. *European journal of immunology* *37*, 2138-2147.
- Dono, M., Cerruti, G., and Zupo, S. (2004). The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* *36*, 2105-2111.
- Dores, G.M., Anderson, W.F., Curtis, R.E., Landgren, O., Ostroumova, E., Bluhm, E.C., Rabkin, C.S., Devesa, S.S., and Linet, M.S. (2007). Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *British journal of haematology* *139*, 809-819.
- Dreger, P., Corradini, P., Kimby, E., Michallet, M., Milligan, D., Schetelig, J., Wiktor-Jedrzejczak, W., Niederwieser, D., Hallek, M., Montserrat, E., *et al.* (2007). Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* *21*, 12-17.
- Duhren-von Minden, M., Ubelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M.P., Buchner, M., Hofmann, D., Surova, E., Follo, M., Kohler, F., *et al.* (2012). Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* *489*, 309-312.
- Duyao, M.P., Buckler, A.J., and Sonenshein, G.E. (1990). Interaction of an NF-kappa B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 4727-4731.
- Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M., Buske, C., and Committee, E.G. (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* *26 Suppl 5*, v78-84.
- Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R.J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological reviews* *229*, 152-172.
- Emmrich, F., Moll, H., and Simon, M.M. (1985). Recombinant human interleukin 2 acts as a B cell growth and differentiation promoting factor. *Immunobiology* *169*, 97-102.
- Fabbri, G., and Dalla-Favera, R. (2016). The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer* *16*, 145-162.
- Fabbri, G., Khiabani, H., Holmes, A.B., Wang, J., Messina, M., Mullighan, C.G., Pasqualucci, L., Rabadan, R., and Dalla-Favera, R. (2013). Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *The Journal of experimental medicine* *210*, 2273-2288.
- Fabbri, G., Rasi, S., Rossi, D., Trifonov, V., Khiabani, H., Ma, J., Grunn, A., Fangazio, M., Capello, D., Monti, S., *et al.* (2011). Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of experimental medicine* *208*, 1389-1401.
- 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. *The Journal of clinical investigation* *102*, 1515-1525.
- Fecteau, J.F., and Neron, S. (2003). CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol* *171*, 4621-4629.
- Ferrer, A., Ollila, J., Tobin, G., Nagy, B., Thunberg, U., Aalto, Y., Vihinen, M., Vilpo, J., Rosenquist, R., and Knuutila, S. (2004). Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* *153*, 69-72.
- Filip, A.A., Cisel, B., and Wasik-Szczepanek, E. (2015). Guilty bystanders: nurse-like cells as a model of microenvironmental support for leukemic lymphocytes. *Clin Exp Med* *15*, 73-83.
- Fischer, K., Cramer, P., Busch, R., Bottcher, S., Bahlo, J., Schubert, J., Pfluger, K.H., Schott, S., Goede, V., Isfort, S., *et al.* (2012). Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* *30*, 3209-3216.
- Fischer, K., Cramer, P., Busch, R., Stilgenbauer, S., Bahlo, J., Schweighofer, C.D., Bottcher, S., Staib, P., Kiehl, M., Eckart, M.J., *et al.* (2011). Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* *29*, 3559-3566.

- Fischer, M., Klein, U., and Kuppers, 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. *The Journal of clinical investigation* *100*, 1667-1676.
- Forconi, F., Potter, K.N., Wheatley, I., Darzentas, N., Sozzi, E., Stamatopoulos, K., Mockridge, C.I., Packham, G., and Stevenson, F.K. (2010). The normal IGHV1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic patterns characteristic of unmutated CLL. *Blood* *115*, 71-77.
- Fournier, M.L., Paulson, A., Pavelka, N., Mosley, A.L., Gaudenz, K., Bradford, W.D., Glynn, E., Li, H., Sardu, M.E., Fleharty, B., *et al.* (2010). Delayed correlation of mRNA and protein expression in rapamycin-treated cells and a role for Ggc1 in cellular sensitivity to rapamycin. *Mol Cell Proteomics* *9*, 271-284.
- Fowler, T., Suh, H., Buratowski, S., and Roy, A.L. (2013). Regulation of primary response genes in B cells. *J Biol Chem* *288*, 14906-14916.
- Frolich, D., Blassfeld, D., Reiter, K., Giesecke, C., Daridon, C., Mei, H.E., Burmester, G.R., Goldenberg, D.M., Salama, A., and Dorner, T. (2012). The anti-CD74 humanized monoclonal antibody, milatuzumab, which targets the invariant chain of MHC II complexes, alters B-cell proliferation, migration, and adhesion molecule expression. *Arthritis Res Ther* *14*, R54.
- Fu, C., Turck, C.W., Kurosaki, T., and Chan, A.C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* *9*, 93-103.
- Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J., and Schatz, D.G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* *18*, 495-527.
- Fujimoto, M., Fujimoto, Y., Poe, J.C., Jansen, P.J., Lowell, C.A., DeFranco, A.L., and Tedder, T.F. (2000). CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification. *Immunity* *13*, 47-57.
- Furman, R.R., Asgary, Z., Mascarenhas, J.O., Liou, H.C., and Schattner, E.J. (2000). Modulation of NF- κ B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of immunology* *164*, 2200-2206.
- Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., and Busslinger, M. (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes & development* *18*, 411-422.
- Galibert, L., Durand, I., Banchereau, J., and Rousset, F. (1994). CD40-activated surface IgD-positive lymphocytes constitute the long term IL-4-dependent proliferating B cell pool. *J Immunol* *152*, 22-29.
- Galibert, L., van Dooren, J., Durand, I., Rousset, F., Jefferis, R., Banchereau, J., and Lebecque, S. (1995). Anti-CD40 plus interleukin-4-activated human naive B cell lines express unmutated immunoglobulin genes with intracлонаl heavy chain isotype variability. *Eur J Immunol* *25*, 733-737.
- Gardner, T.S., di Bernardo, D., Lorenz, D., and Collins, J.J. (2003). Inferring genetic networks and identifying compound mode of action via expression profiling. *Science* *301*, 102-105.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* *436*, 1186-1190.
- Ghalamfarsa, G., Jadidi-Niaragh, F., Hojjat-Farsangi, M., Asgarian-Omran, H., Yousefi, M., Tahmasebi, F., Khoshnoodi, J., Razavi, S.M., Saboor-Yaraghi, A.A., Rabbani, H., *et al.* (2013). Differential regulation of B-cell proliferation by IL21 in different subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Cytokine* *62*, 439-445.
- Ghia, P., Guida, G., Stella, S., Gottardi, D., Geuna, M., Strola, G., Scielzo, C., and Caligaris-Cappio, F. (2003). The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* *101*, 1262-1269.
- Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P.G., Carsetti, L., Berno, V., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2009). Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* *23*, 686-697.
- 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.

- Goldin, L.R., Bjorkholm, M., Kristinsson, S.Y., Turesson, I., and Landgren, O. (2009). Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 94, 647-653.
- Good, K.L., Avery, D.T., and Tangye, S.G. (2009). Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* 182, 890-901.
- Good, K.L., Bryant, V.L., and Tangye, S.G. (2006). Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *Journal of immunology* 177, 5236-5247.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of experimental medicine* 183, 1797-1806.
- Graham, J.P., Arcipowski, K.M., and Bishop, G.A. (2010). Differential B-lymphocyte regulation by CD40 and its viral mimic, latent membrane protein 1. *Immunol Rev* 237, 226-248.
- Granziero, L., Ghia, P., Circosta, P., Gottardi, D., Strola, G., Geuna, M., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M., and Caligaris-Cappio, F. (2001). Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97, 2777-2783.
- Grewal, I.S., and Flavell, R.A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16, 111-135.
- Gross, E., L'Faqihi-Olive, F.E., Ysebaert, L., Brassac, M., Struski, S., Kheirallah, S., Fournie, J.J., Laurent, G., and Quillet-Mary, A. (2010). B-chronic lymphocytic leukemia chemoresistance involves innate and acquired leukemic side population cells. *Leukemia* 24, 1885-1892.
- Guarini, A., Chiaretti, S., Tavoraro, S., Maggio, R., Peragine, N., Citarella, F., Ricciardi, M.R., Santangelo, S., Marinelli, M., De Propris, M.S., *et al.* (2008). BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* 112, 782-792.
- Gujer, C., Sundling, C., Seder, R.A., Karlsson Hedestam, G.B., and Lore, K. (2011). Human and rhesus plasmacytoid dendritic cell and B-cell responses to Toll-like receptor stimulation. *Immunology* 134, 257-269.
- Gutzeit, C., Nagy, N., Gentile, M., Lyberg, K., Gumz, J., Vallhov, H., Puga, I., Klein, E., Gabrielsson, S., Cerutti, A., *et al.* (2014). Exosomes derived from Burkitt's lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. *J Immunol* 192, 5852-5862.
- Hacker, H., and Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006, re13.
- Hallek, M. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 92, 946-965.
- Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., *et al.* (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 131, 2745-2760.
- Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, 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 Grunhagen, 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* 376, 1164-1174.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. (1999). Unmutated Ig V(H) 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.

- Hamilton, E., Pearce, L., Morgan, L., Robinson, S., Ware, V., Brennan, P., Thomas, N.S., Yallop, D., Devereux, S., Fegan, C., *et al.* (2012). Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *British journal of haematology* *158*, 589-599.
- Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J.C. (1993). bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *82*, 1820-1828.
- Haslinger, C., Schweifer, N., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Lichter, P., Kraut, N., Stratowa, C., and Abseher, R. (2004). Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol* *22*, 3937-3949.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* *18*, 1926-1945.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* *26*, 203-234.
- He, F., Balling, R., and Zeng, A.P. (2009). Reverse engineering and verification of gene networks: principles, assumptions, and limitations of present methods and future perspectives. *J Biotechnol* *144*, 190-203.
- Hecker, M., Lambeck, S., Toepfer, S., van Someren, E., and Guthke, R. (2009). Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models-a review. *Biosystems* *96*, 86-103.
- Heesters, B.A., Myers, R.C., and Carroll, M.C. (2014). Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nature reviews Immunology* *14*, 495-504.
- Hendriks, R.W., Yuvaraj, S., and Kil, L.P. (2014). Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* *14*, 219-232.
- Herishanu, Y., Perez-Galan, 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.
- Herling, M., Patel, K.A., Khalili, J., Schlette, E., Kobayashi, R., Medeiros, L.J., and Jones, D. (2006). TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* *20*, 280-285.
- Herman, S.E., Gordon, A.L., Hertlein, E., Ramanunni, A., Zhang, X., Jaglowski, S., Flynn, J., Jones, J., Blum, K.A., Buggy, J.J., *et al.* (2011). Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* *117*, 6287-6296.
- Herve, M., Xu, K., Ng, Y.S., Wardemann, H., Albesiano, E., Messmer, B.T., Chiorazzi, N., and Meffre, E. (2005). Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *The Journal of clinical investigation* *115*, 1636-1643.
- 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.
- Hinz, M., Loser, P., Mathas, S., Krappmann, D., Dorken, B., and Scheidereit, C. (2001). Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* *97*, 2798-2807.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Goodell, M.A., and Brenner, M.K. (2005). A distinct "side population" of cells in human tumor cells: implications for tumor biology and therapy. *Cell Cycle* *4*, 203-205.
- Hoellenriegel, J., Meadows, S.A., Sivina, M., Wierda, W.G., Kantarjian, H., Keating, M.J., Giese, N., O'Brien, S., Yu, A., Miller, L.L., *et al.* (2011). The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *118*, 3603-3612.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development* *17*, 2205-2232.

- Homig-Holzel, C., Hojer, C., Rastelli, J., Casola, S., Strobl, L.J., Muller, W., Quintanilla-Martinez, L., Gewies, A., Ruland, J., Rajewsky, K., *et al.* (2008). Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *The Journal of experimental medicine* 205, 1317-1329.
- Hozumi, N., and Tonegawa, S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 3628-3632.
- Hu, L., McArthur, C., and Jaffe, R.B. (2010). Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumourigenic and chemoresistant. *Br J Cancer* 102, 1276-1283.
- Ideker, T., Dutkowsky, J., and Hood, L. (2011). Boosting signal-to-noise in complex biology: prior knowledge is power. *Cell* 144, 860-863.
- Igarashi, H., and Sakaguchi, N. (1997). Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood* 89, 1299-1307.
- Imamura, Y., Oda, A., Katahira, T., Bundo, K., Pike, K.A., Ratcliffe, M.J., and Kitamura, D. (2009). BLNK binds active H-Ras to promote B cell receptor-mediated capping and ERK activation. *The Journal of biological chemistry* 284, 9804-9813.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291-295.
- Jain, P., and O'Brien, S. (2012). Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology (Williston Park)* 26, 1146-1152.
- Jang, I.S., Margolin, A., and Califano, A. (2013). hARACNe: improving the accuracy of regulatory model reverse engineering via higher-order data processing inequality tests. *Interface Focus* 3, 20130011.
- Jayapal, K.P., Philp, R.J., Kok, Y.J., Yap, M.G., Sherman, D.H., Griffin, T.J., and Hu, W.S. (2008). Uncovering genes with divergent mRNA-protein dynamics in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* 3, e2097.
- Jelinek, D.F., Tschumper, R.C., Stolovitzky, G.A., Iturria, S.J., Tu, Y., Lepre, J., Shah, N., and Kay, N.E. (2003). Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Res* 1, 346-361.
- Jeppson, J.D., Patel, H.R., Sakata, N., Domenico, J., Terada, N., and Gelfand, E.W. (1998). Requirement for dual signals by anti-CD40 and IL-4 for the induction of nuclear factor-kappa B, IL-6, and IgE in human B lymphocytes. *Journal of immunology* 161, 1738-1742.
- Johnson, T.A., Rassenti, L.Z., and Kipps, T.J. (1997). Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *Journal of immunology* 158, 235-246.
- Juliusson, G., Oscier, D.G., Fitchett, M., Ross, F.M., Stockdill, G., Mackie, M.J., Parker, A.C., Castoldi, G.L., Guneo, A., Knuutila, S., *et al.* (1990). Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 323, 720-724.
- Kalil, N., and Cheson, B.D. (1999). Chronic lymphocytic leukemia. *Oncologist* 4, 352-369.
- Kamburova, E.G., Koenen, H.J., Boon, L., Hilbrands, L.B., and Joosten, I. (2012). In vitro effects of rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *Am J Transplant* 12, 341-350.
- Kanduri, M., Cahill, N., Goransson, H., Enstrom, C., Ryan, F., Isaksson, A., and Rosenquist, R. (2010). Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115, 296-305.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 45, D353-D361.
- Karray, S., DeFrance, T., Merle-Beral, H., Banchereau, J., Debre, P., and Galanaud, P. (1988). Interleukin 4 counteracts the interleukin 2-induced proliferation of monoclonal B cells. *J Exp Med* 168, 85-94.
- Kater, A.P., Evers, L.M., Remmerswaal, E.B., Jaspers, A., Oosterwijk, M.F., van Lier, R.A., van Oers, M.H., and Eldering, E. (2004). CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack. *Br J Haematol* 127, 404-415.

- Keating, M.J., O'Brien, S., Lerner, S., Koller, C., Beran, M., Robertson, L.E., Freireich, E.J., Estey, E., and Kantarjian, H. (1998). Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 92, 1165-1171.
- 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.
- Kitada, S., Zapata, J.M., Andreeff, M., and Reed, J.C. (1999). Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* 106, 995-1004.
- Kitano, H. (2002a). Computational systems biology. *Nature* 420, 206-210.
- Kitano, H. (2002b). Systems biology: a brief overview. *Science* 295, 1662-1664.
- 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.
- 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. *The Journal of experimental medicine* 194, 1625-1638.
- Knauf, W.U., Lissichkov, T., Aldaoud, A., Liberati, A., Loscertales, J., Herbrecht, R., Juliusson, G., Postner, G., Gercheva, L., Goranov, S., *et al.* (2009). Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 27, 4378-4384.
- Kondo, T., Setoguchi, T., and Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 781-786.
- Kornblau, S.M., Chen, N., del Giglio, A., O'Brien, S., and Deisseroth, A.B. (1994). Retinoblastoma protein expression is frequently altered in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 54, 242-246.
- Korz, C., Pscherer, A., Benner, A., Mertens, D., Schaffner, C., Leupolt, E., Dohner, H., Stilgenbauer, S., and Lichter, P. (2002). Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* 99, 4554-4561.
- Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer. *Cell* 117, 787-800.
- Kudo, A., and Melchers, F. (1987). A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *The EMBO journal* 6, 2267-2272.
- Kulis, M., Heath, S., Bibikova, M., Queiros, A.C., Navarro, A., Clot, G., Martinez-Trillos, A., Castellano, G., Brun-Heath, I., Pinyol, M., *et al.* (2012). Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44, 1236-1242.
- Kurosaki, T. (2000). Functional dissection of BCR signaling pathways. *Current opinion in immunology* 12, 276-281.
- Kurosaki, T., Shinohara, H., and Baba, Y. (2010). B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol* 28, 21-55.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., and Stryckmans, P. (1998). Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 91, 2387-2396.
- Lam, K.P., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073-1083.
- Lanasa, M.C., Allgood, S.D., Volkheimer, A.D., Gockerman, J.P., Whitesides, J.F., Goodman, B.K., Moore, J.O., Weinberg, J.B., and Levesque, M.C. (2010). Single-cell analysis reveals oligoclonality among 'low-count' monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leukemia* 24, 133-140.
- 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., Soderberg, A., Baxendale, H., Dahle, C., Willander, K., Tobin, G., Backman, E., Soderberg, 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.
- Law, C.W., Chen, Y., Shi, W., and Smyth, G.K. (2014). voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* *15*, R29.
- Law, P.J., Berndt, S.I., Speedy, H.E., Camp, N.J., Sava, G.P., Skibola, C.F., Holroyd, A., Joseph, V., Sunter, N.J., Nieters, A., *et al.* (2017a). Genome-wide association analysis implicates dysregulation of immunity genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun* *8*, 14175.
- Law, P.J., Sud, A., Mitchell, J.S., Henrion, M., Orlando, G., Lenive, O., Broderick, P., Speedy, H.E., Johnson, D.C., Kaiser, M., *et al.* (2017b). Genome-wide association analysis of chronic lymphocytic leukaemia, Hodgkin lymphoma and multiple myeloma identifies pleiotropic risk loci. *Sci Rep* *7*, 41071.
- Le Gallou, S., Caron, G., Delaloy, C., Rossille, D., Tarte, K., and Fest, T. (2012). IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *Journal of immunology* *189*, 161-173.
- Le Guyader-Peyrou, S., Belot, A., Maynadie, M., Binder-Foucard, F., Remontet, L., Troussard, X., Bossard, N., Monnereau, A., and French network of cancer, r. (2016). Cancer incidence in France over the 1980-2012 period: Hematological malignancies. *Rev Epidemiol Sante Publique* *64*, 103-112.
- Ledoux, A.C., and Perkins, N.D. (2014). NF-kappaB and the cell cycle. *Biochem Soc Trans* *42*, 76-81.
- Lee, J.H., Noh, J., Noh, G., Choi, W.S., and Lee, S.S. (2011). IL-10 is predominantly produced by CD19(low)CD5(+) regulatory B cell subpopulation: characterisation of CD19 (high) and CD19(low) subpopulations of CD5(+) B cells. *Yonsei Med J* *52*, 851-855.
- Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., Hannett, N.M., Harbison, C.T., Thompson, C.M., Simon, I., *et al.* (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *298*, 799-804.
- Leek, J.T., Monsen, E., Dabney, A.R., and Storey, J.D. (2006). EDGE: extraction and analysis of differential gene expression. *Bioinformatics* *22*, 507-508.
- Leporrier, M., Chevret, S., Cazin, B., Boudjerra, N., Feugier, P., Desablens, B., Rapp, M.J., Jaubert, J., Autrand, C., Divine, M., *et al.* (2001). Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* *98*, 2319-2325.
- Letestu, R., Rawstron, A., Ghia, P., Villamor, N., Boeckx, N., Boettcher, S., Buhl, A.M., Duerig, J., Ibbotson, R., Kroeber, A., *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, Z., Woo, C.J., Iglesias-Ussel, M.D., Ronai, D., and Scharff, M.D. (2004). The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes & development* *18*, 1-11.
- Lia, M., Carette, A., Tang, H., Shen, Q., Mo, T., Bhagat, G., Dalla-Favera, R., and Klein, U. (2012). Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines. *Blood* *119*, 2981-2990.
- Liang, X., Moseman, E.A., Farrar, M.A., Bachanova, V., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., and Chen, W. (2010). Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* *115*, 5041-5052.
- Lim, W.A., and Pawson, T. (2010). Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell* *142*, 661-667.
- Liu, W., Won Sohn, H., Tolar, P., Meckel, T., and Pierce, S.K. (2010). Antigen-induced oligomerization of the B cell receptor is an early target of Fc gamma RIIB inhibition. *Journal of immunology* *184*, 1977-1989.
- Liu, Z.P., Wu, C., Miao, H., and Wu, H. (2015). RegNetwork: an integrated database of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks in human and mouse. *Database (Oxford)* *2015*.

- Longo, P.G., Laurenti, L., Gobessi, S., Petlickovski, A., Pelosi, M., Chiusolo, P., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2007). The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 21, 110-120.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849.
- Lund, F.E., Yu, N., Kim, K.M., Reth, M., and Howard, M.C. (1996). Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. *Journal of immunology* 157, 1455-1467.
- Luscombe, N.M., Babu, M.M., Yu, H., Snyder, M., Teichmann, S.A., and Gerstein, M. (2004). Genomic analysis of regulatory network dynamics reveals large topological changes. *Nature* 431, 308-312.
- Lutzny, G., Kocher, T., Schmidt-Supprian, M., Rudelius, M., Klein-Hitpass, L., Finch, A.J., Durig, J., Wagner, M., Haferlach, C., Kohlmann, A., *et al.* (2013). Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer cell* 23, 77-92.
- Maas, A., and Hendriks, R.W. (2001). Role of Bruton's tyrosine kinase in B cell development. *Dev Immunol* 8, 171-181.
- MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12, 117-139.
- Maeda, T., Merghoub, T., Hobbs, R.M., Dong, L., Maeda, M., Zakrzewski, J., van den Brink, M.R., Zelent, A., Shigematsu, H., Akashi, K., *et al.* (2007). Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science* 316, 860-866.
- Mainou-Fowler, T., Copplestone, J.A., and Prentice, A.G. (1995). Effect of interleukins on the proliferation and survival of B cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *J Clin Pathol* 48, 482-487.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D., and Roitt, I. (2006). *Immunology* (7th ed.).
- Manis, J.P., Tian, M., and Alt, F.W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends in immunology* 23, 31-39.
- Marbach, D., Prill, R.J., Schaffter, T., Mattiussi, C., Floreano, D., and Stolovitzky, G. (2010). Revealing strengths and weaknesses of methods for gene network inference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6286-6291.
- Marschitz, I., Tinhofer, I., Hittmair, A., Egle, A., Kos, M., and Greil, R. (2000). Analysis of Bcl-2 protein expression in chronic lymphocytic leukemia. A comparison of three semiquantitation techniques. *Am J Clin Pathol* 113, 219-229.
- Masdehors, P., Merle-Beral, H., Maloum, K., Omura, S., Magdelenat, H., and Delic, J. (2000). Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood* 96, 269-274.
- Masdehors, P., Omura, S., Merle-Beral, H., Mentz, F., Cosset, J.M., Dumont, J., Magdelenat, H., and Delic, J. (1999). Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. *Br J Haematol* 105, 752-757.
- 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.
- McCarthy, D.J., Chen, Y., and Smyth, G.K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* 40, 4288-4297.
- McKenzie, A.N., Culpepper, J.A., de Waal Malefyt, R., Briere, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B.G., Menon, S., *et al.* (1993). Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3735-3739.
- Mehta, D.S., Wurster, A.L., Whitters, M.J., Young, D.A., Collins, M., and Grusby, M.J. (2003). IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. *Journal of immunology* 170, 4111-4118.
- Messmer, B.T., Albesiano, E., Efremov, D.G., Ghiotto, F., Allen, S.L., Koltz, J., Foa, R., Damle, R.N., Fais, F., Messmer, D., *et al.* (2004). Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine* 200, 519-525.

- Messmer, B.T., Messmer, D., Allen, S.L., Kolitz, J.E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E.J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., *et al.* (2005). In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of clinical investigation* *115*, 755-764.
- Mockridge, C.I., Potter, K.N., Wheatley, I., Neville, L.A., Packham, G., and Stevenson, F.K. (2007). Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood* *109*, 4424-4431.
- Mognol, G.P., Carneiro, F.R., Robbs, B.K., Faget, D.V., and Viola, J.P. (2016). Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis* *7*, e2199.
- Mond, J.J., Lees, A., and Snapper, C.M. (1995). T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* *13*, 655-692.
- Mongini, P.K., Gupta, R., Boyle, E., Nieto, J., Lee, H., Stein, J., Bandovic, J., Stankovic, T., Barrientos, J., Kolitz, J.E., *et al.* (2015). TLR-9 and IL-15 Synergy Promotes the In Vitro Clonal Expansion of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *J Immunol* *195*, 901-923.
- Monroe, J.G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nature reviews Immunology* *6*, 283-294.
- Montserrat, E., Sanchez-Bisono, J., Vinolas, N., and Rozman, C. (1986). Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* *62*, 567-575.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* *19*, 683-765.
- Morabito, F., Mangiola, M., Oliva, B., Stelitano, C., Callea, V., Deaglio, S., Iacopino, P., Brugiattelli, M., and Malavasi, F. (2001). Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* *25*, 927-932.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553-563.
- Murphy, K., and Weaver, C. (2017). In *Janeway's Immunobiology* (9th ed), G. Science, ed.
- Muzio, M., Apollonio, B., Scielzo, C., Frenquelli, M., Vandoni, I., Bousiotis, V., Caligaris-Cappio, F., and Ghia, P. (2008). Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* *112*, 188-195.
- Nedellec, S., Renaudineau, Y., Bordron, A., Berthou, C., Porakishvili, N., Lydyard, P.M., Pers, J.O., and Youinou, P. (2005). B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol* *174*, 3749-3756.
- Neron, S., Racine, C., Roy, A., and Guerin, M. (2005). Differential responses of human B-lymphocyte subpopulations to graded levels of CD40-CD154 interaction. *Immunology* *116*, 454-463.
- Neron, S., Roy, A., Dumont, N., and Dussault, N. (2011). Effective in vitro expansion of CD40-activated human B lymphocytes in a defined bovine protein-free medium. *J Immunol Methods* *371*, 61-69.
- Niederle, N., Megdenberg, D., Balleisen, L., Heit, W., Knauf, W., Weiss, J., Freier, W., Hinke, A., Ibach, S., and Eimermacher, H. (2013). Bendamustine compared to fludarabine as second-line treatment in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* *92*, 653-660.
- Nitschke, L., and Tsubata, T. (2004). Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. *Trends in immunology* *25*, 543-550.
- 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.
- O'Brien, S.M., Kantarjian, H., Thomas, D.A., Giles, F.J., Freireich, E.J., Cortes, J., Lerner, S., and Keating, M.J. (2001a). Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* *19*, 2165-2170.
- O'Brien, S.M., Kantarjian, H.M., Cortes, J., Beran, M., Koller, C.A., Giles, F.J., Lerner, S., and Keating, M. (2001b). Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* *19*, 1414-1420.

- O'Garra, A., Umland, S., De France, T., and Christiansen, J. (1988). 'B-cell factors' are pleiotropic. *Immunol Today* 9, 45-54.
- O'Neill, L.A., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 7, 353-364.
- Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nature reviews Immunology* 6, 573-583.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523.
- Okada, T., and Cyster, J.G. (2006). B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Current opinion in immunology* 18, 278-285.
- Olsen, N.J., Decker, D.A., Higgins, P., Becker, P.M., McAloose, C.A., Benko, A.L., and Kovacs, W.J. (2015). Direct effects of HP Acthar Gel on human B lymphocyte activation in vitro. *Arthritis Res Ther* 17, 300.
- Oppizzo, P., and Dighiero, G. (2013). "Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia". *Blood cancer journal* 3, e149.
- Os, A., Burgler, S., Ribes, A.P., Funderud, A., Wang, D., Thompson, K.M., Tjonnfjord, G.E., Bogen, B., and Munthe, L.A. (2013). Chronic lymphocytic leukemia cells are activated and proliferate in response to specific T helper cells. *Cell Rep* 4, 566-577.
- Ouillette, P., Collins, R., Shakhani, S., Li, J., Li, C., Shedden, K., and Malek, S.N. (2011). The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 17, 6778-6790.
- Ouillette, P., Erba, H., Kujawski, L., Kaminski, M., Shedden, K., and Malek, S.N. (2008). Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res* 68, 1012-1021.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.P., Wang, G., Qi, C.F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., *et al.* (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 173, 5361-5371.
- 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.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Paludan, S.R. (1998). Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol* 48, 459-468.
- Panayiotidis, P., Ganeshaguru, K., Jabbar, S.A., and Hoffbrand, A.V. (1993). Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* 85, 439-445.
- Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L., and Hoffbrand, A.V. (1996). Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* 92, 97-103.
- Pappu, R., Cheng, A.M., Li, B., Gong, Q., Chiu, C., Griffin, N., White, M., Sleckman, B.P., and Chan, A.C. (1999). Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. *Science* 286, 1949-1954.
- Parker, D.C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-360.
- Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., *et al.* (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57-63.
- Pascutti, M.F., Jak, M., Tromp, J.M., Derks, I.A., Remmerswaal, E.B., Thijssen, R., van Attekum, M.H., van Bochove, G.G., Luijckx, D.M., Pals, S.T., *et al.* (2013). IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood* 122, 3010-3019.
- 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.

- Pede, V., Rombout, A., Vermeire, J., Naessens, E., Mestdagh, P., Robberecht, N., Vanderstraeten, H., Van Roy, N., Vandesompele, J., Speleman, F., *et al.* (2013). CLL cells respond to B-Cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression. *PLoS One* 8, e60275.
- Peng, S.L. (2005). Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Current opinion in immunology* 17, 230-236.
- Perkins, N.D. (2012). The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nature reviews Cancer* 12, 121-132.
- Perrot, A., Pionneau, C., Nadaud, S., Davi, F., Leblond, V., Jacob, F., Merle-Beral, H., Herbrecht, R., Bene, M.C., Gribben, J.G., *et al.* (2011). A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118, e1-15.
- 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.
- Phillips, J.A., Mehta, K., Fernandez, C., and Raveche, E.S. (1992). The NZB mouse as a model for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 52, 437-443.
- Plander, M., Seegers, S., Ugocsai, P., Diermeier-Daucher, S., Ivanyi, J., Schmitz, G., Hofstadter, F., Schwarz, S., Orso, E., Knuchel, R., *et al.* (2009). Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles. *Leukemia* 23, 2118-2128.
- Pleiman, C.M., D'Ambrosio, D., and Cambier, J.C. (1994). The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol Today* 15, 393-399.
- Pritchard, N.R., and Smith, K.G. (2003). B cell inhibitory receptors and autoimmunity. *Immunology* 108, 263-273.
- Puente, X.S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordonez, G.R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Bea, S., Gonzalez-Diaz, M., *et al.* (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475, 101-105.
- Pulte, D., Castro, F.A., Jansen, L., Luttmann, S., Holleczer, B., Nennecke, A., Rensing, M., Katalinic, A., Brenner, H., and Group, G.C.S.W. (2016). Trends in survival of chronic lymphocytic leukemia patients in Germany and the USA in the first decade of the twenty-first century. *J Hematol Oncol* 9, 28.
- Punnonen, J., Cocks, B.G., Carballido, J.M., Bennett, B., Peterson, D., Aversa, G., and de Vries, J.E. (1997). Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 185, 993-1004.
- Purroy, N., Abrisqueta, P., Carabia, J., Carpio, C., Calpe, E., Palacio, C., Castellvi, J., Crespo, M., and Bosch, F. (2014). Targeting the proliferative and chemoresistant compartment in chronic lymphocytic leukemia by inhibiting survivin protein. *Leukemia* 28, 1993-2004.
- Purroy, N., Abrisqueta, P., Carabia, J., Carpio, C., Palacio, C., Bosch, F., and Crespo, M. (2015). Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget* 6, 7632-7643.
- Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordonez, G.R., Jares, P., Bassaganyas, L., Ramsay, A.J., Bea, S., Pinyol, M., Martinez-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.
- Rai, K.R., Peterson, B.L., Appelbaum, F.R., Kolitz, J., Elias, L., Shepherd, L., Hines, J., Threatte, G.A., Larson, R.A., Cheson, B.D., *et al.* (2000). Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343, 1750-1757.
- Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., and Pasternack, B.S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46, 219-234.
- Rakhmanov, M., Sic, H., Kienzler, A.K., Fischer, B., Rizzi, M., Seidl, M., Melkaoui, K., Unger, S., Moehle, L., Schmit, N.E., *et al.* (2014). High levels of SOX5 decrease proliferative capacity of human B cells, but permit plasmablast differentiation. *PLoS One* 9, e100328.

- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* *15*, 707-747.
- 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. *The New England journal of medicine* *351*, 893-901.
- Raval, A., Tanner, S.M., Byrd, J.C., Angerman, E.B., Perko, J.D., Chen, S.S., Hackanson, B., Grever, M.R., Lucas, D.M., Matkovic, J.J., *et al.* (2007). Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* *129*, 879-890.
- Rawstron, A.C., Bennett, F.L., O'Connor, S.J., Kwok, M., Fenton, J.A., 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. *The New England journal of medicine* *359*, 575-583.
- Rawstron, A.C., Green, M.J., Kuzmicki, A., Kennedy, B., Fenton, J.A., Evans, P.A., O'Connor, S.J., Richards, S.J., Morgan, G.J., Jack, A.S., *et al.* (2002). Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* *100*, 635-639.
- Recher, M., Berglund, L.J., Avery, D.T., Cowan, M.J., Gennery, A.R., Smart, J., Peake, J., Wong, M., Pai, S.Y., Baxi, S., *et al.* (2011). IL-21 is the primary common gamma chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. *Blood* *118*, 6824-6835.
- 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.
- Rickert, R.C., Jellusova, J., and Miletic, A.V. (2011). Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunological reviews* *244*, 115-133.
- Ringshausen, I., Schneller, F., Bogner, C., Hipp, S., Duyster, J., Peschel, C., and Decker, T. (2002). Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* *100*, 3741-3748.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* *43*, e47.
- Roberts, A.W., Davids, M.S., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Puvvada, S.D., Gerecitano, J.F., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Brown, J.R., Gressick, L., *et al.* (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* *374*, 311-322.
- 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. *The Journal of experimental medicine* *194*, 1639-1647.
- 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., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., Del Giudice, I., Fabbri, G., Bruscaggin, A., *et al.* (2012). Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *119*, 2854-2862.
- Rossi, D., Spina, V., and Gaidano, G. (2018). Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood* *131*, 2761-2772.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D.H., Kastelein, R., Moore, K.W., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 1890-1893.
- Ruden, D.M., Garfinkel, M.D., Sollars, V.E., and Lu, X. (2003). Waddington's widget: Hsp90 and the inheritance of acquired characters. *Semin Cell Dev Biol* *14*, 301-310.
- Ruiz-Lafuente, N., Alcaraz-Garcia, M.J., Sebastian-Ruiz, S., Gomez-Espuch, J., Funes, C., Moraleda, J.M., Garcia-Garay, M.C., Montes-Barqueros, N., Minguela, A., Alvarez-Lopez, M.R., *et al.* (2014). The gene expression response of chronic

lymphocytic leukemia cells to IL-4 is specific, depends on ZAP-70 status and is differentially affected by an NFkappaB inhibitor. *PLoS One* 9, e109533.

Saito, T., Kitayama, D., Sakamoto, A., Tsuruoka, N., Arima, M., Hatano, M., Miyazaki, M., and Tokuhisa, T. (2008). Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation. *Immunobiology* 213, 545-555.

Scaglione, B.J., Salerno, E., Balan, M., Coffman, F., Landgraf, P., Abbasi, F., Kotenko, S., Marti, G.E., and Raveche, E.S. (2007). Murine models of chronic lymphocytic leukaemia: role of microRNA-16 in the New Zealand Black mouse model. *British journal of haematology* 139, 645-657.

Schafer, J., and Strimmer, K. (2005). An empirical Bayes approach to inferring large-scale gene association networks. *Bioinformatics* 21, 754-764.

Schatz, D.G. (2004). V(D)J recombination. *Immunological reviews* 200, 5-11.

Schilizzi, B.M., Boonstra, R., The, T.H., and de Leij, L.F. (1997). Effect of B-cell receptor engagement on CD40-stimulated B cells. *Immunology* 92, 346-353.

Schleiss, C., Ilias, W., Tahar, O., Guler, Y., Miguet, L., Mayeur-Rousse, C., Mauvieux, L., Fornecker, L.M., Toussaint, E., Herbrecht, R., *et al.* (2019). BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation *ex vivo*. *Sci Rep* 9, 701.

Schmid, C., and Isaacson, P.G. (1994). Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology* 24, 445-451.

Schroeder, H.W., Jr., and Dighiero, G. (1994). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 15, 288-294.

Schumm, K., Rocha, S., Caamano, J., and Perkins, N.D. (2006). Regulation of p53 tumour suppressor target gene expression by the p52 NF-kappaB subunit. *The EMBO journal* 25, 4820-4832.

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.

Seifert, M., Sellmann, L., Bloehdorn, J., Wein, F., Stilgenbauer, S., Durig, J., and Kupperts, R. (2012). Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine* 209, 2183-2198.

Senhaji, N., Kojok, K., Darif, Y., Fadainia, C., and Zaid, Y. (2015). The Contribution of CD40/CD40L Axis in Inflammatory Bowel Disease: An Update. *Front Immunol* 6, 529.

Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology* 4, E131-136.

Shukla, V., Ma, S., Hardy, R.R., Joshi, S.S., and Lu, R. (2013). A role for IRF4 in the development of CLL. *Blood* 122, 2848-2855.

Simonetti, G., Bertilaccio, M.T., Ghia, P., and Klein, U. (2014). Mouse models in the study of chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and therapy. *Blood* 124, 1010-1019.

Smyth, G.K. (2005). *limma: Linear Models for Microarray Data*. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, Springer, ed., pp. 397-420.

Solh, M., Rai, K.R., Peterson, B.L., Kolitz, J.E., Appelbaum, F.R., Tallman, M.S., Belch, A., Larson, R.A., and Morrison, V.A. (2013). The impact of initial fludarabine therapy on transformation to Richter syndrome or prolymphocytic leukemia in patients with chronic lymphocytic leukemia: analysis of an intergroup trial (CALGB 9011). *Leuk Lymphoma* 54, 252-254.

Sommer, K., Guo, B., Pomerantz, J.L., Bandaranayake, A.D., Moreno-Garcia, M.E., Ovechkina, Y.L., and Rawlings, D.J. (2005). Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity* 23, 561-574.

Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9, 59-71.

- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., *et al.* (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* *19*, 202-208.
- Speedy, H.E., Di Bernardo, M.C., Sava, G.P., Dyer, M.J., Holroyd, A., Wang, Y., Sunter, N.J., Mansouri, L., Juliusson, G., Smedby, K.E., *et al.* (2014). A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* *46*, 56-60.
- Speedy, H.E., Sava, G., and Houlston, R.S. (2013). Inherited susceptibility to CLL. *Adv Exp Med Biol* *792*, 293-308.
- Spolski, R., and Leonard, W.J. (2014). Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* *13*, 379-395.
- Spriggs, M.K., Armitage, R.J., Strockbine, L., Clifford, K.N., Macduff, B.M., Sato, T.A., Maliszewski, C.R., and Fanslow, W.C. (1992). Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *The Journal of experimental medicine* *176*, 1543-1550.
- Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D.P., Zhang, B., Paik, J.H., DePinho, R.A., Kutok, J.L., Kearney, J.F., Otipoby, K.L., and Rajewsky, K. (2009). PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* *139*, 573-586.
- Stamatopoulos, K., Belessi, C., Moreno, C., Boudjograh, M., Guida, G., Smilevska, T., Belhoul, L., Stella, S., Stavroyianni, N., Crespo, M., *et al.* (2007). Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* *109*, 259-270.
- Stankovic, T., and Skowronska, A. (2014). The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* *55*, 1227-1239.
- Steele, A.J., Prentice, A.G., Cwynarski, K., Hoffbrand, A.V., Hart, S.M., Lowdell, M.W., Samuel, E.R., and Wickremasinghe, R.G. (2010). The JAK3-selective inhibitor PF-956980 reverses the resistance to cytotoxic agents induced by interleukin-4 treatment of chronic lymphocytic leukemia cells: potential for reversal of cytoprotection by the microenvironment. *Blood* *116*, 4569-4577.
- Stevenson, F.K., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* *103*, 4389-4395.
- Strati, P., Abruzzo, L.V., Wierda, W.G., O'Brien, S., Ferrajoli, A., and Keating, M.J. (2015). Second cancers and Richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* *15*, 420-427.
- Strati, P., and Shanafelt, T.D. (2015). Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood* *126*, 454-462.
- Stratowa, C., Loffler, G., Lichter, P., Stilgenbauer, S., Haberl, P., Schweifer, N., Dohner, H., and Wilgenbus, K.K. (2001). CDNA microarray gene expression analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia proposes potential new prognostic markers involved in lymphocyte trafficking. *Int J Cancer* *91*, 474-480.
- Sutton, L., Maloum, K., Gonzalez, H., Zouabi, H., Azar, N., Boccaccio, C., Charlotte, F., Cosset, J.M., Gabarre, J., Leblond, V., *et al.* (1998). Autologous hematopoietic stem cell transplantation as salvage treatment for advanced B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *12*, 1699-1707.
- Tangye, S.G., Avery, D.T., Deenick, E.K., and Hodgkin, P.D. (2003). Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol* *170*, 686-694.
- Tavolaro, S., Colombo, T., Chiaretti, S., Peragine, N., Fulci, V., Ricciardi, M.R., Messina, M., Bonina, S., Brugnoletti, F., Marinelli, M., *et al.* (2015). Increased chronic lymphocytic leukemia proliferation upon IgM stimulation is sustained by the upregulation of miR-132 and miR-212. *Genes Chromosomes Cancer* *54*, 222-234.
- Tedder, T.F., Inaoki, M., and Sato, S. (1997). The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* *6*, 107-118.
- Ten Hacken, E., and Burger, J.A. (2016). Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* *1863*, 401-413.

- Thijssen, R., Ter Burg, J., van Bochove, G.G., de Rooij, M.F., Kuil, A., Jansen, M.H., Kuijpers, T.W., Baars, J.W., Virone-Oddos, A., Spaargaren, M., *et al.* (2016). The pan phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor SAR245409 (voxtalisib/XL765) blocks survival, adhesion and proliferation of primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 30, 337-345.
- Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., Thorn, I., Soderberg, O., Hultdin, M., Botling, J., Enblad, G., Sallstrom, J., Sundstrom, C., *et al.* (2002). Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99, 2262-2264.
- Touw, I., Dorssers, L., and Lowenberg, B. (1987). The proliferative response of B cell chronic lymphocytic leukemia to interleukin 2: functional characterization of the interleukin 2 membrane receptors. *Blood* 69, 1667-1673.
- Trbusek, M., Malcikova, J., Smardova, J., Kuhrova, V., Mentzlova, D., Francova, H., Bukovska, S., Svitakova, M., Kuglik, P., Linkova, V., *et al.* (2006). Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia* 20, 1159-1161.
- Trentin, L., Cerutti, A., Zambello, R., Sancetta, R., Tassinari, C., Facco, M., Adami, F., Rodeghiero, F., Agostini, C., and Semenzato, G. (1996). Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood* 87, 3327-3335.
- Tromp, J.M., Tonino, S.H., Elias, J.A., Jaspers, A., Luijks, D.M., Kater, A.P., van Lier, R.A., van Oers, M.H., and Eldering, E. (2010). Dichotomy in NF-kappaB signaling and chemoresistance in immunoglobulin variable heavy-chain-mutated versus unmutated CLL cells upon CD40/TLR9 triggering. *Oncogene* 29, 5071-5082.
- Tsubata, T., and Reth, M. (1990). The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *The Journal of experimental medicine* 172, 973-976.
- Tsukada, N., Burger, J.A., Zvaifler, N.J., and Kipps, T.J. (2002). Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99, 1030-1037.
- Vallat, L.D., Park, Y., Li, C., and Gribben, J.G. (2007). Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood* 109, 3989-3997.
- Vardi, A., Agathangelidis, A., Sutton, L.A., Ghia, P., Rosenquist, R., and Stamatopoulos, K. (2014). Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer Res* 74, 4211-4216.
- Vivier, E., and Daeron, M. (1997). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 18, 286-291.
- Vuillier, F., Dumas, G., Magnac, C., Prevost, M.C., Lalanne, A.I., Opezzo, P., Melanitou, E., Dighiero, G., and Payelle-Brogard, B. (2005). Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains. *Blood* 105, 2933-2940.
- Wagner, E.F., Hanna, N., Fast, L.D., Kouttab, N., Shank, P.R., Vazquez, A., and Sharma, S. (2000). Novel diversity in IL-4-mediated responses in resting human naive B cells versus germinal center/memory B cells. *J Immunol* 165, 5573-5579.
- Wagner, E.F., Hleb, M., Hanna, N., and Sharma, S. (1998). A pivotal role of cyclin D3 and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in the regulation of IL-2-, IL-4-, or IL-10-mediated human B cell proliferation. *J Immunol* 161, 1123-1131.
- Wagner, M., Oelsner, M., Moore, A., Gotte, 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.
- Waldbauer, J.R., Rodrigue, S., Coleman, M.L., and Chisholm, S.W. (2012). Transcriptome and proteome dynamics of a light-dark synchronized bacterial cell cycle. *PLoS One* 7, e43432.
- Walker, J.A., and Smith, K.G. (2008). CD22: an inhibitory enigma. *Immunology* 123, 314-325.
- Wang, L., Lawrence, M.S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D.S., Zhang, L., *et al.* (2011). SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 365, 2497-2506.
- Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J., and Hood, L. (1980). The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature* 283, 497-499.

- Weill, J.C., Weller, S., and Reynaud, C.A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 27, 267-285.
- Weiss, A., and Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274.
- Wierda, W.G., Kipps, T.J., Mayer, J., Stilgenbauer, S., Williams, C.D., Hellmann, A., Robak, T., Furman, R.R., Hillmen, P., Trneny, M., *et al.* (2010). Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 28, 1749-1755.
- 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.
- Woyach, J.A., Bojnik, E., Ruppert, A.S., Stefanovski, M.R., Goettl, V.M., Smucker, K.A., Smith, L.L., Dubovsky, J.A., Towns, W.H., MacMurray, J., *et al.* (2014a). Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 123, 1207-1213.
- Woyach, J.A., Furman, R.R., Liu, T.M., Ozer, H.G., Zapatka, M., Ruppert, A.S., Xue, L., Li, D.H., Steggerda, S.M., Versele, M., *et al.* (2014b). Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 370, 2286-2294.
- Wu, C., Wei, Q., Utomo, V., Nadesan, P., Whetstone, H., Kandel, R., Wunder, J.S., and Alman, B.A. (2007). Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res* 67, 8216-8222.
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nature reviews Immunology* 12, 517-531.
- Yan, X.J., Albesiano, E., Zanesi, N., Yancopoulos, S., Sawyer, A., Romano, E., Petlickovski, A., Efremov, D.G., Croce, C.M., and Chiorazzi, N. (2006). B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11713-11718.
- Yang, Y.R., Choi, J.H., Chang, J.S., Kwon, H.M., Jang, H.J., Ryu, S.H., and Suh, P.G. (2012). Diverse cellular and physiological roles of phospholipase C-gamma1. *Adv Biol Regul* 52, 138-151.
- Ying, H., Li, Z., Yang, L., and Zhang, J. (2011). Syk mediates BCR- and CD40-signaling integration during B cell activation. *Immunobiology* 216, 566-570.
- Yosef, N., and Regev, A. (2011). Impulse control: temporal dynamics in gene transcription. *Cell* 144, 886-896.
- Yoshida, T., Higuchi, T., Hagiwara, H., Strasser, A., Nishioka, K., and Tsubata, T. (2000). Rapid B cell apoptosis induced by antigen receptor ligation does not require Fas (CD95/APO-1), the adaptor protein FADD/MORT1 or CrmA-sensitive caspases but is defective in both MRL-*+/+* and MRL-*lpr/lpr* mice. *International immunology* 12, 517-526.
- Zapata, J.M., Krajewska, M., Morse, H.C., 3rd, Choi, Y., and Reed, J.C. (2004). TNF receptor-associated factor (TRAF) domain and Bcl-2 cooperate to induce small B cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16600-16605.
- Zenz, T., Mertens, D., Kuppers, R., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer* 10, 37-50.
- Zhang, S., and Kipps, T.J. (2014). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annu Rev Pathol* 9, 103-118.
- Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C.L., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M., *et al.* (2010). CD137 promotes proliferation and survival of human B cells. *J Immunol* 184, 787-795.
- Zupo, S., Massara, R., Dono, M., Rossi, E., Malavasi, F., Cosulich, M.E., and Ferrarini, M. (2000). Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD. *Blood* 95, 1199-1206.

Annexe

Manuscrit : MICA is expressed at early stages of lymphoproliferation independently of the replication-induced DNA damages

Les résultats obtenus font l'objet d'un manuscrit qui a été soumis pour publication.

MICA is expressed at early stages of lymphoproliferation independently of the replication-induced DNA damages

Running title: MICA and lymphoproliferation

Wassila Ilias^{1,2}, Cedric Schleiss^{1,2}, Ghada Alsaleh^{1,2}, Ouria Tahar^{1,2,3}, Luc-Matthieu Fornecker^{4,5}, Raoul Herbrecht^{4,5}, Laurent Mauvieux^{4,6}, Myriam Maumy-Bertrand⁷, Frédéric Bertrand⁷, Philippe Georgel^{1,2}, Raphael Carapito^{1,2,3}, Seiamak Bahram^{1,2,3*}, Laurent Vallat^{4,6*}

¹Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR_S 1109, LabEx Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

³ Laboratoire Central d'Immunologie, Plateau Technique de Biologie, Pôle de Biologie, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, 67091 Strasbourg, France

⁴ Université de Strasbourg, INSERM UMR-S1113 / IRFAC, Strasbourg, France

⁵ Service d'Hématologie Adulte, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67200, Strasbourg, France

⁶ Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67200, Strasbourg, France

⁷ Institut de Recherche Mathématique Avancée IRMA, CNRS UMR 7501, Strasbourg, France

*corresponding authors : Seiamak Bahram siamak@unistra.fr; Laurent Vallat vallat@unistra.fr

Figures: 6

Supplemental Figures : 5

References: 45

Word count: Abstract: 198 - Text: 3953

Keywords: anti-tumor immunology, NKG2D-ligand, B cells, chronic lymphocytic leukemia

List of abbreviations:

BCR:	B-cell receptor
CFSE:	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CLL:	Chronic lymphocytic leukemia
MGUS:	Gammopathy of undetermined significance
MICA:	Major histocompatibility complex class I chain-related genes A
MICB:	Major histocompatibility complex class I chain-related genes B
MM:	Multiple myeloma
NKG2D:	Natural killer group 2 member D receptor
NKG2D-L:	Natural killer group 2 member D receptor-ligand

Abstract:

The non-conventional MHC class I MICA and MICB molecules signal cell stress, including tumor-associated genotoxic stress, to NKG2D-bearing cytotoxic cells. Few studies have however addressed the role of MICA/B expression in hematological malignancies. In most lymphoproliferative syndromes, an aberrant antigenic stimulation is thought to sustain cell proliferation, but a potential MICA/B implication in immunosurveillance at this initial stage of leukemogenesis is not known. Here we report absence (or weak) MICA and MICB expression in peripheral B cells harvested from healthy subjects or from patients suffering from chronic lymphocytic leukemia (CLL), at the transcript, as well as membrane-bound and secreted protein levels. However, an *ex vivo* stimulation of control and CLL B cells concomitantly induced cellular proliferation and MICA expression. Using a panel of inhibitors blocking downstream components of the B-cell receptor signaling pathways, we further strengthen this link between MICA's expression and B cells proliferation. Finally, we provide evidence suggesting that MICA expression in proliferating B cells might be independent from replication-induced DNA damage, as opposed to what is observed in solid tumors. These data also revealed that the cellular pathways leading to MICA expression are conserved in CLL B cells and could be exploited for therapeutic purposes.

Introduction

The immune system protects the organism's integrity through its recognition and destruction of foreign (infection) and modified self-antigens (tumor). In tumors, accumulation of oncogenic events, allow some malignant cells to eventually escape the immune surveillance and to further proliferate without any restriction [1] [2]. One of the key axis of this anti-tumoral immunity relies on the natural killer group 2 member D receptor (NKG2D) recognition of a diverse set of MHC class I-like ligands (NKG2DL) [3]. The first NKG2DL was described by us, nearly a quarter century ago [4, 5] These are the *major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related genes A and B (MICA and MICB)* [4], encoded within the MHC/HLA region on the short arm of the 6th chromosome pair in man. Other NKG2DL have been identified since, i.e. the UL16 binding proteins (also known as retinoic acid early transcripts 1 (RAET1) [6, 7], in both mouse and man as well as MULT1 and H60 [8] in mouse [5]. When expressed at the cell surface, these ligands are recognized by NKG2D-bearing NK, $\gamma\delta$ and CD8⁺ $\alpha\beta$ T lymphocytes [9]. The ability of these cytotoxic cells to recognize and to eliminate NKG2DL-bearing tumor cells has been demonstrated in murine models [10] and this cytotoxic activity has been correlated with the density of cell surface NKG2DL [11, 12].

Although expressed at transcript levels in nearly all tissues (except those of the central nervous system) [13], NKG2DL do not reach the cell membrane in a majority of cells at the steady state [14, 15]. This surface expression is however believed to be specifically induced after cell stress e.g. infection or tumourisation [16]. NKG2DL expression has been extensively reported in various types of solid tumor e.g. epithelioma, melanoma, colorectal cancer, glioma, ovarian and pulmonary cancers and head and neck squamous cell carcinoma [17] [13]. In some studies, the intensity of NKG2DL expression correlates with a better clinical prognosis (Nicholas, int J Cancer 2006).

In hematological malignancies, various levels of NKG2DL expression have been reported in different lymphoproliferative disorders e.g. absence of expression in T-cell lymphomas [18], weak or no expression in CLL [19, 20] or yet variable expression levels in multiple myeloma (MM) [12, 21]. Moreover, a remarkable inter-patient variability has been reported within specific hemopathies (Nucckel and coll. reported

42

2

that 20% of CLL patients show a weak MICA's membrane expression (MFI ratio < 2-3) [19]) and between patients at different stages of malignant evolution e.g. those carrying a gammopathy of undetermined significance (MGUS) and MM [12, 20]. The significance of these results is further complicated by absence of correlation between MICA transcripts and cell surface protein [22].

The mechanisms of NKG2DL expression have been widely studied in solid tumor cells [23], and the persistence of their expression when cells are submitted to chronic DNA damages has been shown [24]. The DNA damages involved in oncogenic process are suspected to be the main trigger of their expression in transformed cells. In murine models, NKG2DL's expression has been documented after experimental induction of DNA damage of chemical, physical or oncogenic origin involving the ATM/ATR pathway [25]. In a E μ -cMyc mouse model of Burkitt-like lymphoblastic lymphoma, NKG2DL expression has been shown in a fraction of the lymphoma cells. Further analysis of this intra-clonal heterogeneity revealed that the NKG2DL expressing cells were the only ones showing phosphorylated H2AX proteins, witness of DNA damages, reinforcing the link between genotoxic stress and these ligands [26]. Moreover, it has been shown that NKG2DL RAE1 activation is coupled with cell cycle entry [27] and that a cell activation *in vitro* can also induce NKG2DL through NF κ B signaling [28], a pathway known to be over expressed in lymphoid malignancies [29]. The understanding of NKG2DL expression is further complicated by its transient cell-surface expression. Indeed, an enzymatic membrane shedding has been described [30], promoted by a short transmembrane tail described in some MICA polymorphisms. Soluble form of NKG2DL MICA has been found in sera of cancerous patients [21, 31] or those suffering from autoimmune diseases [32] and this molecular mechanism could explain, in part, the cancerous cell escape from immunity during oncogenic progression.

NKG2DLs are critical factors in anti-tumoral immunity, but their expression has not yet been systematically studied in hematologic malignancies. In lymphoproliferative disorder for instance, no precise mechanism for their expression has been described. We focus here on chronic lymphoproliferative malignancies, the most frequent and still incurable leukemia in adults. In these leukemias, the lymphocyte proliferation is believed to be induced by a chronic antigenic stimulation *in vivo* [33, 34]. We previously studied the genetic [35, 36] and the proteomic programs [37] induced by

52

2

the B-cell receptor (BCR) activation in these leukemic B-cells. Here, reproducing a chronic antigenic stimulation in these B cells *ex vivo*, we show a specific activation of MICA expression on these cells. The analysis of its temporal mechanism of expression shows that MICA expression in lymphoproliferative conditions is correlated to the proliferation activation and is independent from DNA damage pathways.

Results

MICA is not expressed in healthy or malignant circulating lymphocytes.

To analyze the expression of MICA/B in chronic lymphoproliferative disorders, we first quantified *MICA/B* transcripts in peripheral leukemic B cells isolated from untreated patients suffering from CLL, as well as total and naïve B cells isolated from healthy donors. The lymphoblastic cell line C1R stably transfected with *MICA*, *MICB* or mock transfected served as positive and negative controls. While *MICA* transcripts were undetectable in healthy or tumorous B cells (Figure 1A), only a weak expression of *MICB* was observed in healthy B-Cells (Figure 1B). At the protein level, immunoblot analysis (Figure 1C) showed the lack of MICA expression in B cells harvested from healthy donors (Ctl 1-3) or in tumorous B cells from CLL patients (P1-3). HEK293 cells transfected with *MICA*009* are shown as positive controls. This observation was confirmed by analysis of cell surface expression of MICA/B by flow cytometry with specific NKG2D ligands antibodies (Figure 1D). In addition, this experiment also indicated the absence of MICA/B from B cells harvested from patients suffering from autoimmune diseases (i.e. rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis or primary Sjögren's syndrome) or from T cells isolated from healthy donors.

Early loss of MICA expression in leukemogenesis

To follow MICA expression during the leukemogenic process, we quantified its cell surface expression by flow cytometry expression in a lymphoid malignancy where tumourisation stages are well characterized. We focused on plasma cells

transformation, where a pre-cancerous stage (monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS) is individualized from the frank cancerous stage (multiple myeloma; MM) according to the percentage and cytological dystrophy of plasmocytes in the bone marrow and the presence of organs failure [38]. Furthermore, in this malignancy, flow cytometry of bone marrow samples allows the identification of plasmocytes exhibiting pathological transformation according to CD56 membrane expression [39]. Interestingly, we detected low MICA surface expression on plasmocytes from control non-cancerous subjects (n=11), a lower expression in pre-cancerous CD56⁺ MGUS plasmocytes (n=12) and an absence in plasma cells from MM patients (n=4) (Figure 2 and Suppl. Figure S1).

Activation of lymphocyte proliferation induces MICA cell surface expression

In mature lymphoproliferative malignancies such as CLL, a chronic antigenic activation induces lymphocyte proliferation at the earliest stages of leukemogenesis [33, 34]. MICA is known to be expressed at the cell surface after genotoxic stress and DNA-damage [25] and its expression has been reported after cell activation [28]. However, the precise effect of cell proliferation activation on its expression is not known.

To investigate this possible link, we used an *in vitro* stimulation of the BCR with an anti-IgM in association with CD40-ligand and T-cell derived cytokines (IL-4 and IL-21) in order to induce cell proliferation of total and naïve B-cells isolated from healthy donors and leukemic B cells isolated from CLL patients. Maximal cell proliferation is observed in these samples after CFSE staining at 72h (day 3, D3) after cell activation (S, Stimulated) for total and naïve healthy B-cells and at day 6 (D6) for leukemic CLL B-cells (Supplemental Figure 2A and B). For these time points, cell proliferation was quantified in parallel with the percentage of MICA-expressing cells, measured by flow cytometry (Supplemental Figure 2C), for total and naïve healthy B cells and for CLL B cells. We confirmed the simultaneous absence of cell proliferation (Figure 3A) and MICA membrane expression (Figure 3B) before stimulation (unstimulated, US). Next, we observed that B cell stimulation induces concomitant cell proliferation and MICA expression. The percentage of MICA expressing cells vary between 33-62 % (median 50 %) in total healthy B-cells (n=10), 18-88 % (median 47 %) for naïve B-cells (n=9) and 33-85% (median 47 %) for CLL B-cells (n=5). This result differs with that of HLA-ABC whose expression appears unmodified in the same conditions

72

2

(Supplemental Figure 3). Grouping the data obtained for both healthy and tumorous B cells, we showed that the percentage of MICA expressing cells is correlated with that of proliferating cells (Figure 3C, $r=0.61$, $p=0.0016$). We completed this study of MICA in relation to BCR-mediated activation by performing a time-course analysis (for up to 6 days) of its expression in healthy total ($n=3$) and naïve B cells ($n=3$) as well as CLL B cells ($n=3$). As mentioned above, we observed significant cellular proliferation following in vitro stimulation at days 3 for B cells harvested from healthy donors and at day 6 in the case of CLL B-cells (Supplemental Figure S2B). In the same samples, quantification of *MICA* transcripts by RT-qPCR indicated that *MICA* mRNA are detectable 3 to 6h after stimulation of healthy and CLL B cells, with a peak at 24h for control B cells and at 96h for CLL B cells (Figure 4A). Cell surface MICA protein detectable by flow cytometry appears 24 h after stimulation of control (healthy) cells, with a maximum at 72h for total cells and at 48h for naïve B cells. Delayed cells surface expression, which starts at 48h and peaks at 48-96h, can be seen in stimulated CLL B cells (Figure 4B). MICA detection by Western blot supported this observation (Suppl. FigureS4). Of note, a secreted soluble form of MICA (sMICA) is detected by ELISA in the culture medium 48 to 72 hours after cell stimulation (Figure 4C), simultaneously with the loss of membrane-bound expression (Figure 4D).

The signaling pathways inducing cell proliferation are also responsible for MICA expression.

To gain more insights on the signaling pathways leading to MICA expression following B cells stimulation, we used a pharmacological approach using various inhibitors. We observed significantly reduced cell proliferation and MICA cell surface expression when stimulated B cells (either from control donors or from CLL patients) were incubated with R406 and Idelalisib (ID), respectively SYK and AKT inhibitors blocking the BCR signaling pathway at a proximal level (Figure 5 A, B). The involvement of this pathway was also evidenced by the inhibitory effect on B cells proliferation and MICA expression of BAY 11-7082, which targets I κ B, a more distal component. Furthermore, we showed that the MAP kinase ERK (inhibited by selumetinib, SEL) also participates in both proliferation and MICA induction. Moreover, cell activation without IL4 (S-IL-4) or with a JAK3 inhibitors (PF-956980) also revealed a role of a STAT6-dependant pathway on proliferation and MICA

82

□

expression. These results also confirmed a strong correlation between proliferation and MICA expression in healthy B-cells ($r=.93$, $p=0.0001$) and leukemic CLL B-cells ($r=.90$; $p=0.004$) (Figure 5 C, D).

Altogether, these results suggest that signaling pathways responsible for the proliferation of B cells also participate in *MICA* expression. In line with this result, binding sites for the BCR transcriptional factors AP1, NF- κ B and STATs were identified by a computational analysis in the promoter region of the *MICA* gene (Suppl. FigureS5).

In proliferative conditions, MICA expression is independent from DNA damage pathways.

DNA damage/repair pathways are physiologically activated during cell proliferation and activation of DNA replication mechanisms [40]. Because these pathways have been reported to activate MICA expression [25], we monitored the accumulation of DNA lesions in our biological model and evaluated their potential impact on the proliferation-dependent induction of MICA. For this, healthy (Ctl 1 and 2) and leukemic CLL B cells (harvested from patients P1-3) were activated *in vitro* and we analyzed H2Ax phosphorylation on Ser 139 by immunoblot after cell activation. As expected, phosphorylated H2Ax (pH2Ax) appeared at the beginning of cell proliferation at day 3 in total healthy B cells and at day 4 in CLL B cells (Figure 6A). Quantification of the pH2Ax signal normalized to that of GAPDH revealed a time-dependent accumulation of DNA damage induced by double-stranded breaks until day 6 (Figure 6B). Interestingly, comparing these results with those showing MICA quantification both at the RNA transcripts and cell surface expression levels (Figure 4) indicates that MICA mRNA and protein appear before the proliferation-induced DNA damages.

In line with these results, we have induced a proliferative response in CLL cells from two patients showing a deletion of the short arm of chromosome 17 and a pathogenic (non-functional) missense mutation of TP53 on the other allele. Interestingly, albeit this complete loss of TP53, these CLL B-cells showed an *ex vivo* proliferation (63% and 33% of divided cells respectively) and a cell surface expression of MICA at day 3 after stimulation (Fig. 6C). Altogether, these observations suggest that in stimulated B cells, MICA expression is not induced by DNA damage and is rather the

consequence of others, yet to be determined, molecular events caused by the induction of proliferation.

Discussion

The role of the NKG2DL MICA is well established in anti-tumoral immunity against solid cancer cells in which its expression is induced by DNA damage [25]. However, this is not the case in hematological malignant cells in which absence or weak expression of NKG2D ligands has been reported [19, 20]. Here, we confirmed the lack of MICA/B mRNA and protein expression in circulating CLL B-cells. No cell-surface expression was either found on control lymphocytes from healthy donors (including naïve, total B-cells and CD4 T-cells), as previously reported [14, 19, 20, 22]. The cell surface absence shown here with anti-MICA/B antibody (R&D clone 159207) was confirmed with other anti-MICA/B antibodies (R&D clone 159227 or BD clone 6D4). Such absence of NKG2D ligands expression on tumoral cells raised questions with regards to their possible role in anti-leukemic immunity.

To gain more insights into potential role of NKG2D ligands in hematological malignancies, we analyzed MICA A/B expression in a model of oncogenic B cells transformation, i.e during the evolution of pre-tumoral MGUS and tumoral MM plasma cells in the bone marrow. Variable NKG2DL expression in MGUS or MM patients has been reported, but these analyses have been performed on immortalized plasma cells or upon particular experimental conditions (e.g. following IL-6 activation) known to affect NKG2DL expression [11, 12, 21]. Moreover, these studies evaluated MICA expression in total bone marrow plasmocytes (CD38+/CD138+), and therefore, MICA/B precise cellular expression on pre-tumoral/tumoral plasmocytes is not known. In this study, we analyzed MICA expression in primary plasma cells freshly isolated from healthy donors, MGUS and MM patients, and we measured MICA/B cell surface expression on plasma cells (CD56 +) using flow cytometry. Of interest, we observed MICA expression on healthy plasma cells, a feature which has not been noticed so far. More importantly, our analysis of MICA/B expression on plasma cells of MGUS and MM patients showed a significant decrease of MICA expression during tumoral evolution. These results

10

?

provide the first demonstration of MICA expression at early stages of lymphoid transformation and further decrease during the oncogenic evolution. This observation is likely correlated with increased expression of soluble MICA in the serum of Multiple Myeloma (MM) patients [31].

We then performed experiments aiming at a better characterization of MICA expression during the early stages of leukemogenesis. Several papers have already described the role of DNA damages, generated during the oncogenic process, on NKG2DL expression. Furthermore, ex vivo activation of healthy T-cells has been shown to induce MICA expression [28]. More recently, cell proliferation-induced ULBP expression was also reported [27]. However, in the case of lymphoproliferative malignancies such as CLL in which a chronic antigenic stimulation is the major trigger of leukemogenesis, MICA expression has not yet been considered in this process. Thus, we first analyzed the correlation between lymphocyte proliferation and MICA expression. For this we developed an ex vivo model in which a BCR-mediated B cells stimulation leads to a proliferative response. Using this model, we showed that stimulation of primary healthy and leukemic B-cells induces MICA transcription, cell surface expression and excretion of a MICA soluble form. Interestingly, the level of membrane-bound MICA expression appeared correlated to the intensity of cell proliferation. This observation, together with rapid and transient MICA-induced expression suggests the transcriptional response to cell stimulation could potentially be switched off following the reduction or disappearance of the proliferation-inducing signal. These findings could explain the concordance between limited in vivo proliferation of circulating CLL B-cells, which are mostly arrested at G0/G1 [34] and undetectable MICA cell surface expression. In addition, our results also show that ex vivo proliferative stimulation of healthy B cells induced similar, albeit delayed, responses to those observed in CLL B-cells. While the mechanisms of this delay remains to be investigated, this observation is of particular interest because several drugs are known to activate MICA expression, notably HDAC inhibitors (e.g. valproic acid and trichostatin) [41, 42] and proteasome inhibitors (bortezomib) [21, 43].

Finally, this study provides evidence suggesting that the BCR signaling pathways which are responsible for the CLL B-cells proliferation are also involved in the control of MICA expression. Using various inhibitors, we first confirmed the role of the NF-kappaB [28]. In addition, our work revealed an important role of MAP kinase/ ERK and STAT/AKT pathways in MICA expression. Our data indicating the absence of a

11

□

specific MICA activation pathway are reinforced by a bioinformatics analysis of the MICA promoter region which revealed the presence of several binding sites for transcription factors activated downstream of the BCR. Notably, these signaling pathways are shared with other cell surface receptors and have been implicated in MICA expression after proliferative stimulation of other cell types, e.g. vascular endothelial cells [44].

Altogether, this study demonstrates that the pathways activating the cellular proliferation concomitantly induce MICA expression. This mechanism likely provides protective functions through the involvement of effector immune cells carrying cytotoxic activities, as previously suspected [45]. Such MICA response to a proliferative signal can also be suspected as an important anti-leukemic process whose mechanisms require additional investigations to be exploited for future potential therapeutic purposes.

Materials and methods

Subjects and B cell isolation

Peripheral lymphocytes were obtained from untreated patients diagnosed with CLL and from buffy coats from healthy blood donors (Etablissement Français du Sang Grand Est, Strasbourg, France). CLL B cells were negatively selected from fresh blood samples using Rosettesep B-cell enrichment cocktail (StemCell Technologies, Grenoble, France) after density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Life sciences, Velizy-Villacoublay, France). For healthy donors, total B cells, naïve B cells or naïve CD4⁺ T cells were isolated from PBMCs using a negative selection kit (Human naïve B cell isolation kit, Human B cell isolation kit, Human naïve CD4⁺ T cell isolation kit, Stemcell Technologies, Grenoble, France) after density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Life sciences, Velizy-Villacoublay, France). B cells from patients with autoimmune diseases were isolated from PBMCs using a negative selection kit (Human B cell isolation kit, Stemcell Technologies, Grenoble, France) after isolation of blood mononuclear cells by Ficoll centrifugation. The cell purity - >95% - was controlled by flow cytometry using the following markers : CD19⁺, CD19⁺/CD27⁻, CD19⁺/CD5⁺. C1R transfected

12

□

with *MICA*009*, *MICB*005* or mocked transfected was a gift from Dr Salio; Oxford University, UK. All human subjects gave written informed consent to the study which was approved by the institutional review board of the Strasbourg University Hospital.

Stimulation and reagents

Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 U/ml, all from Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at 37°C in an atmosphere supplemented with 5% CO₂. B cells at a density of 10⁶ cells/ml were stimulated with 10 µg/ml of anti-IgM (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), 100 ng/ml of CD40L (Enzo, Villeurbanne, France), 10 ng/ml of IL-4 (R&D Systems-Bio-Techne, Lille, France) and 25 ng/ml of IL-21 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Signalling inhibitors targeting BTK (R406), AKT (idelalisib), ERK (selumetinib – AZD6244), IκB (BAY11-7082) and JAK3 (PF-956980) were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). The following monoclonal antibodies (mAbs) were validated on C1R cells transfected with *MICA*009*, *MICB*005* or mocked transfected and used for immunostaining: conjugated anti-human MICA antibody clone 159227 (R&D Systems-Bio-Techne, Lille, France), conjugated anti-human MICA/B antibody clone 159207 (R&D Systems-Bio-Techne, Lille, France), unconjugated anti-human MICA antibody clone 159209 (a gift from Dr Houchins; R&D Systems, Lille, France). Before acquisition, Propidium Iodide (PI) was added to stain for dead cells. Flow cytometry analysis was performed with BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD, Le Pont de Claix, France).

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using RNeasy[®] Mini kit (Qiagen, Courtabeuf, France) and reverse transcribed using random primers and ImProm-HI[™] Reverse Transcriptase (Promega, Charbonnières-les-bains, France). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using TaqMan Gene Expression Assays (Human gene Hs00741286_m1 *MICA*, Hs00792952_m1 *MICB* and Hs00939627_m1 *GUSB*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Melting-curve analysis was performed to assess the specificity of PCR products. After an initial incubation at 95°C for 10min, 45 rounds of amplifications (15s at 95°C, 60 s at 60°C) were performed in a LightCycler[®] 480 (Roche, Meylan, France). *MICA* or *MICB* gene expression was

normalized to that of *GUSB*. Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle ($\Delta\Delta C_t$) method.

Western blotting

After stimulation, B cells were centrifuged, and the cell pellets suspended for 20 min on ice in a lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl [pH 8], 130 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF and protease inhibitors). Lysates were centrifuged for 10 min at 300 g at 4°C and supernatants were subjected to SDS-PAGE and transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were then blocked using 5% milk in TBS (20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl) for 1h at room temperature. The blots were incubated with anti-phospho-H2Ax (clone JBW301) (Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France) anti-phospho-ERK1/2 (clone E-4, Santa-Cruz, Cliniscience Nanterre, France), anti-phospho-SYK (cell Signaling, St Quentin en Yvelines, France) anti-MICA (clone 159233) (R&D Systems-Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) for 2h at room temperature, anti-phospho-STAT6 (Cell Signaling, St Quentin en Yvelines, France), anti-phospho-AKT (clone D25E6), anti-phospho-IkB (clone 5A5) (Cell Signaling, St Quentin en Yvelines, France) overnight at 4°C, followed by incubation with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG mAbs or anti-Rabbit IgG mAbs (1 h at 25°C) and detection by ECL (ECL Plus Western blotting Detection Reagents, Amersham, Courtaboeuf, France) or SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate (Pierce, Brebières, France) according to the manufacturers' instructions. For loading control, membranes were incubated with anti-GAPDH (clone 6C5, Merck Millipore, Fontenay sous bois, France). The signal was visualized by chemiluminescence and processed by the ImageLab software (BioRad, France). The relative intensity of the bands was measured and calculated using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-based proliferation assays

Freshly isolated B cells were labeled with 0.5 μ M CFSE (Invitrogen) and incubated for 10 min at 37°C in the dark. Washed CFSE-labeled cells were stimulated and cultured at 37°C / 5% CO₂. Three or six days later, B cells proliferation was evidenced by a cell division-dependent decrease in CFSE staining intensity as evaluated by flow cytometry.

14

□

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a one-tailed non parametric paired t test to compare two paired groups. Pearson's or Spearman's correlations were performed where appropriate. All statistical analyses were performed with GraphPad 5.0 software. A p value of <0.05 was considered statistically significant. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Acknowledgments

We thank Dr Houchins for gift of anti-MICA mAb clone 159209 and Dr Salio; Oxford University, UK for gift of C1R cell lines. This work is published under the framework of the LABEX TRANSPLANEX [ANR-11-LABX-0070_TRANSPLANTEX] which benefits from funding from the French government; funds managed by the French National Research Agency (ANR) as part of the « Investments for the future » program and the INSERM UMR_S1109 (to SB). LV is supported by the ITMO-cancer initiative for system biology within the framework plan cancer 2009-2013, IDEX-CNRS, the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC) and Alsace Cancer association. SB is further supported by the Institut Universitaire de France (IUF), the Ligue contre le Cancer, the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS) and the EU-funded (ERDF) INTERREG V project n°3.2 TRIDIAG

Authorship

WI, CS, GA, OT, LV performed biological experiments. LF, RH, LM provided patient samples and discussed results. FB, MMB supervised statistical analysis. RC discussed results. PG, SB wrote the manuscript. LV design and supervised the study, wrote the manuscript.

Conflict-of-interest Disclosure

The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

15

2

References:

- 1 Schreiber, R.D., Old, L.J. and Smyth, M.J., Cancer immunoeediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011. **331**: 1565-1570.
- 2 Dunn, G.P., Old, L.J. and Schreiber, R.D., The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity* 2004. **21**: 137-148.
- 3 Raulet, D.H., Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003. **3**: 781-790.
- 4 Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D.E. and Spies, T., A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class II genes. *PNAS* 1994. **91**: 6259-6263.
- 5 Carapito, R. and Bahram, S., Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev* 2015. **267**: 88-116.
- 6 Radosavljevic, M., Cuillerier, B., Wilson, M., Clement, D., Wicker, S., Gilfillan, S., Beck, S., Trowsdale, J. and Bahram, S., A cluster of ten novel MHC class II related genes on human chromosome 2q24.2-q25.3. *Genomics* 2002. **79**: 114-123.
- 7 Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. and Chalupny, N., ULBPs, novel MHC class II-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001. **14**: 123-133.
- 8 Malarkannan, S., Shih, P.P., Eden, P.A., Horng, T., Zuberi, A.R., Christianson, G., Roopenian, D. and Shastri, N., The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *Immuno* 1998. **61**: 3501-3509.
- 9 Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahon, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R. and Raulet, D.H., The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 2002. **17**: 19-29.
- 10 Wiemann, K., Mittrucker, H.W., Feger, U., Welte, S.A., Yokoyama, W.M., Spies, T., Rammensee, H.G. and Steinle, A., Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *Immunol* 2005. **175**: 720-729.
- 11 Carbone, E., Neri, P., Mesuraca, M., Fulciniti, M.T., Otsuki, T., Pende, D., Groh, V., Spies, T., Pollio, G., Cosman, D., Catalano, L., Tassone, P., Rotoli, B. and Venuta, S., HLA class II, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood* 2005. **105**: 251-258.
- 12 Girlanda, S., Fortis, C., Belloni, D., Ferrero, E., Ticozzi, P., Sciorati, C., Tresoldi, M., Vicari, A., Spies, T., Groh, V., Caligaris-Cappio, F. and Ferrarini, M., MICA expressed by multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance plasma cells costimulates Pamidronate-activated gamma delta lymphocytes. *Cancer Res* 2005. **65**: 7502-7508.
- 13 Schrambach, S., Ardizzone, M., Leymarie, V., Sibia, J. and Bahram, S., In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS One* 2007. **2**: e518.
- 14 Eagle, R.A., Jafferji, I. and Barrow, A.D., Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression in Healthy Cells. *Curr Immunol Rev* 2009. **5**: 22-34.

- 15 Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M. and Spies, T., Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class II gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996. **93**: 12445-12450.
- 16 Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N. and Raulet, D.H., Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000. **1**: 119-126.
- 17 Butler, D.E., Moore, M.B., Presnell, S.R., Chan, H.W., Chalupny, N.D. and Lutz, C.T., Proteasome regulation of ULBP1 transcription. *Immuno* 2009. **182**: 6600-6609.
- 18 Dulphy, N., Berrou, J., Campillo, J.A., Bagot, M., Bensussan, A. and Toubert, A., NKG2D ligands expression and NKG2D-mediated NK activity in Sezary patients. *Invest Dermatol* 2009. **129**: 359-364.
- 19 Nuckel, H., Switala, M., Sellmann, L., Horn, P.A., Durig, J., Duhrsen, J., Kupperts, R., Grosse-Wilde, H. and Rebmann, M., The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010. **24**: 1152-1159.
- 20 Salih, H.R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S.Z., Kanz, L., Rammensee, H.G. and Steinle, A., Functional expression and release of ligands of the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003. **102**: 1389-1396.
- 21 Jinushi, M., Vanneman, M., Munshi, N.C., Tai, Y.T., Prabhala, R.H., Ritz, J., Neubergh, D., Anderson, K.C., Carrasco, D.R. and Dranoff, G., MHC class II chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *PNAS* 2008. **105**: 1285-1290.
- 22 Nowbakht, P., Ionescu, M.C., Rohner, A., Kalberer, C.P., Rossy, E., Mori, L., Cosman, D., De Libero, G. and Wodnar-Filipowicz, A., Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* 2005. **105**: 3615-3622.
- 23 Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E. and Hayday, A.C., Regulation of cutaneous malignancy by gamma delta T cells. *Science* 2001. **294**: 605-609.
- 24 DiTullio, R.A., Jr., Mochan, T.A., Venere, M., Bartkova, J., Sehested, M., Bartek, J. and Halazonetis, T.D., 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol* 2002. **4**: 998-1002.
- 25 Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J. and Raulet, D.H., The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005. **436**: 1186-1190.
- 26 Unni, A.M., Bondar, T. and Medzhitov, R., Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance. *PNAS* 2008. **105**: 1686-1691.
- 27 Jung, H., Hsiung, B., Pestal, K., Procyk, E. and Raulet, D.H., RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *Exp Med* 2012. **209**: 2409-2422.
- 28 Molinero, L.L., Fuertes, M.B., Girart, M.V., Fainboim, L., Rabinovich, G.A., Costas, M.A. and Zwirner, N.W., NF-kappaB regulates expression of the MHC class II chain A gene in activated T lymphocytes. *Immuno* 2004. **173**: 583-5590.
- 29 Staudt, L.M., Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010. **2**: 000109.

- 30 Kaiser, B.K., Vim, D., Chow, D.T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H.H., Strong, R.K., Groh, V. and Spies, T., Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 2007. **447**:482-486.
- 31 Rebmann, V., Schutt, P., Brandhorst, D., Opalka, B., Moritz, T., Nowrousian, M.R. and Grosse-Wilde, H., Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clin Immunol* 2007. **123**:114-120.
- 32 Carapito, R., Gottenberg, J.E., Kotova, I., Untrau, M., Michel, S., Naegely, L., Aouadi, A., Kwemou, M., Paul, N., Pichot, A., Locke, P., Bowman, S.D., Griffiths, B., Sivils, K.L., Sibilila, I., Inoko, H., Micelli-Richard, C., Nocturne, G., Ota, M., Ng, W.F., Mariette, X. and Bahram, S., A new MHC-linked susceptibility locus for primary Sjogren's syndrome: MICA. *Hum Mol Genet* 2017. **26**:2565-2576.
- 33 Stevenson, F.K. and Caligaris-Cappio, F., Chronic lymphocytic leukemia: Revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004. **103**:4389-4395.
- 34 Fabbri, G. and Dalla-Favera, R., The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016. **16**:145-162.
- 35 Vallat, L.D., Park, Y., Li, C. and Gribben, J.G., Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood* 2007. **109**:3989-3997.
- 36 Vallat, L., Kemper, C.A., Jung, N., Maumy-Bertrand, M., Bertrand, F., Meyer, N., Pocheville, A., Fisher, D.W., Brd, Gribben, J.G. and Bahram, S., Reverse-engineering the genetic circuitry of a cancer cell with predicted intervention in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS* 2013. **110**:459-464.
- 37 Perrot, A., Pionneau, C., Nadaud, S., Davi, F., Leblond, V., Jacob, F., Merle-Beral, H., Herbrecht, R., Bene, M.C., Gribben, J.G., Bahram, S. and Vallat, L., A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011. **118**:1-15.
- 38 Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., Blade, R., Merlini, L., Mateos, M.V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., Jagannath, S., Sezer, O., Kristinsson, S.Y., Caers, J., Usmani, S.Z., Lahuerta, J., Johnsen, H.E., Beksac, M., Cavo, M., Goldschmidt, H., Terpos, E., Kyle, R.A., Anderson, K.C., Durie, B.G. and Miguel, J.F., International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014. **15**:538-548.
- 39 Perez-Andres, M., Almeida, J., Martin-Ayuso, M., Moro, M.J., Martin-Nunez, G., Galende, J., Borrego, D., Rodriguez, M.J., Ortega, F., Hernandez, J., Moreno, J., Dominguez, M., Mateo, G., San Miguel, J.F. and Orfao, A., Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia* 2005. **19**:449-455.
- 40 Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C. and Halazonetis, T.D., Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005. **434**:907-913.

- 41 **Diermayr, S., Himmelreich, H., Durovic, B., Mathys-Schneeberger, A., Siegler, U., Langenkamp, U., Hofsteenge, G., Gratwohl, A., Tichelli, A., Paluszewska, M., Wiktor-Jedrzejczak, W., Kalberer, C. P. and Wodnar-Filipowicz, A.,** NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood* 2008. **111**: 1428-1436.
- 42 **Kato, N., Tanaka, D., Sugita, D., Toubai, T., Miura, Y., Iwata, M., Syono, Y., Ota, S., Kondo, T., Asaka, M. and Yamamura, M.,** Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* 2007. **21**: 2103-2108.
- 43 **Vales-Gomez, M., Chisholm, S. E., Cassidy-Cain, R. L., Roda-Navarro, P. and Reyburn, H. T.,** Selective induction of expression of ligand for the NKG2D receptor by proteasome inhibitors. *Cancer Res* 2008. **68**: 1546-1554.
- 44 **Chauveau, A., Tonnerre, P., Pabois, A., Gavlovsky, P. J., Chatelais, M., Coupel, S. and Charreau, B.,** Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. *Innate Immun* 2014. **6**: 89-104.
- 45 **Hoglund, P.,** DNA damage and tumor surveillance: one trigger for two pathways. *Sci STKE* 2006. **2006**: pe2.

Figure legends

Figure 1: MICA is not expressed by healthy or pathological (malignant, autoimmune) circulating lymphocytes. (A) Quantification of *MICA* and **(B)** *MICB* transcripts by RT-qPCR in peripheral B-cells from chronic lymphocytic leukemia patients (Tumoral CLL B cells) and in control total or naïve B cells from healthy donors. *MICA* and *MICB* expression was normalized to that of *GUSB*. Lymphoblastic C1R cells transfected with MICA*009, MICA*005 were used as controls (error bars represent mean with s.e.m.) **(C)** Immunoblot analysis of total MICA/B proteins (revealed with the anti-MICA/B antibody from R&D, clone 159233) in total B cells from healthy donors (Ctl 1-3) or from CLL patients (P1-3). HEK and C1R transfected cells with a vector expressing MICA*009 were used as controls. For loading control, membranes were incubated with anti-GAPDH (clone 6C5) **(D)** Quantification of the percentage of MICA/B expressing cells analyzed by flow cytometry with anti-MICA/B antibody clone 159207.

Figure 2: MICA cell surface expression decreases during the tumoral progression. MICA cell surface expression was analyzed on plasmocytes (CD38+, CD138+) isolated from fresh bone marrow of control non tumoral donors (n=11), from monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) subjects (n=12) and from multiple myeloma (MM) patients (n=5). In these different samples, MICA expression was analyzed separately on pathological plasmocytes (CD38+, CD138+, CD56+) and on the healthy residual fraction (CD38+, CD138+, CD56-). Cell surface expression is expressed as a ratio of MICA mAb (MICA clone 159209) MFI and isotype control MFI on the same sample (Mann-Whitney test, two-tailed, * p<0.05; ** p<0.01).

Figure 3: MICA cell-surface expression is correlated to lymphocyte proliferation. (A) Total (n=10) and naïve B cells (n=9) isolated from healthy donors and tumoral B cells from CLL patients (n=5) were stimulated with a cocktail of anti-hum IgM F(ab)'2, IL-4, CD40L and Il-21. Proliferation was quantified by flow cytometry after cell staining with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and corresponds to the percentage of cells showing a sequential decrease of CFSE

20

?

staining, measured at 72h for healthy total and naïve B-cells and at day 6 for CLL B-cells (Mann-Whitney test, two-tailed, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). **(B)** The percentage of MICA expressing cells was determined by flow cytometry (anti-MICA R&D 159227) at day 3 for total healthy B-cells and CLL B-cells and at 48h for naïve B-cells, when the proliferative rate reaches a maximum (Mann-Whitney test, two-tailed, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). **(C)** Correlation analysis between the percentage of MICA expressing cells and proliferation for all stimulated B cells samples (Spearman's correlation).

Figure 4: CLL B cells exhibit delayed and reduced MICA expression compared control B cells after stimulation. (A) Time course analysis of *MICA* expression by RT-qPCR after total healthy B cells (n=3), naïve B cells (n=3) and CLL B cells (n=3) activation *in vitro*. *MICA* mRNAs were normalized to *GUSB* transcripts. **(B)** MICA cell surface expression was quantified by flow cytometry (anti-MICA R&D clone 159227) in the same conditions as above. **(C)** Quantification of soluble MICA (sMICA expressed in pg/ml in the cell culture medium) by ELISA in the same conditions as above. **(D)** Overlay of the three curves shown above (error bars represent s.e.m.).

Figure 5: The signaling pathways responsible for lymphocyte proliferation are involved in the control of MICA expression. (A) Proliferation (quantified by flow cytometry after CFSE staining) and the percentage of MICA-expressing cells (measured by flow cytometry using the anti-MICA antibody R&D clone 159227) have been measured for B cells from healthy donors (n=7) (paired t-test, error bars represent mean with s.e.m.) and **(B)** B cells from CLL patients (n=4). Experiments were conducted in unstimulated (US) and after *in vitro* activation (stimulated-S). Proliferation was measured at day 3 post-stimulation for control B cells and at day 6 for CLL B cells. Surface MICA expression was measured at day 3 for control and CLL B cells. Similar experiments were performed in the presence of specific inhibitors of BTK (R406), AKT (idelalisib-ID), ERK (selumetinib-SEL), I κ B (BAY11-7082), JAK3 (PF-956980) and with DMSO as control. An activation condition without IL-4 was also tested (S-IL-4). **(C)** Pearson's correlation analysis between proliferation and MICA surface expression in control and **(D)** CLL B cells stimulated in these various conditions. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure 6: Within proliferative conditions, MICA expression is independent from DNA damage pathways. (A) Western blot analysis of phosphorylated H2Ax (pH2Ax) expression in total B cells from healthy donors (Ctl 1-2) and in B cells from CLL patients (P1-2) before (T0) and 1 to 5 days after cell activation. MICA expression was also analyzed in P1-2 samples. GAPDH expression served as loading control. **(B)** Graphical representation of the H2Ax signals obtained by western blot analysis of B cells from 3 healthy donors or from 3 CLL patients before (T0) and 1 to 5 days (D1-5) after stimulation. Signals were quantified with ImageJ and normalized to those for GAPDH (error bars represent mean s.e.m.) **(C)** Flow cytometry results showing CLL cells proliferation after CFSE staining (left) and MICA cell surface expression (isotype vs MICA) in control unstimulated (middle) and stimulated (right) CLL B cells from two patients with TP53 deleted/mutated (P4-5).²

Figure 1

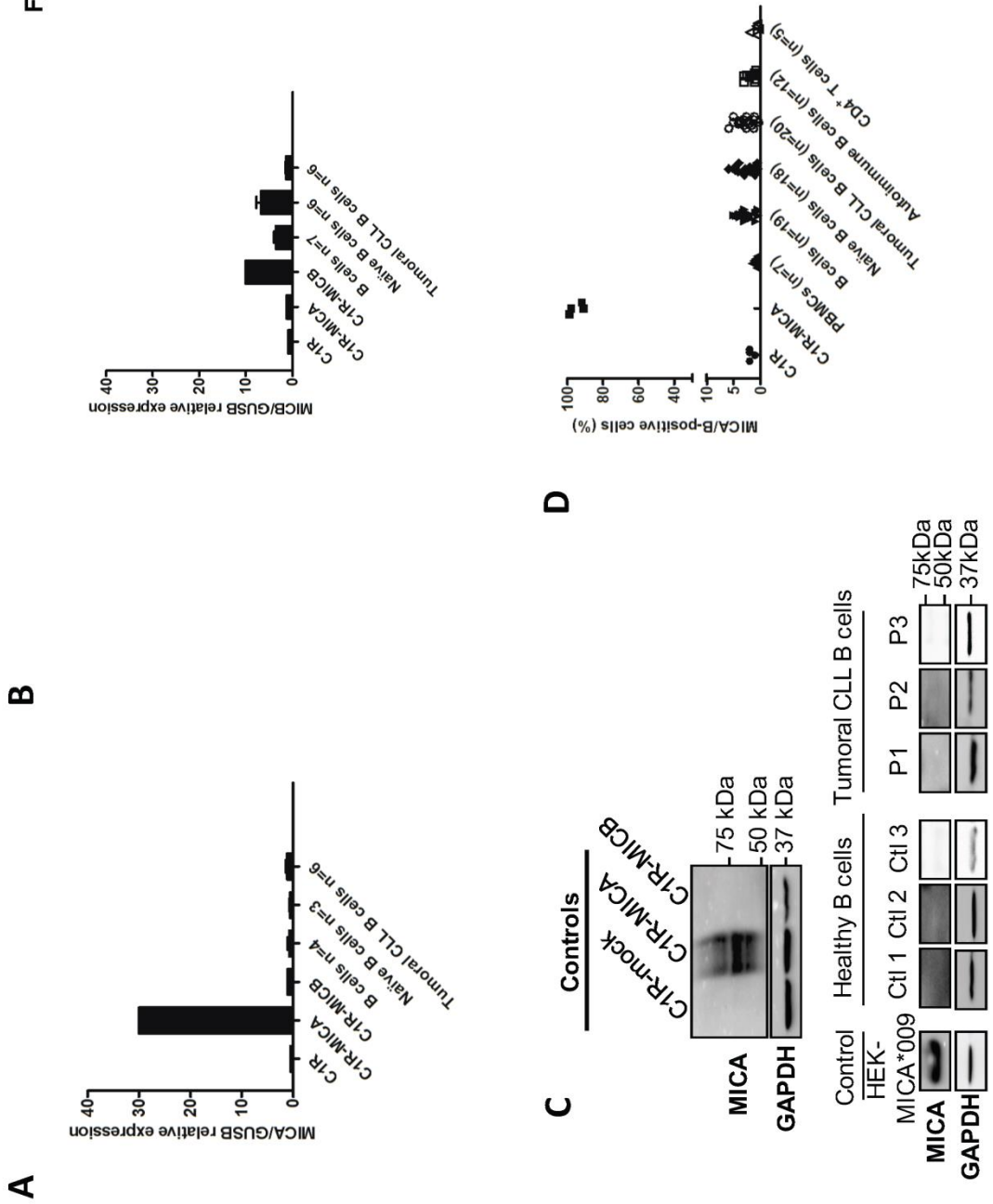


Figure 2

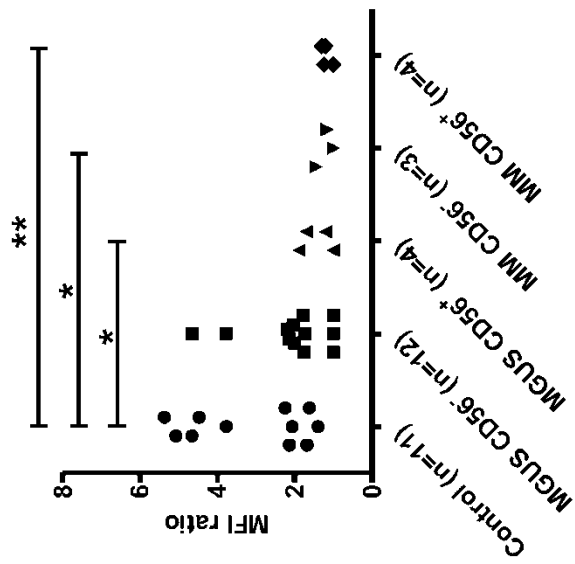


Figure 3

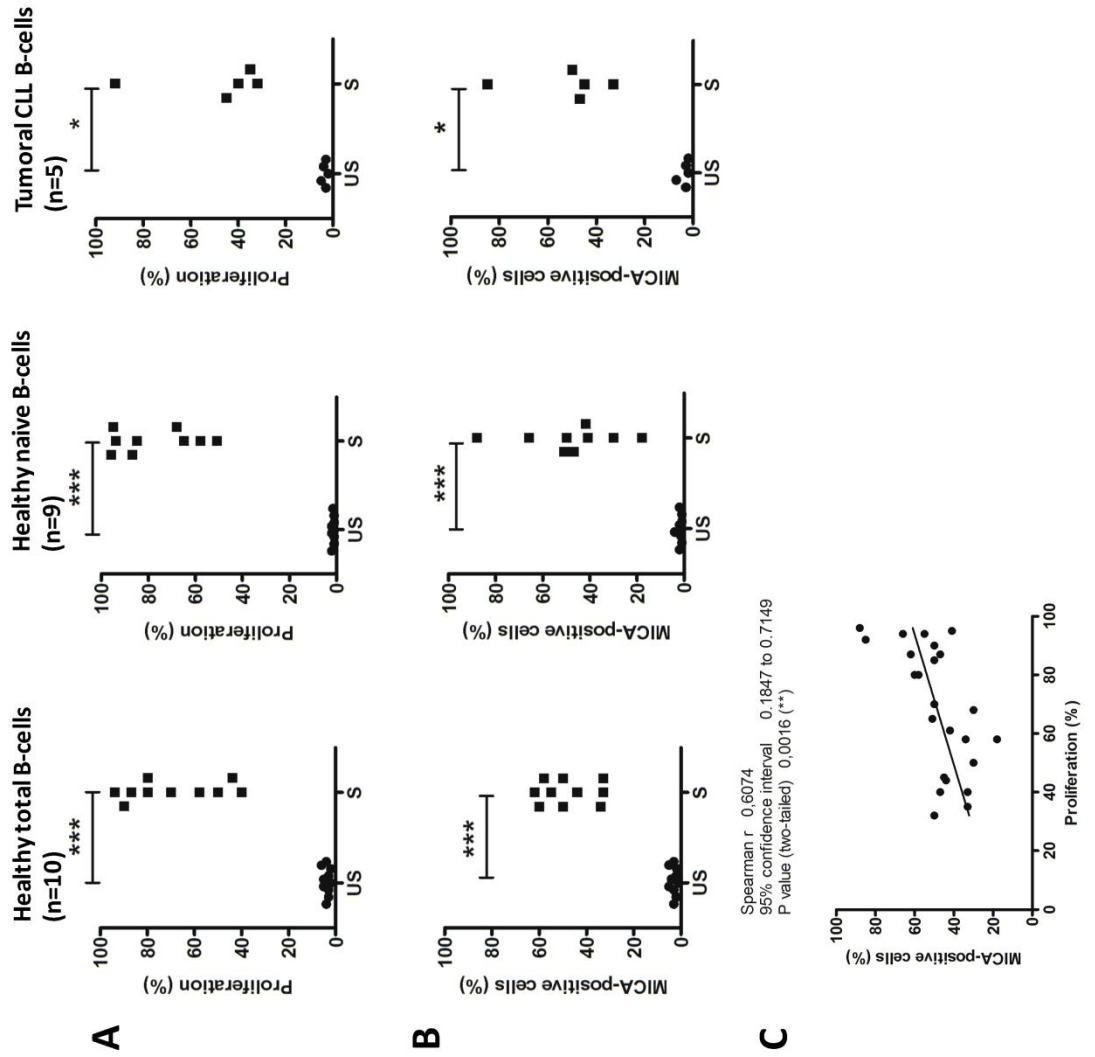


Figure 4

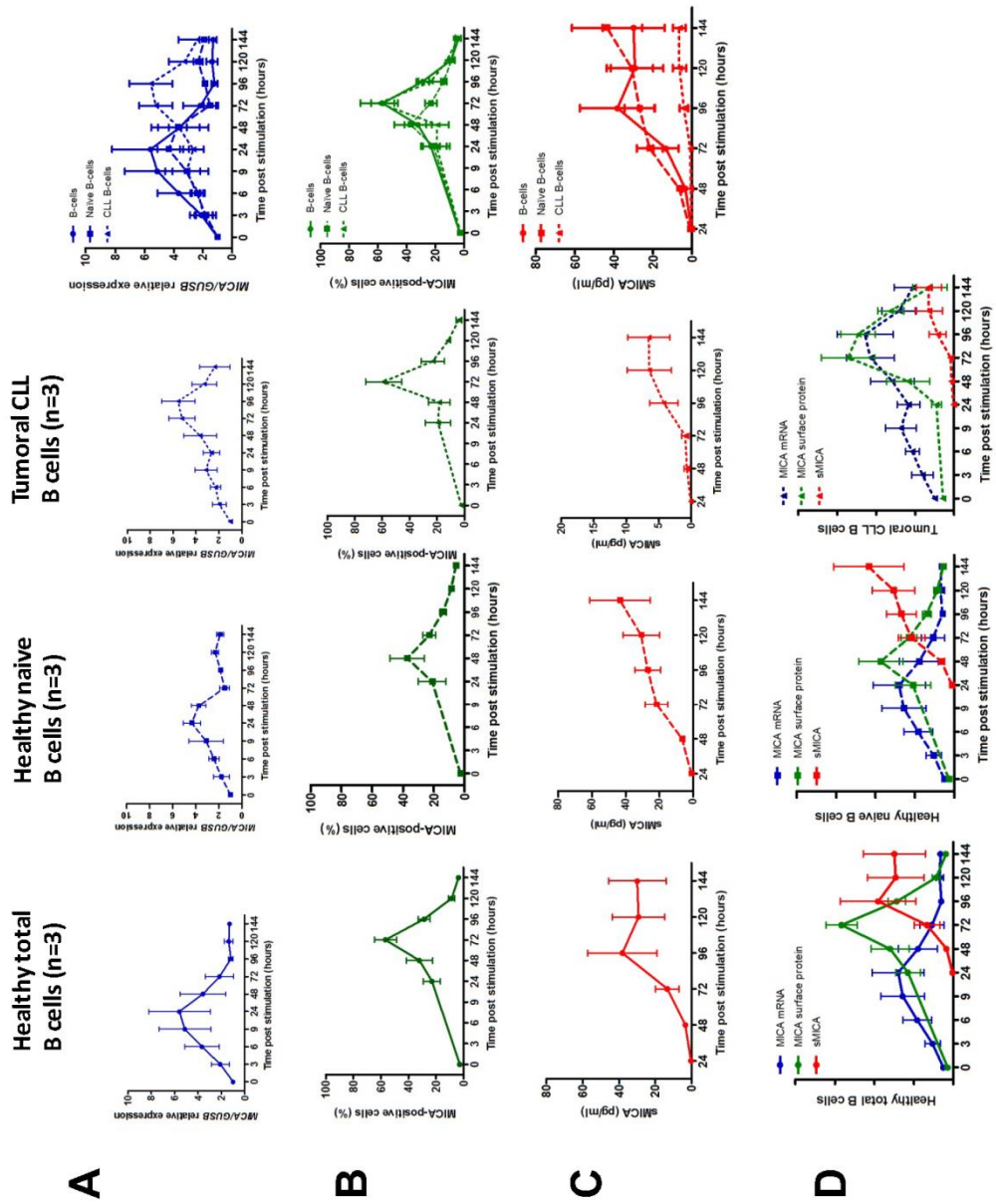


Figure 5

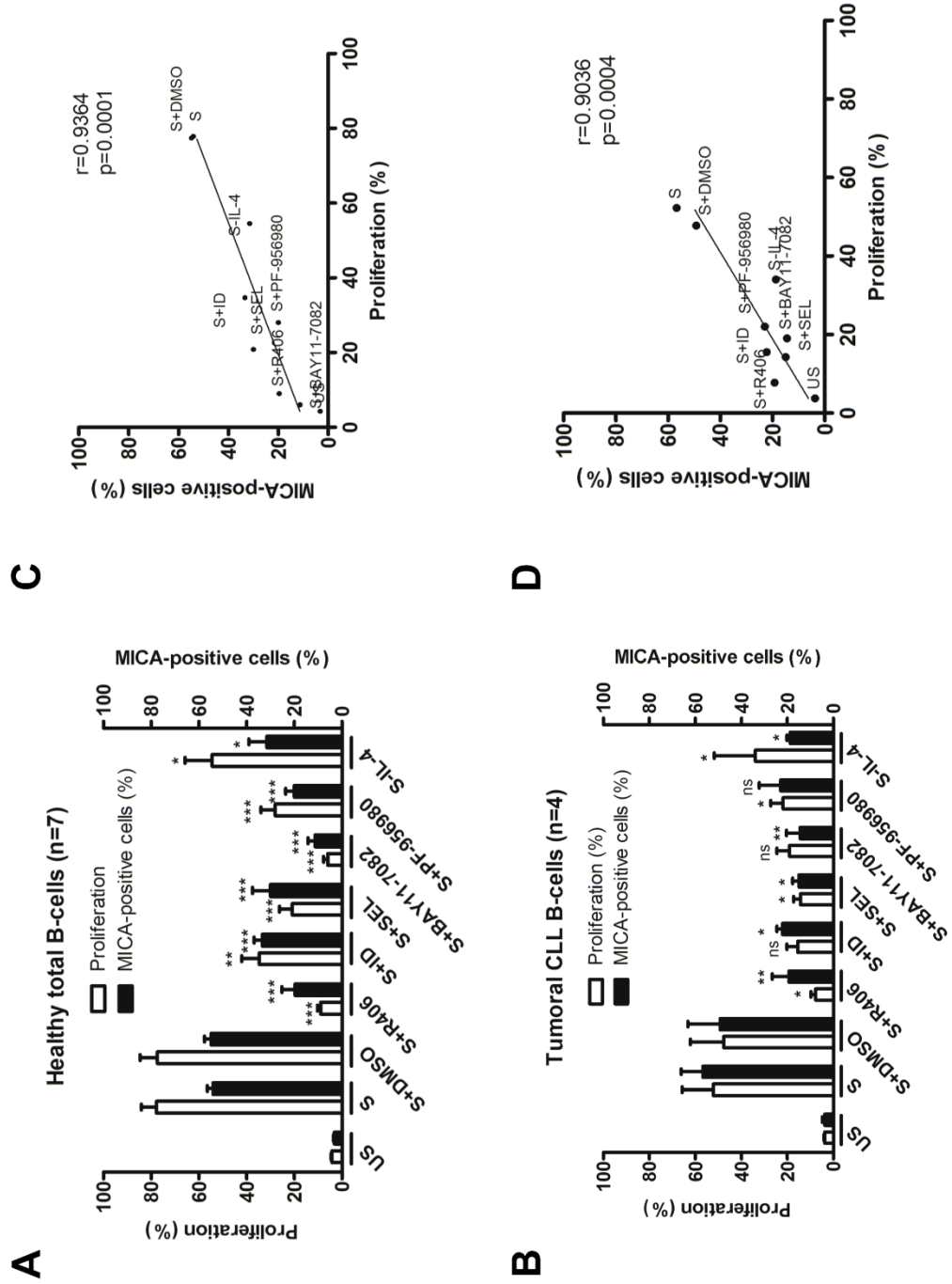
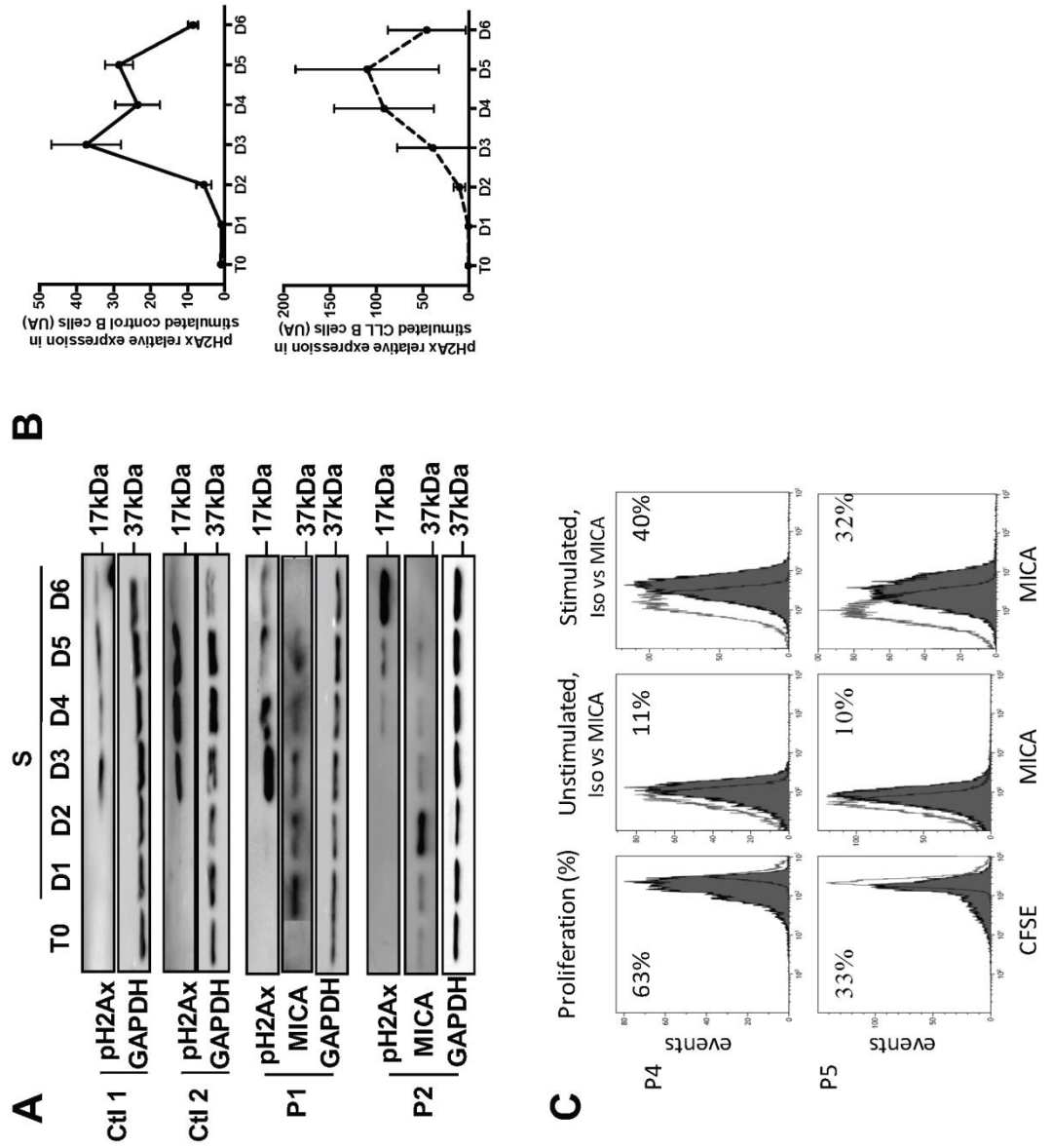


Figure 6



Supplemental Figure Legends

Supplemental Figure 1. MICA is weakly expressed at the cell surface of bone marrow plasmacytes from healthy donors and decreases in MGUS and MM patients. Representative MICA expression analysis by flow cytometry (MICA mAb clone 159209) on bone marrow plasmacytes from a healthy subject (Ctl), 3 patients with pre-cancerous gammopathy of undetermined significance (MGUS) and one multiple myeloma (MM) patient. Plasmacytes were gated as CD38+/CD138+ cells and MICA expression was measured in CD56- (healthy) and CD56+ (cancerous) fractions. MICA expression is calculated by the ratio between the MFI obtained with the anti-MICA mAb and the MFI of the isotype control.

Supplemental Figure 2. Stimulated B lymphocytes from healthy donors or from CLL patients can proliferate and express MICA. (A) Representative flow cytometry results showing B cells proliferation after CFSE staining. The percentage of CFSE^{dim} cells is measured on propidium iodide negative stimulated (S) and control (unstimulated-US) cells 3 days after activation. **(B)** Quantification of the proliferation in total and naïve B cells from 3 healthy donors and B cells isolated from 3 CLL patients. Measures were made in control (unstimulated-US) conditions, or 1 to 5 days (D1-5) after cell stimulation. **(C)** Representative results of MICA cell surface expression by flow cytometry in total B cells from a healthy donor before cell stimulation (T0) and after 3 days (D3) of culture in unstimulated (US) or stimulated (S) conditions. Cells were stained with anti-MICA mAb (R&D 159227) or an isotype control (anti-IgG2B).

Supplemental Figure 3. MHC-I and MICA exhibit different pattern of expression on stimulated B cell. Comparative expression by flow cytometry of MHC-I (HLA-ABC) and MICA expression in control B cells from a healthy donor before (T0) and in the absence (US) or the presence (S) of a cell stimulation cocktail for 1 to 3 days. This analysis shows an increase of MHC-I expression at day 1, which remains constant between day 1 and day 3, whereas MICA is not expressed before activation and exhibits a progressive membrane accumulation from day 2 to day 3.

Supplemental Figure 4. MICA expression is induced in stimulated B cells from CLL patients. Western blot showing MICA expression in B cells isolated from CLL

12

2

patients (P1-3) 24h, 48h and 72h after stimulation (S) and control unstimulated cells (US). GAPDH expression is shown as loading control.

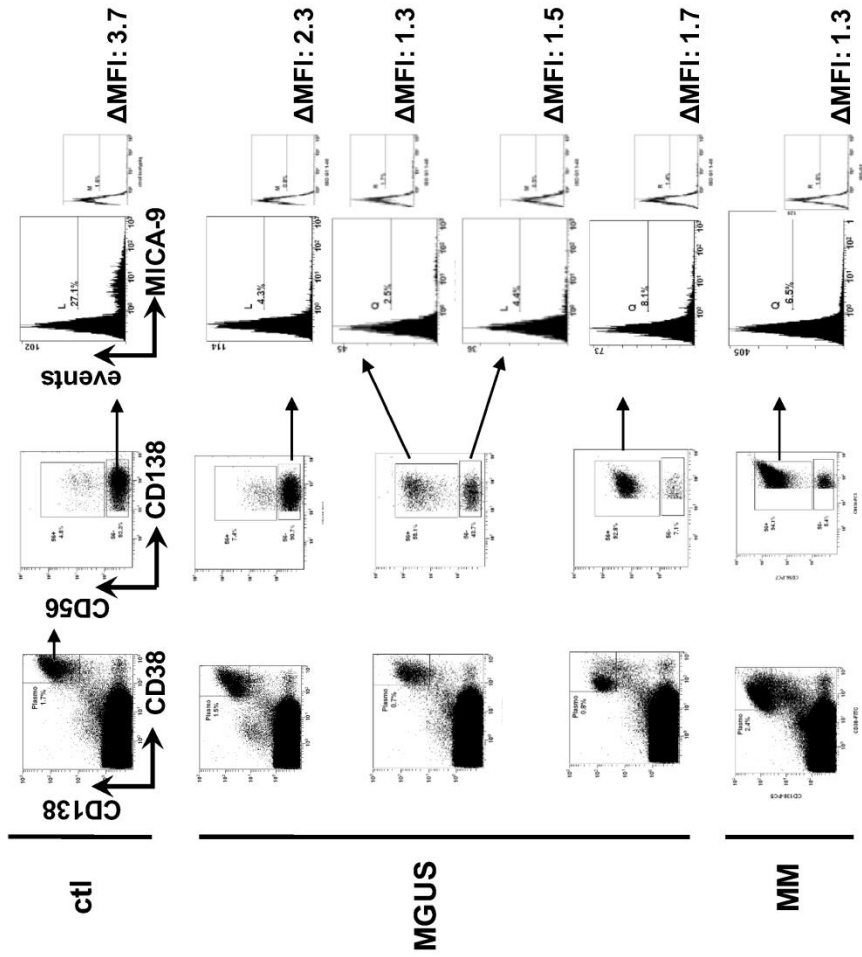
Supplemental Figure 5. AP1, NF-κB and STATs binding sites are present in the promoter region of *MICA*. Binding sites for the BCR transcriptional factors AP1, NF-κB and STATs are shown with colored boxes in the *MICA* promoter region. Predictions were performed with the Matinspector software (https://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html).

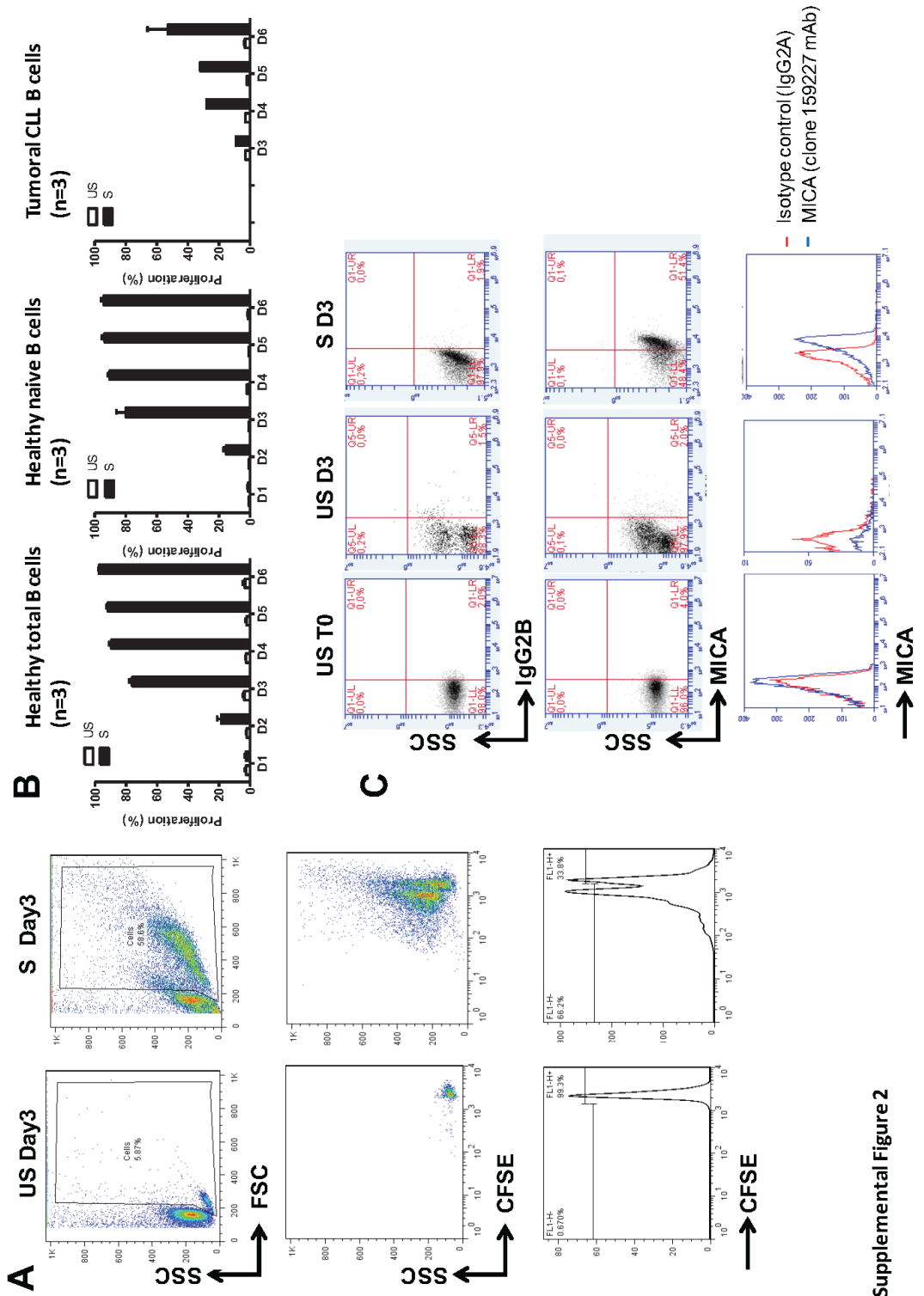
□

2□

□

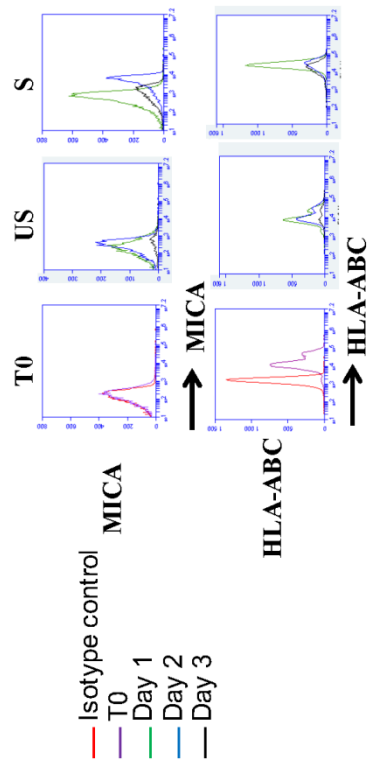
Supplemental Figure 1.



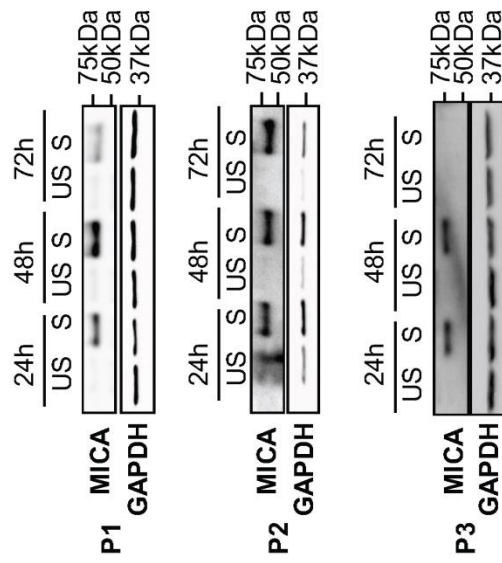


Supplemental Figure 2

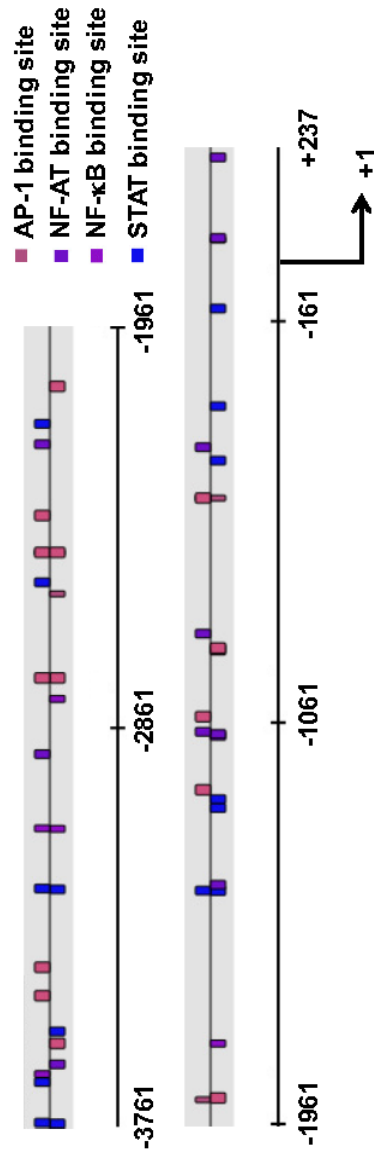
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5



Résumé

Anomalies des programmes de réponse lymphocytaire après stimulation du récepteur à l'antigène dans la leucémie lymphoïde chronique

Résumé

Une cellule reçoit en permanence des signaux de son environnement. Cette stimulation induit une cascade de signalisation activant un programme génique et protéomique dynamique aboutissant à une réponse cellulaire adaptée. Dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), la stimulation du récepteur à l'antigène induit un programme et une réponse anormale à l'origine de la prolifération leucémique.

Notre objectif est de caractériser ce programme cellulaire pathologique. Pour cela, nous avons mis en place un modèle de stimulation afin de reproduire *ex vivo* cette stimulation du récepteur à l'antigène de cellules primaires issues de patients porteurs de LLC et d'activer ce programme cellulaire. Nous avons alors analysé la dynamique transcriptionnelle et protéomique activée dans ces cellules afin de caractériser les anomalies de ce programme.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la spécificité de ce programme prolifératif et de caractériser les gènes clés de ce programme tumoral. Ces gènes constituent de potentielles cibles thérapeutiques innovantes.

Mots- clés : Leucémie Lymphoïde Chronique ; Récepteur à l'antigène ; Prolifération lymphocytaire ; Réseaux de régulation transcriptionnelle et protéomique

Summary

A cell constantly receives signals from its environment. This stimulation induces a signalling cascade activating a dynamic genic and proteomic program, leading to an adapted cellular response. In chronic lymphocytic leukemia (CLL), an antigen receptor stimulation induces a program and an abnormal response behind leukemic proliferation.

Our aim was to characterize the pathological cell program. To achieve this, we have implemented a stimulation model to reproduce *ex vivo* antigen receptor stimulation of primary cells from CLL patients and activate this cellular program. We then analyzed the transcriptional and proteomic dynamics activated in these cells in order to characterize the abnormalities of this program.

This study allows us to highlight the specificity of this proliferative program and to identify key genes of tumor program. These genes constitute potential new therapeutic targets.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemia; Antigen receptor; Lymphocytic proliferation; Transcriptional and proteomic regulatory networks