

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

INSERM U1113 IRFAC Interface de Recherche Fondamentale et Appliquée en Cancérologie

THÈSE présentée par :

Yonca GÜLER

soutenue le : 26 janvier 2021

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

Discipline/Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires en biologie

**Modulation de l'expression de gènes
induits par la stimulation
du récepteur à l'antigène *ex vivo*
dans des lymphocytes primaires
de leucémie lymphoïde chronique**

THÈSE dirigée par :

Mr VALLAT Laurent

MCUPH, Inserm UMR-S1113, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BARAN-MARSZAK Fanny

Mr DELIC Jozo

PUPH, Hôpital Avicenne, Université Paris XIII

DR, IRCM, CEA Fontenay-aux-roses

EXAMINATEUR :

Mr KICHLER Antoine

DR, CNRS UMR 7199, Université de Strasbourg

Pour mon grand-père Halil CILDIR,
(paix à son âme)

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier l'ensemble du jury de thèse : **Dr. Fanny Baran-Marzsak**, **Dr. Jozo Delic** et **Dr. Antoine Kichler** d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie le directeur de laboratoire **Dr. Jean Noël Freund**, de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de sa gentillesse.

Un grand merci au **Dr. Laurent Vallat**, mon directeur de thèse, de m'avoir permis de travailler sur ce sujet de thèse très original du fait qu'il soit translationnelle et qu'il m'est permis de découvrir un autre volet de la science grâce à l'utilisation de cellules primaires de patients. Je lui remercie pour son aide concernant le manuscrit de thèse.

Merci à l'ensemble des cliniciens et biologistes **Pr. Raoult Herbrecht**, **Dr. Laurent Mauvieux**, **Dr. Luc-Mathieu Fornecker**, **Dr. Elise Toussaint** pour leur contribution concernant les récupérations des prélèvements sanguins.

Je remercie tout particulièrement, **Dr. Cédric Schleiss** de m'avoir apporté ses connaissances scientifiques, son aide, ses conseils et pour avoir participé à mon encadrement technique.

Merci aux techniciennes **Nathalie Perrusson** et **Elisabeth Martin** pour leur aide technique et leur disponibilité quand j'avais besoin d'un petit coup de main.

Un grand merci au **Dr. Claire Domon-Dell** d'être à mes côtés lors de moments difficiles pendant ma thèse. Les mots seront insuffisants ici pour décrire ma reconnaissance, mais elle le sait.

Merci au **Dr. Manuela Tavian**, **Dr. Isabelle Gross**, **Dr. Dominique Guenot** de leur bonne humeur et de leur disponibilité quand j'avais des questions scientifiques et techniques dont je n'avais pas la réponse.

Merci également à l'ensemble des doctorantes du laboratoire avec qui j'ai réalisé ma thèse. On s'est compris mentalement et aidé pour que tout se passe au mieux dans le laboratoire.

Enfin, je remercie grandement mes parents **Mürsel** et **Nevriye**, mes frères **Izzet** et **Bilal** et surtout ma sœur **Ayşe Güler** d'être toujours à mes côtés lorsque ça n'allait pas, ils ont dû me supporter pendant 3 ans. Sans eux, je ne serais pas arrivé au bout de cette aventure.

Table des matières

Liste des tableaux	1
Liste des figures	2
A- Introduction.....	5
1- Physiologie lymphocytaire.....	5
2- Leucémogenèse de la leucémie lymphoïde chronique.....	12
3- La leucémie lymphoïde chronique	17
4- Modèles d'étude de la leucémie lymphoïde chronique.....	22
5- Modulation de l'expression de gènes.....	26
B- Résultats préliminaires de l'équipe	46
C- Objectifs de la thèse	62
D- Matériels et méthodes	64
E- Résultats	72
1- Validation de l'expression des gènes cibles retenus	72
2- Validation des méthodes de délivrance de siRNA dans les lymphocytes	78
3- Diminution d'expression du gène CALR dans les lymphocytes de LLC	84
4- Amélioration du modèle de stimulation lymphocytaire ex vivo.....	89
F-Conclusion et perspectives	92
Résumé.....	152

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Anomalies chromosomiques fréquentes dans la LLC	14
<u>Tableau 2</u> : Les différents vecteurs viraux utilisés pour la délivrance de gènes	29
<u>Tableau 3</u> : Efficacité de délivrance de petites molécules dans les cellules primaires.....	39
<u>Tableau 4</u> : Efficacité de silencing de gènes cibles dans des cellules primaires.....	42
<u>Tableau 5</u> : Comparaison entre l'efficacité de délivrance et l'efficacité de silencing de gènes	45
<u>Tableau 6</u> : Liste des siRNA utilisés pour les transfections.....	67
<u>Tableau 7</u> : Liste des sondes TaqMan et des amorces SybrGreen utilisées en qPCR	69
<u>Tableau 8</u> : Liste des anticorps utilisés en Western-Blot.....	70

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Lymphopoïèse B	6
<u>Figure 2</u> : Immunoglobuline	7
<u>Figure 3</u> : Recombinaison des gènes V(D)J.....	9
<u>Figure 4</u> : Maturation secondaire des lymphocytes dans le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires	10
<u>Figure 5</u> : Voies de signalisation du récepteur à l'antigène (BCR)	12
<u>Figure 6</u> : Origine cellulaire de la leucémie lymphoïde chronique (LLC)	13
<u>Figure 7</u> : Rôle du microenvironnement dans le développement de la LLC.....	16
<u>Figure 8</u> : Frottis sanguin de sujet sain et sujet porteur de LLC après coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) (x100)	18
<u>Figure 9</u> : Immunophénotypage de lymphocytes de LLC.....	19
<u>Figure 10</u> : Courbe de survie de patients atteints de LLC dont les lymphocytes présentent des gènes IGVH mutés ou non mutés.....	20
<u>Figure 11</u> : ZAP70 renforce la signalisation du BCR dans les lymphocytes de LLC	21
<u>Figure 12</u> : Représentation schématique des différentes méthodes de délivrance d'un gène.....	27
<u>Figure 13</u> : Mécanisme de l'interférence à l'ARN par les miRNA chez les mammifères	31
<u>Figure 14</u> : Mécanisme de l'interférence à l'ARN par siRNA chez les mammifères	31
<u>Figure 15</u> : Analyse de la cinétique de dégradation de l'ARNm par un siRNA.....	32
<u>Figure 16</u> : Structure de la nucléase programmable ZFN et son positionnement au niveau de l'ADN cible	34
<u>Figure 17</u> : Structure de la nucléase programmable TALEN et son positionnement au niveau de l'ADN cible	35
<u>Figure 18</u> : CRISPR Cas9.....	37
<u>Figure 19</u> : Mécanismes effecteurs des ZFN, TALEN et du système CRISPR-Cas9	38
<u>Figure 20</u> : Efficacité de délivrance de petites molécules dans les cellules primaires	41
<u>Figure 21</u> : Efficacité de silencing de gènes cibles dans des cellules primaires	44
<u>Figure 22</u> : Comparaison entre l'efficacité de délivrance et l'efficacité de silencing de gènes.....	45

<u>Figure 23</u> : Analyse statistique supervisée de l'expression dynamique des gènes et des protéines après activation du BCR de lymphocytes de LLC.....	53
<u>Figure 24</u> : Programme prolifératif dynamique induit après stimulation du BCR dans les cellules de LLC	55
<u>Figure 25</u> : CALR	74
<u>Figure 26</u> : EGR2	74
<u>Figure 27</u> : TNFAIP3	76
<u>Figure 28</u> : CXCR4.....	76
<u>Figure 29</u> : Effet de l'activation du BCR sur l'abondance protéique de CXCR4	77
<u>Figure 30</u> : Délivrance de siRNA fluorescent (siGlo) dans la lignée cellulaire BL2	79
<u>Figure 31</u> : Délivrance de siRNA fluorescent (siGlo) dans des lymphocytes primaires de LLC.....	80
<u>Figure 32</u> : Effet du milieu de transfection sur la viabilité cellulaire	82
<u>Figure 33</u> : Effet de la méthode de transfection sur la prolifération de lymphocytes primaires de LLC.....	83
<u>Figure 34</u> : Validation du siRNA anti-CALR sur la lignée cellulaire AGS après transfection à l'aide de lipofectamine RNAimax.....	85
<u>Figure 35</u> : Plan expérimental et détermination des conditions d'utilisation du siRNA anti-CALR.....	86
<u>Figure 36</u> : Modulation d'expression du gène CALR après activation du BCR	88
<u>Figure 37</u> : Pourcentage de prolifération des lymphocytes de LLC après activation du BCR.....	91

Abréviations

Ac : Anticorps

BCR : Récepteur à l'antigène des lymphocytes B

BL2 : lignée *Burkitt lymphoma 2*

BME : β -mercaptoéthanol

CD40-L : CD40-Ligand

CFSE : Carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester

CG : Centre germinatif

CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMH-II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

DA : Différentiellement abondant

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DE : Différentiellement exprimé

HUS : Hôpitaux universitaires de Strasbourg

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IGVH : Gène codant la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines

IGVH-M : Gène IGVH muté

IGVH-UM : Gène IGVH non muté

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

MBL : Lymphocytose monoclonale bénigne

NK : lymphocytes *natural killer*

Pb : Paire de base

qPCR : PCR quantitative

TCR : Récepteur à l'antigène des lymphocytes T

WB : Western-blot

A- Introduction

1-Physiologie lymphocytaire

1.1- Différenciation lymphoïde centrale

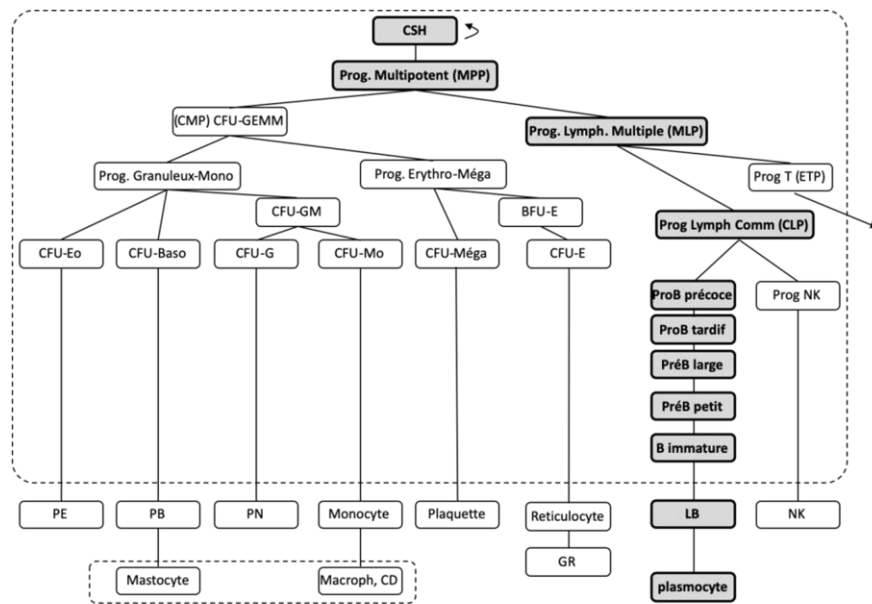
a- Lymphopoïèse

Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en un premier progéniteur multipotent qui donne naissance aux différentes lignées hématopoïétiques (Figure 1)(Doulatov et al., 2012). Des ligands (FLT3-L) à la surface des cellules stromales et des facteurs de croissance présents dans cette niche hématopoïétique (IL-7) activent alors un programme transcriptionnel comprenant différents facteurs transcriptionnels (E2A, IKZF1) (Yoshida and Georgopoulos, 2014) induisant l'engagement de ce progéniteur dans la lignée lymphoïde. Ce progéniteur se transforme alors en progéniteur lymphoïde multiple et donne naissance aux deux lignées T et B/NK. Le progéniteur T précoce sort de la moelle pour rejoindre le thymus où il poursuit sa maturation. Le progéniteur lymphoïde commun B/NK se différencie et s'engage vers la lignée NK ou la lignée lymphoïde B.

La différenciation B se poursuit en plusieurs étapes permettant d'individualiser différents précurseurs. Ces étapes de différenciation sont conditionnées par la mise en place du récepteur à l'antigène (BCR) à la surface de ces cellules, indépendamment de toute rencontre avec l'antigène. Le précurseur pro-B précoce donne naissance à un pro-B tardif, puis à un précurseur pré-B qui exprime un pré-BCR à sa surface. Ce dernier se différencie en lymphocyte immature présentant un BCR complet et fonctionnel d'isotype M et D. A ce stade, des mécanismes de sélection négative permettent d'éliminer les lymphocytes présentant un BCR auto-réactif.

Le lymphocyte B sort alors de la moelle pour finaliser sa maturation dans la rate. Il devient un lymphocyte B naïf mature n'ayant pas encore rencontré son antigène. Il circule alors dans le sang périphérique et traverse les organes lymphoïdes pour effectuer une surveillance immune (Orkin and Zon, 2008)(Addo et al., 2019).

A



B

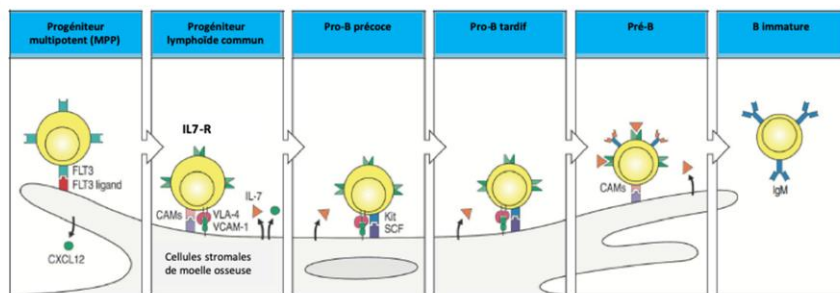


Figure 1 : Lymphopoïèse B. (A) Différentes étapes de la lymphopoïèse B lors de l'hématopoïèse centrale dans la moelle osseuse (encadré en pointillés). (B) Action de différents facteurs de croissance lors des étapes de la lymphopoïèse centrale (adapté de Murphy et Weaver, 2017).

b- Mise en place du récepteur à l'antigène (BCR) et création de la diversité du repertoire

Le BCR est une immunoglobuline (Ig) de surface composée de quatre chaînes polypeptiques, dont deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (kappa ou lambda) liées entre elles par des ponts disulfures. Les chaînes lourdes et légères sont constituées d'une région variable permettant la reconnaissance de l'antigène et d'une région constante assurant la structure de cette Ig (Figure 2). Ces différentes régions sont codées par des gènes situés dans des locus génomiques différents. Les gènes codant la chaîne lourde sont situés sur le chromosome 14. Les gènes codant les chaînes légères kappa et lambda sont respectivement localisés sur les chromosomes 2 et 22 (Schroeder and Cavacini, 2010).

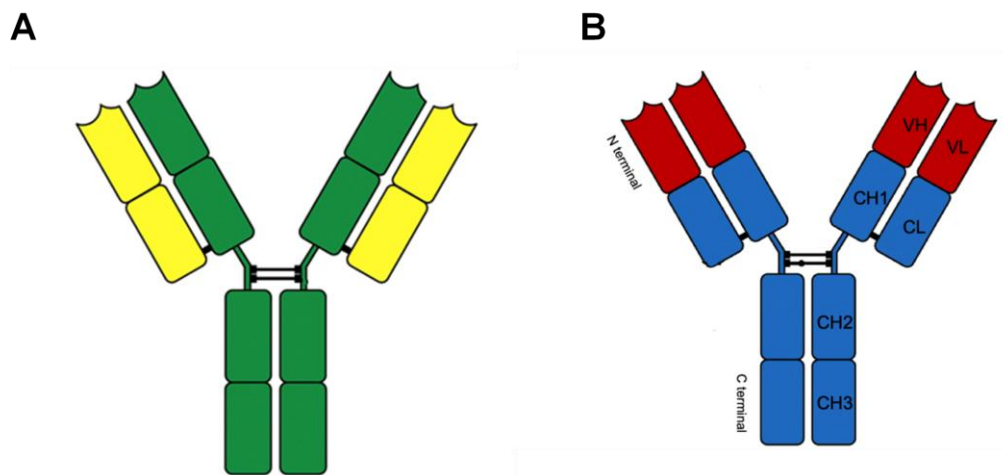


Figure 2 : Immunoglobuline. (A) chaînes lourdes (vert), chaînes légères (jaune), pont disulfures (liens noirs); (B) régions constantes (bleues), régions variable (rouges) (Murphy et Weaver, 2017).

Le locus 14q32.2 contient les gènes codant les régions variables et constantes de la chaîne lourde d'Ig. Les gènes codant la région variable se répartissent en trois groupes, VH, DH et JH (Figure 3). Il existe environ 40 gènes VH, 25 gènes DH et 6 JH. Lors de leur maturation, chaque lymphocyte utilise un gène VH parmi les 40 disponibles, un gène DH parmi les 25 et un des gènes JH. Les gènes VH, DH et JH sélectionnés sont alors rapprochés et recombinaisonnés pour coder la région variable de l'Ig de ce lymphocyte. La région VDJ comprenant le gène DH et les zones de jonction avec les gènes VH et JH code

pour une région hypervariable numéro 3 (HV3) (ou *complementarity determining region 3*, CDR3) de grande spécificité pour l'antigène.

Cette sélection de gènes VDJ s'effectue au hasard et cette diversité de combinaison de gènes est unique pour chaque lymphocyte. Chaque lymphocyte possède alors une combinaison spécifique de gènes lui permettant de coder son récepteur à l'antigène. Lors de ce mécanisme de recombinaison, l'ADN est coupé et les gènes VH, DH et JH qui ne sont pas utilisés sont éliminés. Lors de la recombinaison de ces trois gènes, les mécanismes de réparation de l'ADN introduisent un nombre aléatoire de nucléotides (<15) dans les zones de réparation entre VH, DH et JH. Ces séquences aléatoires de nucléotides introduisent une diversité jonctionnelle qui augmente encore la spécificité de la région variable de chaque lymphocyte.

Ces réarrangements de gènes codant la partie variable ainsi que des gènes codant la partie constante permet au lymphocyte de produire une chaîne lourde d'Ig. Cette dernière est associée à une pseudo-chaîne légère (VpréB) et une Ig complète constituant un pré-BCR est exprimée à la surface du progéniteur lymphocytaire pré-B. Cette étape permet de contrôler la fonctionnalité de la chaîne lourde et induit le réarrangement des gènes codant la chaîne légère. Les gènes VL et JL des locus codant la chaîne kappa puis lambda sont alors recombinaisonnés de façon aléatoire. Une chaîne légère kappa ou lambda est alors produite et associée à la chaîne lourde précédemment synthétisée.

Chaque lymphocyte possède alors une Ig de surface constituant un BCR complet et fonctionnel, dont les régions variables des chaînes lourdes et légères sont issues d'une recombinaison génique aléatoire et unique pour chaque lymphocyte. Ces mécanismes permettent d'assurer la spécificité de reconnaissance antigénique du système immunitaire adaptatif.

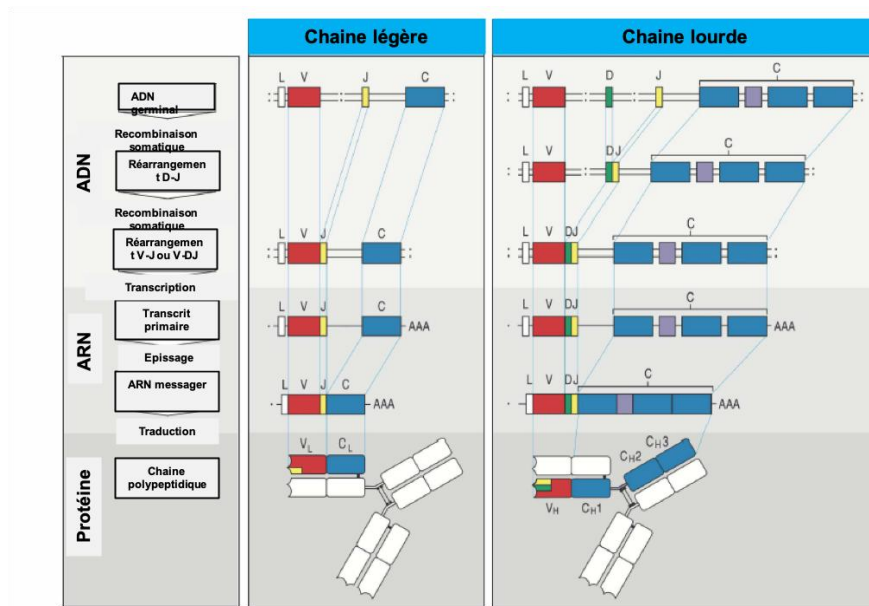


Figure 3 : Recombinaison des gènes V(D)J. Etapes de recombinaison des gènes V(D)J codant les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (adaptée de Murphy et Weaver, 2017).

1.2- Maturation et différenciation lymphoïde périphérique

Le lymphocyte B peut reconnaître son antigène spécifique sous forme native, en l'absence de présentation par une cellule présentatrice d'antigène et en l'absence d'une coopération des lymphocytes T. Lors de cette activation thymo-indépendante, le lymphocyte B s'active et se différencie en plasmocytes et lymphocytes B mémoires en dehors d'un organe lymphoïde. Cette activation et différenciation ne s'accompagne pas de maturation d'affinité ni de commutation de classe et les anticorps de la réponse humorale sont d'isotype M.

Le lymphocyte B peut également reconnaître son antigène dans le cadre d'une présentation par une cellule présentatrice et avec coopération des lymphocytes T dans un organe lymphoïde secondaire. Lors de cette activation thymo-dépendante, le lymphocyte B s'active, internalise l'antigène et le présente à son tour au lymphocyte T via ses molécules du CMH-II. Ce peptide est reconnu par un lymphocyte T CD4 qui apporte un deuxième signal d'activation au lymphocyte B. Le lymphocyte B se transforme alors en plasmablaste et effectue une première sécrétion d'anticorps

d'isotype IgM. Le lymphocyte B migre alors dans la zone B de l'organe lymphoïde et forme un centre germinatif composé d'une zone sombre et d'une zone claire. Le lymphocyte B prolifère dans la zone sombre du centre germinatif (expansion clonale), puis il migre dans la zone claire où ont lieu des hypermutations somatiques qui sont des mutations ponctuelles introduites au niveau des gènes codant les régions variables des chaînes lourdes (IGVH) et légères des Ig. Ces hypermutations augmentent l'affinité du BCR pour son antigène. Dans cette zone claire, il se produit également des remaniements de gènes codant les chaînes constantes des Ig. Ces recombinaisons permettent de modifier la région constante et l'isotype (G, A ou E) des Ig. Le lymphocyte B se différencie alors en plasmocyte ou en lymphocyte B mémoire. Les plasmocytes regagnent la moelle osseuse ou ils secrètent les anticorps de la réponse humorale (Figure 4).

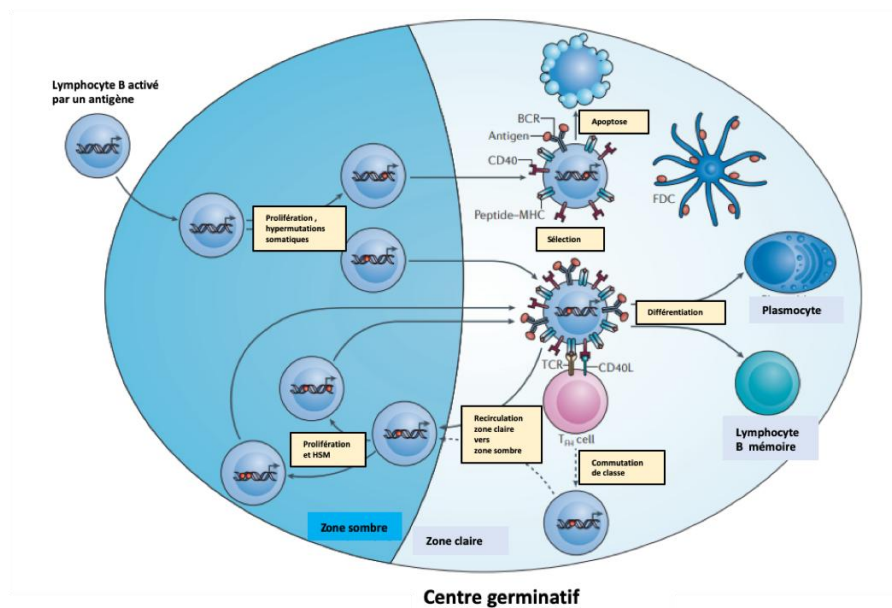


Figure 4 : Maturation secondaire des lymphocytes dans le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires (Traduit de De Silva and Klein, 2015).

1.3- Activation du récepteur à l'antigène

La reconnaissance de l'antigène induit l'activation du BCR à la surface du lymphocyte. Ce récepteur ne possédant pas de domaine de transmission du signal, il est associé à deux protéines transmembranaires Ig α (CD79a) et Ig β (CD79b) possédant chacune un motif d'activation de la signalisation intra-cellulaire (*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*, ITAM). Ces motifs recrutent les kinases FYN, BLK et LYN, puis SYK et BTK. Ces dernières activent BLNK puis PLCG2 qui hydrolyse le phospholipide phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). Trois grandes voies de signalisation peuvent alors être individualisées.

La première voie Ras/Raf/MAP kinases est induite par SYK et DAG qui activent Ras puis plusieurs MAP Kinases en cascade. Ainsi Raf active MEK1/2 puis ERK qui active à son tour le facteur transcriptionnel ELK1 puis FOS. Ce dernier s'associe au facteur transcriptionnel JUN pour former le complexe AP1.

La deuxième voie est activée par le DAG. Ce dernier induit l'activation en cascade de PKCB, puis du complexe CBM (CARD11, BCL10, MALT1) et du complexe IKK. La phosphorylation de ce complexe et de IKB α permet de libérer les différentes sous-unités de NF κ B qui migrent dans le noyau pour permettre leur activité transcriptionnelle.

La troisième voie est activée par IP3 qui induit la libération du calcium du réticulum. Cette libération active la calcineurine puis le facteur transcriptionnel NFAT.

Les facteurs de transcription NFAT, NF κ B et le complexe AP1 activent la transcription de nombreux gènes en adéquation avec la stimulation initiale. NFAT induit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose et l'angiogenèse. NF κ B active l'expression de gènes anti-apoptotiques comme BCL2 et le gène MYC impliqué dans la prolifération cellulaire. AP1 régule des gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose (Figure 5).

La force du signal dépend de l'affinité du récepteur pour l'antigène. Celle-ci est amplifiée par activation du complexe protéique CD19/CD21/CD81 présent à la surface du lymphocyte B. Ainsi, CD19 transforme PI3K en PIP3 puis PIP2 et active la voie AKT/mTOR impliquée dans la survie cellulaire. En revanche, ce signal peut être régulé négativement par des récepteurs inhibiteurs tels que BTLA, CD22, CD5 et FC γ RIIB qui

peuvent eux recrutés des phosphatases inhibitrices telles que SHP-1, SHIP-1 et PTPN22 et empêcher la suractivation de la voie du BCR.

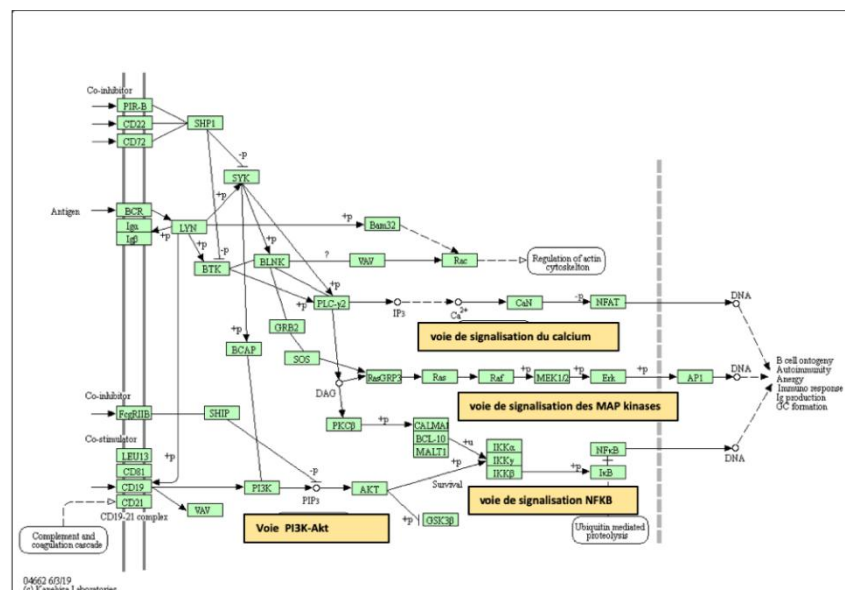


Figure 5 : Voies de signalisation du récepteur à l'antigène (BCR). La reconnaissance d'un antigène par le BCR et la phosphorylation de Igα/Igβ et LYN, induisent la phosphorylation de BTK, SYK, BLNK et PLC2γ. Ces protéine activent la voie des MAP kinases, la voie du Calcium, la voie NFκB et la voie des PI3K-AKT (<http://www.genome.jp/kegg/>).

2- Leucémogénèse de la leucémie lymphoïde chronique

2.1- Origine cellulaire

Le lymphocyte à l'origine du développement de la LLC (équivalent non tumoral) est un lymphocyte B mature (Fabbri and Dalla-Favera, 2016).

Pour savoir si ce lymphocyte mature a rencontré son antigène spécifique dans le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires, il est possible d'analyser le statut mutationnel des gènes IGVH codant les régions variables des Ig de ces lymphocytes. En effet, les lymphocytes naïfs qui n'ont pas rencontré leur antigène et n'ont pas subi de maturation d'affinité dans le centre germinatif ne présentent pas d'hypermutations somatiques des gènes IGVH. Au contraire, les lymphocytes qui ont rencontré leur

antigène de façon T-dépendante ont acquis des hypermutations des gènes IGVH lors de leur passage dans le centre germinatif.

Le séquençage des gènes IGVH des lymphocytes tumoraux permet de déterminer le pourcentage d'homologie de la séquence de ces gènes par rapport à leur séquence germinale. Dans le cas d'une homologie supérieure ou égale à 98%, le statut mutationnel des IGVH est considéré non muté. Si l'homologie est inférieure à ce seuil, le statut est considéré muté. Une équipe a montré qu'il existait une forme de LLC dont les lymphocytes présentent des IGVH non mutés et une forme dont les IGVH sont mutés (Schroeder and Dighiero, 1994).

Dans le cas des IGVH non mutés, le lymphocyte de LLC pourrait être issu d'un lymphocyte conventionnel pré-centre germinatif ou d'un lymphocyte de la zone marginale CD5+ CD23+ ou d'une réaction immune avortée dans le centre germinatif (Caligaris-Cappio, 1996; Chiorazzi and Ferrarini, 2011). Les lymphocytes de LLC avec IGVH mutés pourraient être issus d'un lymphocyte conventionnel ayant rencontré son antigène et ayant effectué une maturation d'affinité dans le centre germinatif avec acquisition d'hypermutations somatiques (Fabbri and Dalla-Favera, 2016; Seifert et al., 2012)(Figure 6).

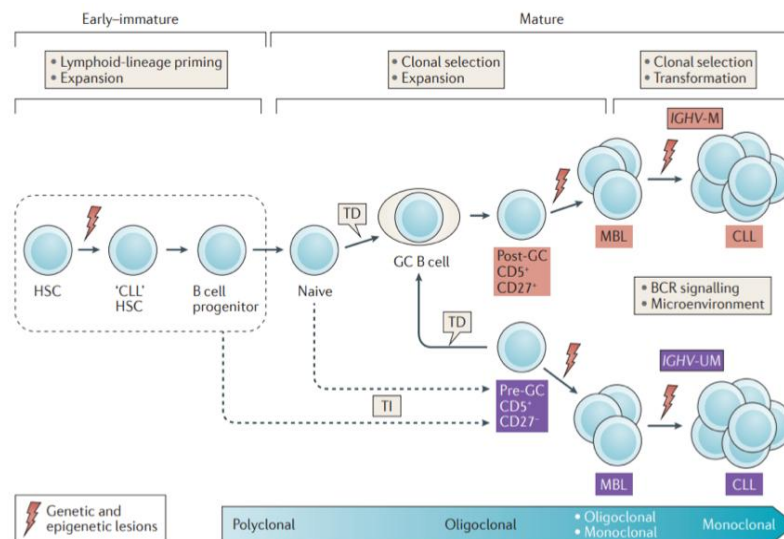


Figure 6 : Origine cellulaire de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Les lymphocytes de LLC avec gènes IGVH mutés (IGHV-M) se développent à partir de lymphocytes B CD5+ après une activation antigénique T-dépendante (TD) et une maturation secondaire dans le centre germinatif (CG). Les lymphocytes de LLC avec gènes IGVH non mutés (IGHV-UM) se développent à partir de lymphocytes B CD5+ CD27- après une activation antigénique T-indépendante (TI) (ou une réaction T-dépendante avortée) (Fabbri and Dalla-Favera, 2016).

2.2- Anomalies génétiques acquises

Aucune anomalie chromosomique n'est retrouvée de façon constante chez tous les patients. Certaines anomalies chromosomiques sont cependant fréquemment retrouvées dans les lymphocytes de LLC. Ainsi, la délétion 13q14, retrouvée chez 50 à 60% des patients induit la perte du gène DLEU et des microARN miR15a et miR16-1 régulateurs négatifs de la protéine anti-apoptotique BCL2 (Calin et al., 2004). La perte de ces gènes induit une inhibition de l'apoptose et favorise la prolifération des lymphocytes leucémiques. La délétion 11q22-23 (18% des patients) induit la perte du gène suppresseur de tumeur ATM impliqué dans les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN. La délétion 17p13.1 (7% des patients) s'accompagne de la perte du gène suppresseur de tumeur TP53. Une trisomie du chromosome 12 (15 à 20% des patients) est retrouvée dans les formes agressives de la LLC, mais les gènes impliqués restent discutés. Une délétion 6q peut également être observée (6%)(Tableau 1) (Döhner et al., 2000; Stankovic and Skowronska, 2014; Wang et al., 2011).

Anomalies cytogénétiques (FISH)	Gènes impliqués	Fréquence (% des patients LLC)
Del 13q14.3	Gène DLEU, mir15a, mir16-1	55%
Del 11q22.3-23.1	Gène ATM	18%
Del 17p13.1	Gène TP53	7%
Trisomie 12q13	nd	16%
Del 6q	nd	6%

Tableau 1 : Anomalies chromosomiques fréquentes dans la LLC. Altérations génétiques les plus fréquentes, détectées par technique d'hybridation de sondes fluorescentes in situ (FISH) (Dohner et al., 2000).

Le séquençage du génome de grandes cohortes de patients n'a pas permis de mettre en évidence de mutations constantes chez tous les patients. Les gènes SF3B1, TP53, BIRC3, NOTCH1, EGR2, XPO1 ou KLHL6 sont cependant retrouvés mutés chez de nombreux patients. Des mutations des gènes NOTCH1 et XPO1 sont plus fréquemment retrouvées dans les lymphocytes de LLC avec gènes IGVH non mutés et les mutations du gène KLHL6 sont retrouvées dans les LLC avec gènes IGVH mutés (Puente et al., 2011; Quesada et al., 2011; Rossi et al., 2008; Wang et al., 2011)

Des anomalies épigénétiques ont aussi été décrites dans la LLC. Malgré une hypométhylation globale du génome des lymphocytes de LLC (Yu, 2006), une hyperméthylation localisée de certains promoteurs a été décrite, notamment du gène HTERT, du gène TWIST2 (régulateur négatif de TP53) ou du gène ZAP70 chez les patients avec des gènes IGVH mutés (Mansouri et al., 2018).

Des mutations de certains de ces gènes (NOTCH1, SF3B1 et EGR2) ont été retrouvées dans des progéniteurs hématopoïétiques de patients porteurs de LLC (Damm et al., 2014). Par ailleurs, la greffe de progéniteurs hématopoïétiques issus de patients porteurs de LLC dans des souris induit une expansion lymphoïde CD19+ CD5+ mimant une pré-leucémie de type LLC (Kikushige et al., 2011). Ces résultats suggèrent l'existence d'anomalies de progéniteurs lymphoïdes dans la leucémogenèse de cette leucémie.

Comme dans la plupart des cancers, le microenvironnement a aussi un rôle dans le développement et l'évolution de la LLC. Les cellules stromales et certaines cellules monocytaires (*nurse-like cells*) sécrètent les chimiokines CXCL12 (SDF1), Baff et April (Kipps et al., 2017; Panayiotidis et al., 1996). Les cellules stromales activent également les voies Wnt/ROR1/2, ainsi que CD31/CD38 qui favorisent la survie et la prolifération des lymphocytes tumoraux. Les lymphocytes de LLC sécrètent CCL12 et CCL22 qui favorisent le recrutement de lymphocytes T qui ont, en retour un effet de co-stimulation sur les lymphocytes tumoraux par leur sécrétion d'IL-4, IL-10 et CD40-ligand (CD40-L) (Figure 7) (Kipps et al., 2017).

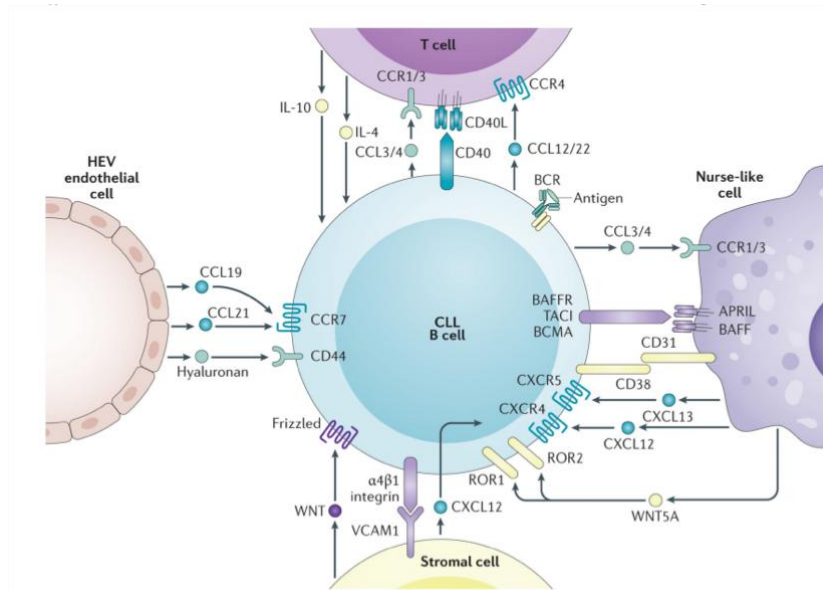


Figure 7 : Rôle du microenvironnement dans le développement de la LLC (Kipps et al., 2017).

2.3- Une stimulation antigénique chronique à l'origine de la prolifération lymphocytaire LLC

En conditions physiologiques, les lymphocytes B présentent une grande variabilité du répertoire immunitaire grâce à la diversité combinatoire des gènes VH codant les régions variables des Ig. Dans les lymphocytes de LLC avec IGVH muté et non muté, il existe des biais d'utilisation du répertoire des gènes VH suggérant l'existence d'une stimulation antigénique à l'origine de la leucémogénèse. En effet, les lymphocytes de LLC présentant des gènes IGVH non mutés utilisent fréquemment les gènes VH1-69 et les lymphocytes de LLC avec des gènes IGVH mutés utilisent fréquemment les gènes VH4-34 (Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004). De plus, 20% des lymphocytes de LLC possèdent des régions de reconnaissance antigénique HV3 (ou CDR3) proches constituant des BCR stéréotypés (Fais et al., 1998; Messmer et al., 2004; Vardi et al., 2014). Les lymphocytes des deux formes de LLC, avec IGVH muté et non muté auraient donc rencontré leur antigène, mais cette rencontre n'aurait pas induit une réponse complète dans le centre germinatif avec acquisition d'hypermutations somatiques pour ces derniers. Ces données suggèrent qu'une stimulation antigénique est à l'origine de

l'initiation de la prolifération des lymphocytes tumoraux dans les deux formes de LLC (mutée et non mutée).

Les antigènes à l'origine de cette stimulation ne sont pas complètement identifiés. Le rôle d'antigènes bactériens, viraux (Lanemo Myhrinder et al., 2008) et du soi (Hervé et al., 2005) est suspecté.

3- La leucémie lymphoïde chronique

3.1- Définition

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération de lymphocytes B monoclonaux matures qui s'accumulent dans le sang, la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes. Cette leucémie est cliniquement hétérogène (Fabbri and Dalla-Favera, 2016).

3.2- Epidémiologie

La LLC représente 40% des leucémies de l'adulte et 20% des hémopathies développées à partir de lymphocytes matures. L'incidence de cette pathologie est de 2 à 4 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants en France (rapport homme:femme de 2:1) (Le Guyader-Peyrou, Rev Epidemiol Santé publique 2016). L'âge médian au diagnostic est de 72 ans (Eichhorst et al., 2015). Un terrain familial peut augmenter le risque de survenue de cette leucémie. La présence de certains variants pourrait être responsable de cette augmentation de risque (Crowther-Swanepool, Nat Genet 2016, Slager Blood 2012)(Coombs et al., 2012; Di Bernardo et al., 2008).

3.3- Diagnostic

Le diagnostic de LLC est suspecté devant la découverte d'une hyperlymphocytose périphérique supérieure ou égale à 5 G/L persistant plus de 3 mois (Hallek et al., 2008). Le frottis sanguin montre de petits lymphocytes matures (avec moins de 10% de prolymphocytes et/ou de lymphocytes clivés) et des ombres de Gumprecht (lymphocytes lysés lors de la réalisation du frottis) (Figure 8).

Un immunophénotypage permet de mettre en évidence des lymphocytes B monotypiques exprimant le CD5. L'analyse de cinq marqueurs (CD5, CD23, sIg, FMC7,

CD79b) permet le calcul du score du Royal Marsden Hospital, ou score de Matutes. Un score supérieur ou égal à 4 (Ig faible, CD79b/CD22 faible, CD5+, CD23+, absence FMC7), permet d'affirmer le diagnostic de LLC (Matutes et al., 1994).

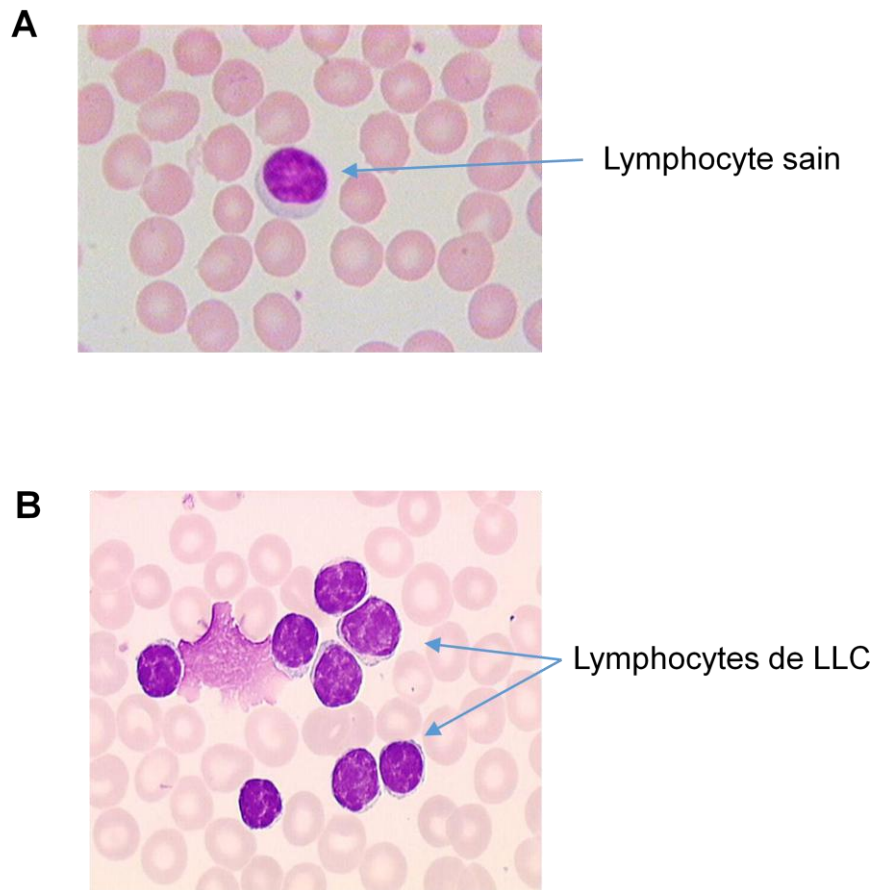


Figure 8 : (A) Frottis sanguin de sujet sain, après coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) (x100). (B) Frottis sanguin de sujet porteur de LLC montrant une augmentation des lymphocytes d'aspect mature (lymphocytes de taille réduite avec noyau à chromatine dense et peu de cytoplasme), après coloration MGG (x100) (adapté de hematocell.fr, CHU Angers).

3.4- Evolution naturelle de la maladie et classification anatomo-clinique

La LLC est précédée par un stade pré-leucémique de lymphocytose monoclonale bénigne (MBL), caractérisée par la présence d'un clone circulant présentant des marqueurs de surface caractéristiques de la LLC, mais dont la lymphocytose reste dans les limites de la normale (lymphocytes < 5 G/L). Une MBL est retrouvée chez 3 à 5% des personnes

saines (Lanasa et al., 2010; Landgren et al., 2009; Rawstron et al., 2002; Zenz et al., 2010) et seule une faible proportion de MBL évoluent en LLC (risque de transformation de 1%/an) (Figure 9) (Rawstron et al., 2008).

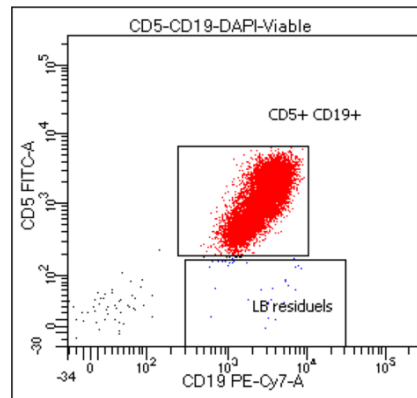


Figure 9 : Immunophénotypage de lymphocytes de LLC. Analyse de cytométrie en flux après marquage par anticorps anti-CD9-PC7 et anti-CD5-FITC. Les lymphocytes de LLC sont CD19+, CD5+.

L'histoire naturelle de la LLC est ensuite constituée de plusieurs stades anatomo-cliniques. La classification de Binet permet de différencier trois stades: stade A (initial), stade B (intermédiaire) et stade C (évolué) (Binet et al., 1981). Ces stades sont déterminés en fonction de l'examen clinique (recherche d'aires ganglionnaires, palpation de la rate) et de l'hémogramme (quantité d'hémoglobine et numération des plaquettes sanguines) (Binet et al., 1981). La majeure partie des patients sont diagnostiqués au stade A et 60% des patients resteront au stade A, sans évolution de la leucémie.

3.5- Pronostic

L'évolution du nombre de lymphocytes dans le sang permet de calculer le temps de doublement lymphocytaire. Un temps de doublement inférieur à un an signe une évolutivité de la maladie de pronostic péjoratif.

Un des principaux facteurs biologique prédictif de l'évolutivité de la maladie est le statut mutationnel des gènes IGVH.

Un statut muté (homologie de moins de 98% par rapport à la séquence germinale) est en faveur d'un bon pronostic de la maladie (médiane de survie de 293 mois), alors qu'un

statut non muté (homologie de 98% ou plus par rapport à la séquence germinale) est de pronostic défavorable (médiane de survie de 95 mois) (Figure 10) (Hamblin et al., 1999).

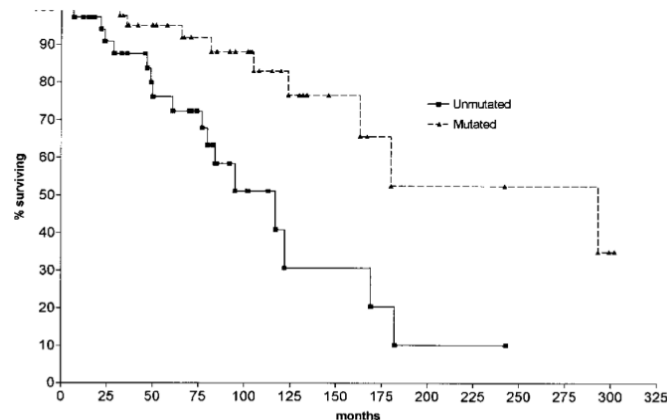


Figure 10 : Courbe de survie de patients atteints de LLC dont les lymphocytes présentent des gènes IGVH mutés ou non mutés. La médiane de survie des LLC avec gènes IGVH non mutés est de 117 mois; la médiane de survie des LLC avec gènes IGVH mutés est de 293 mois (Kaplan-Meier, log-rank test) (Hamblin et al., 1999).

Les lymphocytes de LLC de statut IGVH non muté expriment la protéine ZAP70. Cette protéine physiologiquement exprimée dans la cascade de signalisation du récepteur des lymphocytes T (TCR) favorise la signalisation du BCR dans ces cellules (Figure 11) (Chen et al., 2002). ZAP70 pourrait également renforcer la phosphorylation de SYK et la signalisation du BCR après activation des récepteurs TLR9 de ces cellules dans le microenvironnement lymphoïde (Wagner et al., 2016).

Des anomalies cytogénétiques permettent également de prédire l'évolution de la maladie. La délétion 11q22 (gène ATM), la trisomie 12 ou une délétion 17p13.1 (gène TP53) sont de pronostic péjoratif, alors que la délétion 13q14.3 est associée à un pronostic favorable (Döhner et al., 2000). Les mutations dans les gènes SF3B1, TP53, BIRC3 ou NOTCH1 sont de pronostic défavorable (Chiaretti et al., 2014).

L'expression du CD38 à la surface des lymphocytes de LLC favorise la prolifération lymphocytaire diminue également le pronostic (Damle et al., 1999; Del Poeta et al., 2001; Hamblin et al., 2002).

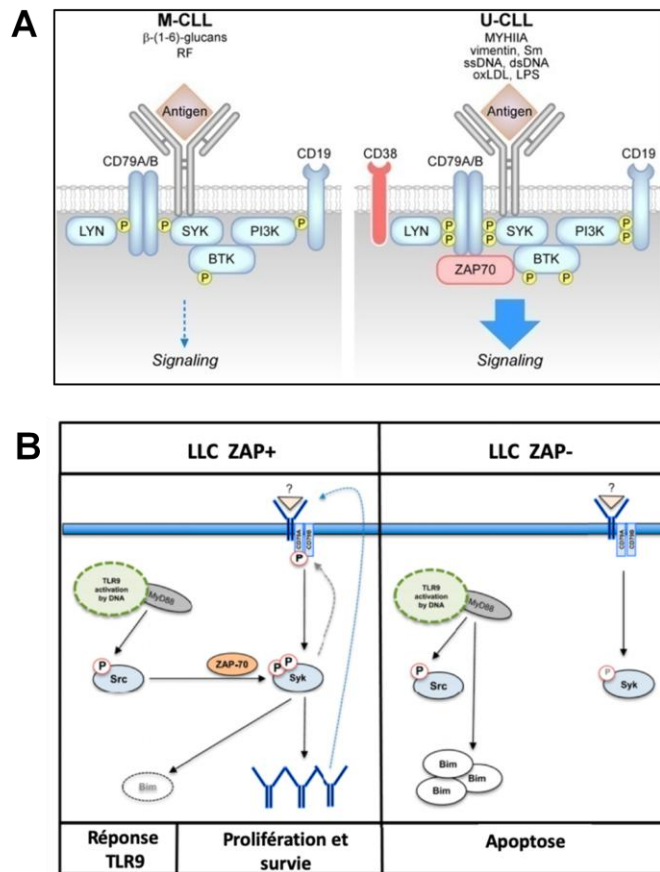


Figure 11 : ZAP70 renforce la signalisation du BCR dans les lymphocytes de LLC. (A) ZAP70 renforce la signalisation après activation du BCR et (B) après activation du TLR9 (Traduit de Wagner et al., 2016).

3.6- Complications

Plusieurs complications peuvent apparaître lors de l'évolution de la LLC. Les infections bactériennes ou virales (60% des complications) sont essentiellement dues à une diminution des lymphocytes B résiduels, accompagnée d'une hypogammaglobulinémie (Nosari, 2012). Les complications auto-immunes (20%) sont dues à une sécrétion d'auto-anticorps par les lymphocytes non tumoraux (Kalil and Cheson, 1999). Ces auto-anticorps induisent des anémies hémolytiques auto-immunes (AIHA) (11%) ou des thrombopénies auto-immunes (6%).

Dans moins de 10% des LLC, une transformation en lymphome de haut grade, ou syndrome de Richter peut être observée. Cette transformation est plus fréquente chez les patients de statut mutationnel non muté ou présentant une délétion 17p (Rossi et al., 2008).

3.7- Surveillance et traitements

Au stade A de la maladie, aucun traitement particulier n'est réalisé et les patients sont suivis régulièrement en consultation avec examen clinique et bilan biologique (hémogramme, électrophorèse des protéines sériques).

En cas d'évolution en stade B/C ou en cas de signes d'évolutivité de la maladie (augmentation du volume des ganglions ou de la rate, apparition de signes généraux), un traitement est alors indiqué.

En l'absence de délétion/mutation de TP53, le traitement de référence consiste dans l'association de deux agents de chimiothérapies, fludarabine (Fludara®) et cyclophosphamide (Endoxan®) associées à un anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab, Mabthera®) (Protocole R-FC). Le cyclophosphamide est un agent alkylant qui crée des liaisons covalentes avec l'ADN inhibant la réplication et induisant l'apoptose cellulaire. La fludarabine est un analogue des purines qui interfère avec la synthèse des acides nucléiques pendant la phase S du cycle cellulaire. Le rituximab est dirigé contre le CD20 qui est spécifiquement exprimé sur les lymphocytes B. Il permet un afflux de calcium intra-cellulaire et provoque une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

En présence d'une délétion/mutation de TP53, ou en cas d'altération de l'état général du patient, des inhibiteurs spécifiques de la voie du BCR peuvent être utilisés tels que l'ibrutinib (inhibiteur spécifique de la protéine BTK) ou l'idelasib (inhibiteur de PI3K). Des inhibiteurs de BCL2 peuvent également être prescrits (Venetoclax®) (Hallek, 2017).

Malgré le développement de ces nouvelles thérapies ciblées, les formes évoluées de LLC restent encore aujourd'hui incurables.

4- Modèles d'étude de la leucémie lymphoïde chronique

4.1- Lignées

A ce jour, il n'existe pas de lignée cellulaire issue de cellules de LLC. Les lignées cellulaires issues de lymphocytes matures sont immortalisées par infection EBV. Dans ces cellules, la protéine LMP2A interfère avec la voie du BCR pour induire la survie

cellulaire. Il n'est donc pas possible d'étudier la réponse à l'activation du BCR dans ces lignées. Dans ce travail de thèse, nous utilisons comme modèle d'étude la lignée BL2, dérivé d'un lymphome de Burkitt, EBV négative (banque DDSMZ, n°ACC 625).

4.2- Modèles murins

Différents modèles murins ont été développés afin d'étudier la LLC *in vivo*.

Dans les souris transgéniques E μ -TCL1, le gène *T-Cell Leukemia 1 family AKT coactivateur A* (TCL1) est exprimé dans la lignée B sous la dépendance de la région régulatrice des Ig (E μ).

En conditions physiologiques, le gène TCL1 est exprimé dans les lymphocytes T où il stimule la phosphorylation puis la translocation nucléaire de la kinase AKT qui favorise la survie et la prolifération cellulaire. Le gène TCL1 peut être impliqué dans la leucémogénèse de leucémie prolymphocytaire en cas de translocation avec des gènes du TCR. Une surexpression de ce gène a été décrite dans des lymphocytes de LLC où il serait associé à une augmentation de la signalisation du BCR (Herling et al., 2006). Dans les souris E μ -TCL1, une expansion de lymphocytes B CD5+ est observée à l'âge de 2 mois dans la cavité péritonéale, à 3-5 mois dans la rate et à 5-8 mois dans la moelle osseuse. La population B initialement polyclonale devient oligoclonale et tardivement (13-18 mois) monoclonale, associée à un envahissement des organes lymphoïdes (Bichi et al., 2002).

Les souris *New Zealand Black* (NZB) présentent une expansion clonale de lymphocytes B1 CD5+ lors de leur vieillissement (Seldin et al., 1987). Cette lymphoprolifération est associée à une infiltration lymphoïde de la rate et une production d'auto-anticorps (IgM) dirigés contre les érythrocytes et l'ADN. Une greffe de ces lymphocytes chez des souris immunodéficientes induit une évolution en lymphome de haut grade (Phillips et al., 1992). La lymphoprolifération B observée dans ces souris est liée à une mutation ponctuelle de miR-16, régulateur négatif du facteur anti apoptotique BCL2 (Scaglione et al., 2007).

4.3- Modèle d'activation du BCR *in vivo*

4.3.1- Les lymphocytes issus du sang périphérique ne prolifèrent pas

En conditions physiologiques, lors de la réponse immune les lymphocytes B prolifèrent dans les organes lymphoïdes secondaires après activation du BCR et costimulation par les lymphocytes T. En dehors de cette situation d'activation, les lymphocytes naïfs ou mémoires sont dans un état de quiescence dans le sang périphérique. Après prélèvement du sang de donneurs sains, ces lymphocytes B entrent rapidement en apoptose (Parker, 1993; Wagner et al., 2000).

Malgré leur caractère tumoral, les lymphocytes issus du sang périphérique de patients porteurs de LLC ne prolifèrent pas spontanément et entrent également rapidement en apoptose lorsqu'ils sont prélevés du sang des patients (Collins et al., 1989; Coscia et al., 2011; McConkey et al., 1991). Différentes conditions de culture ont alors été développées afin de prolonger la survie ou d'induire la prolifération de ces lymphocytes afin de les étudier *ex vivo*.

4.3.2- Conditions de cultures induisant la survie ou la prolifération des lymphocytes B issus de donneurs sains

Différents protocoles d'activation du BCR de lymphocytes B issus de donneurs sains utilisent un anticorps anti-IgM soluble ou un anticorps (Fab'2) anti-IgM. Les résultats montrent cependant qu'une activation isolée du récepteur à l'antigène, en l'absence de signaux de co-stimulation induit une apoptose de ces lymphocytes (McKenzie et al., 1993; Yoshida et al., 2000). Une co-stimulation utilisant des cytokines d'origine T (IL-4, IL-10, IL-21) (Banchereau and Rousset, 1991; Berglund et al., 2013; Parrish-Novak et al., 2000; Rousset et al., 1992) ou une co-culture avec des fibroblastes exprimant le CD40L (Hamilton et al., 2012) sont nécessaires pour induire la survie ou la prolifération de ces lymphocytes sains.

4.3.3- Conditions de cultures induisant la survie ou la prolifération des lymphocytes B de LLC

a- activation isolée du BCR

Plusieurs équipes ont développé des protocoles d'activation du BCR utilisant un anticorps anti-IgM soluble (Bernal et al., 2001; Burger et al., 2009; Herishanu et al., 2011; Longo et al., 2008) ou un anticorps (Fab'2) anti-IgM (Guarini et al., 2008; Vallat et al., 2007; Zupo et al., 2000). Des réponses fonctionnelles variables ont été rapportées avec une augmentation de la survie ou une induction d'apoptose selon les cohortes et les patients analysés. Il est cependant admis qu'une utilisation d'anticorps anti-IgM fixés dans les puits de culture (Deglesne et al., 2006) ou sur des billes (Petlickovski et al., 2005) limite l'apoptose et permet de prolonger la survie des lymphocytes des formes les plus agressives de la LLC.

b- utilisation de cytokines en l'absence d'activation du BCR

L'analyse de l'effet de différentes cytokines isolées (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-15, IL-21) ou du CD40L sur les lymphocytes de LLC n'a pas permis de mettre en évidence une prolifération cellulaire (Aguilar-Hernandez et al., 2016; Ahearne et al., 2013; Bernal et al., 2001; Burger et al., 2009; Caligaris-Cappio, 2003; Dancescu et al., 1992; Douglas et al., 1997; Gutzeit et al., 2014; Kater et al., 2004; Kay et al., 2001; Panayiotidis et al., 1993; Pascutti et al., 2013; Rousset et al., 1992; de Toter et al., 2008; Zheng et al., 2002). Certaines combinaisons de cytokines en culture, telles que CD40L et IL-4, CD40L et IL-2, CD40L et IL-10, ou CD40L, IL-2 et IL-21 ont permis d'obtenir une faible prolifération lymphocytaire (Berglund et al., 2013; Good et al., 2006; Jeppson et al., 1998; Olsen et al., 2015; Punnonen et al., 1997; Recher et al., 2011; Tangye et al., 2003). L'association de CD40L et IL-21 a montré les meilleurs résultats de prolifération (75% en CFSE à 6 jours (Pascutti et al., 2013).

c- activation du BCR associée à des cytokines d'origine T

L'association d'un anticorps anti-IgM avec IL-4, IL-13 ou CD40-L réduit l'apoptose spontanée des lymphocytes de LLC (Bernal et al., 2001). La combinaison d'un anticorps anti-IgM avec l'IL-2 induit une prolifération (Chaouchi et al., 1996).

d- activation du TLR9

Un agoniste du TLR9 induit une augmentation de survie des lymphocytes de LLC dont les gènes IGVH ne sont pas mutés et une apoptose des lymphocytes de LLC avec gènes IGVH mutés (Decker et al., 2000; Schleiss et al., 2019). L'association d'un agoniste du TLR9 avec IL-2 induit une prolifération lymphocytaire (Pascutti et al., 2013).

e- cultures sur cellules nourricières

Différents protocoles de co-cultures *ex vivo* ont été développés, associant des fibroblastes (3T3) exprimant le CD40L (Asslaber et al., 2013; Hamilton et al., 2012; Kater et al., 2004; Pascutti et al., 2013), des lymphocytes T CD4 allo ou autologues activés (Pascutti et al., 2013; Patten et al., 2008), des lymphocytes T CD4 associés à différentes cytokines (IL-4, IL-2, IL-15, IL-21) ou CpG (Decker et al., 2000; Os et al., 2013; Pascutti et al., 2013; de Toter et al., 2006; Tromp et al., 2010). Des cellules stromales médullaires (Lagneaux et al., 1998), éventuellement associées aux cytokines IL-10, IL-2 ou au CD40L (Plander et al., 2009) et des cellules nourricières générées par différenciation myélo-monocytaire (*nurse-like cells*) (Burger et al., 2009; Deaglio et al., 2005) ont également été utilisées. Une survie ou une prolifération des lymphocytes de LLC a été observée dans certaines de ces conditions de culture, mais le rôle respectif de ces différents éléments est difficile à discerner. En effet, des activations de contact et sécrétions (IL-7, IL-6, SCF, TGF β) de ces cellules favorisent également la survie et la prolifération des lymphocytes tumoraux.

Au total, il n'existe pas actuellement de conditions de culture standardisées permettant d'induire la prolifération des lymphocytes de LLC *ex vivo* (Haselager et al., 2020).

5- Modulation de l'expression de gènes

Moduler l'expression de gènes dans les cellules primaires reste aujourd'hui un challenge. Devant l'éclosion et l'espoir de la thérapie génique, de nouvelles méthodes de délivrance d'acide nucléiques se développent mais l'efficacité des méthodes restent souvent très faible. Les cellules souches et les cellules immunitaires restent les cellules primaires les plus difficiles à transfecter.

Plusieurs barrières biologiques contribuent aux difficultés de transfection de certaines cellules : l'interaction des complexes acides nucléiques/agent de transfection avec la cellule, leur internalisation, leur libération dans le cytoplasme, l'entrée dans le noyau, la possibilité d'action de l'acide nucléique, l'état de la cellule (activité métabolique et taux de division)(Stewart et al., 2016).

5.1- Méthodes permettant de moduler l'expression de gènes dans les cellules eucaryotes

5.1.1- Méthodes de délivrance de petites molécules dans les cellules

Il existe plusieurs méthodes de délivrance de petites molécules dans les cellules eucaryotes. Les méthodes physiques consistent à créer des pores au niveau des membranes cellulaires grâce à un champ électrique (électroporation) ou aux ultrasons (sonoporation). Les méthodes chimiques utilisent des lipides ou des polymères cationiques qui se complexent avec la membrane plasmique chargée négativement. Les méthodes virales utilisent des virus inactivés afin de transduire des ARN dans les cellules (Figure 12)(Salameh et al., 2019).

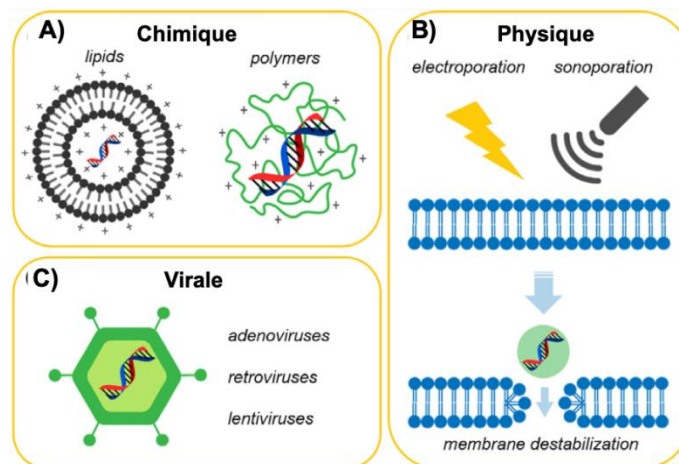


Figure 12 : Représentation schématique des différentes méthodes de délivrance d'un gène (Traduit de Salameh et al., 2019).

a- Méthodes physiques

L'électroporation consiste à déstabiliser de manière temporaire la membrane cellulaire à l'aide d'une impulsion électrique (Neumann and Rosenheck, 1972). Ce courant électrique de 7,5 à 15 kV/cm d'une durée de quelques microsecondes à millisecondes crée des pores hydrophiles dans la membrane plasmique. De petites molécules et de l'ADN (jusqu'à 150 kb) peuvent alors pénétrer dans le cytoplasme de la cellule par diffusion. Les pores se referment ensuite et la membrane récupère son intégrité à la fin de l'impulsion (Kumar et al., 2019).

Avec la sonoporation, des ultrasons sont utilisés pour déstabiliser la membrane plasmique (Fechheimer et al., 1987). En effet, les ultrasons forment des microbulles qui concentrent une énergie et génèrent une contrainte créant des pores cellulaires (Villeneuve et al., 2009).

b- Méthodes chimiques

Des complexes nanométriques formés de lipides ou polymères cationiques peuvent être utilisés pour délivrer des acides nucléiques à l'intérieur des cellules. La structure de base des lipides cationiques est constituée d'un groupement hydrophile chargé positivement et d'une ou deux chaînes hydrocarbonnées. Le groupement hydrophile interagit avec les phosphates chargés négativement des acides nucléiques à transfecter. Le liposome cationique et l'acide nucléique forme un lipoplexe.

Les polymères cationiques sont constitués de polyéthylèneimine (PEI), de groupement imides (PI) ou poly-L-lysine (PLL). Ces polymères cationiques associés à l'acide nucléique forment des polyplexes.

Les lipoplexes et polyplexes interagissent de façon non spécifique avec la membrane plasmique. En effet, ils sont chargés positivement et fixent les acides nucléiques chargés négativement. Ensuite ce complexe lipoplexe/acide nucléique pénètre dans la cellule par endocytose, micropinocytose ou phagocytose (Cardarelli et al., 2016; Neuhaus et al., 2016). Les acides nucléiques sortent alors des endosomes pour rejoindre le cytoplasme cellulaire (Bolhassani and Rafati, 2011; Nayerossadat et al., 2012).

c- Vecteurs viraux

Les virus à ADN (adénovirus, herpes virus) et les virus à ARN (rétrovirus, lentivirus) peuvent être utilisés pour transduire des cellules. Ces virus sont inactivés afin d'inhiber leur réplication dans la cellule hôte (Tableau 2)(Bolhassani and Rafati, 2011).

Vecteur	Génome	Structure	Propriété
Adénovirus	ADN double brin	Capside	Expression transitoire, immunogénicité forte
Alphavirus	ARN	Enveloppe	Expression transitoire, immunogénicité faible
Virus de l'herpès	ADN double brin	Enveloppe	Infection latente, expression à long terme, faible toxicité
Lentivirus	ARN	Enveloppe	Intégration dans le génome, expression à long terme, efficacité à faible dose
Rétrovirus	ARN	Enveloppe	Intégration dans le génome, expression à long terme
Virus adéno associé	ADN simple brin	Capside	Début d'expression lente, intégration dans le génome, expression à long terme, production de virus à grande échelle

Tableau 2 : Les différents vecteurs viraux utilisés pour la délivrance de gènes (Traduit de Bolhassani and Rafati, 2011).

d- Vecteurs hybrides

Les virosomes sont des vésicules composées d'une membrane phospholipidique contenant des protéines dérivées de virus destinées à fusionner avec la membrane plasmique des cellules cibles. Une équipe a ainsi développé un complexe comprenant des liposomes contenant de l'ADN avec le virus hémagglutinant du Japon inactivé ou le virus de la grippe. Les résultats montrent que l'efficacité du transfert de gènes dans les voies respiratoires est plus élevée que les liposomes cationiques ou les vecteurs viraux seuls (Gardlík et al., 2005).

Des protéines virales peuvent également être associées à des vecteurs non viraux. Ainsi, un polymère peut être couplé à une protéine virale comme dans le cas du vecteur commercial Viromer® (www.viromer-transfection.com). La protéine *virion associated protein* (Vpr) issue du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peut être greffée à un peptide (proline avec région C-terminale chargée négativement) et renforçant ainsi la fixation à la membrane plasmique (Janusz and Lisowski, 1993; Tai and Gao, 2017; Vitali, 2015; Yao et al., 1995).

5.1.2- Méthodes de modulation de l'expression de gènes

5.1.2.1- Méthodes ciblant les transcrits d'un gène

a-micro ARN (miRNA)

Découvert en 1993 chez *C. elegans* (Lee et al., 1993), les miRNA sont de petits ARN régulateurs de l'expression des gènes. Ils sont présents naturellement chez les eucaryotes et sont actifs dès le développement embryonnaire. Chez l'Homme, plus de 1000 miRNA ont été décrits, régulant l'expression d'environ 30% des gènes du génome (Wilson and Doudna, 2013).

Chez les mammifères, les miRNA primaires (pri-miRNA) sont transcrits par la polymérase II et transformés en précurseurs miRNA (prémiRNA) par le complexe Drosha/DGCR8.

Le pré-miRNA est ensuite exporté vers le cytoplasme par l'exportin 5 où il interagit avec le complexe *RNA induced silencing complex* (RISC)/TRBP/PACT. Le miRNA mature se fixe ensuite sur Argonaute 2 et RISC puis reconnaît les sites cibles dans la région 3' non traduite (3' UTR) des ARNm. Ceci induit l'inhibition de la traduction et des P-bodies composés d'enzymes de décapping DCP1/2 dégradent les ARNm cibles (Figure 13)(Davidson and McCray, 2011; Kulkarni et al., 2010; Liu et al., 2005; Wilson and Doudna, 2013; Kim and Rossi, 2007).

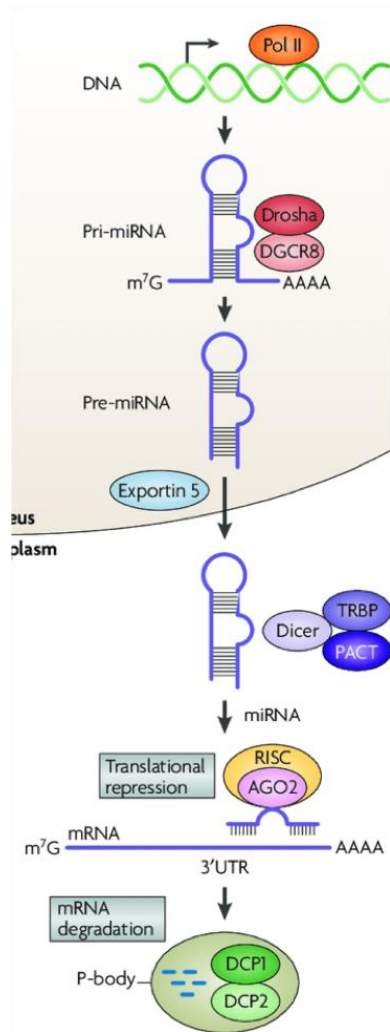


Figure 13 : Mécanisme de l'interférence à l'ARN par les miRNA chez les mammifères. Le pri-miRNA endogène est transcrit et transformé en précurseur miRNA (prémiRNA) qui est transporté dans le cytoplasme. Le miRNA mature cytoplasmique fixé sur le complexe Argonaute2/RISC reconnaît son ARNm cible, bloque sa traduction et induit sa dégradation (Kim and Rossi, 2007).

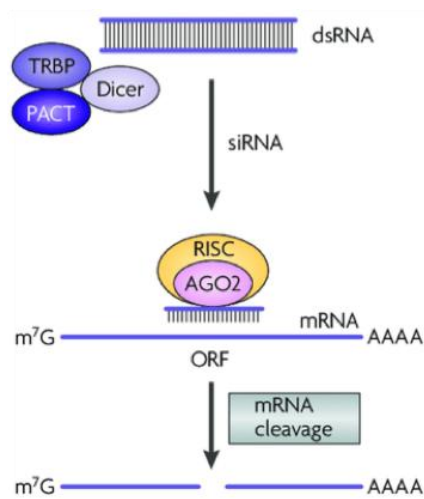


Figure 14 : Mécanisme de l'interférence à l'ARN par siRNA chez les mammifères. Les siARN doubles brins cytoplasmiques sont pris en charge par le complexe Dicer/TRBP/PACT puis chargés sur Argonaute 2 et RISC induisant la reconnaissance et le clivage de l'ARNm cible (Kim and Rossi, 2007).

b- RNA interférence (siRNA)

En 1998, Fire et Mello (Fire et al., 1998) ont montré qu'il est possible d'inhiber spécifiquement l'expression d'un gène chez *C. elegans* après injection d'ARN double brin. Pour cela, ils ont utilisé une souche de *C. elegans* (PD4251) exprimant un plasmide GFP sous contrôle du promoteur myo-3. Après injection d'ARN double brin spécifique de la région promotrice de ce gène, ils ont observé une extinction de la fluorescence, décrivant ainsi le mécanisme d'interférence ARN.

Il est possible de réaliser une interférence ARN à l'aide de siRNA doubles brins de 20-24 nucléotides possédant 2 nucléotides débordants en 3'OH. Une fois dans la cellule, les siRNA ont la capacité d'induire la formation du complexe RISC puis empruntent la voie des miRNA pour provoquer la dégradation de l'ARNm cible (Figure 14) (Davidson and McCray, 2011). Après introduction des siRNA, le mécanisme d'inférence induit la dégradation des ARN en quelques heures et est maximale en 24h (Krzysztoń et al., 2019). Les siRNA sont ensuite dégradés en 48h à 72h (Figure 15) (Rao et al., 2009; Wilson and Doudna, 2013).

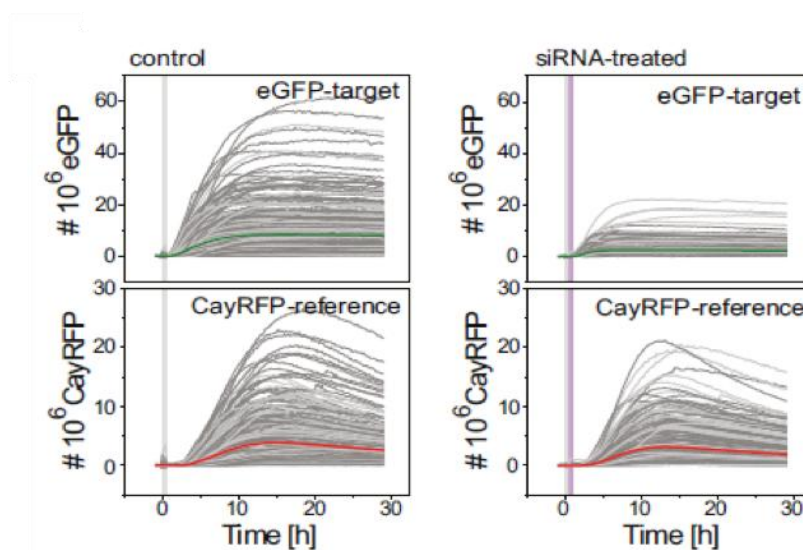


Figure 15: Analyse de la cinétique de dégradation de l'ARNm par un siRNA. Cinétique de la fluorescence au cours du temps de l'eGFP (en haut) et de CayRFP (en bas) dans la lignée Huh-7 en condition contrôle (sans siRNA) et en condition avec siRNA (Krzysztoń et al., 2019).

c- shRNA

Le shRNA est un ARN interférant produit à partir d'un plasmide d'expression. Le plasmide codant le shRNA est introduit dans la cellule et gagne le noyau où il est transcrit par l'ARN polymérase II ou III suivant le promoteur utilisé. Le transcrit primaire (Pri-shRNA) contient une structure en épingle à cheveux qui est transformée en pre-shRNA par l'enzyme RNase III drosha et la protéine DGCR8. Cet ARN est ensuite exporté dans le cytoplasme où il subit une maturation grâce au complexe DICER/TRBP/PACT. Le siRNA mature résultant de la maturation est compacté et s'associe avec argonaute. Le brin passager est dégradé et le brin antisens à l'ARNm est chargé sur RISC induisant le clivage puis la dégradation de l'ARNm (Mohr et al., 2014; Rao et al., 2009). Un faible nombre de copies de shRNA dans le noyau permet d'obtenir une diminution d'expression du gène cible. De plus, l'expression de shRNA peut persister trois jours dans la cellule (Rao et al., 2009).

5.1.2.2- Méthodes ciblant le génome

Il est possible d'inhiber l'expression d'un gène en agissant au niveau de l'ADN à l'aide de nucléases (Adli, 2018). Il existe plusieurs familles de nucléases développées en laboratoire, dont les méganucléases, les nucléases à doigt de zinc (ZFN), les nucléases activatrices de transcription (*transcription activator-like effector nuclease*, TALEN) et le système *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/caspase 9* (CRISPR/Cas9). Les nucléases peuvent avoir plusieurs effets au niveau du génome (délétion, inversion, translocation)(Joung and Sander, 2013). Les paragraphes suivants décrivent ces nucléases avec leur mécanisme moléculaire.

a- ZFN

Les nucléases ZFN ont été les premières nucléases utilisées pour modifier le génome. Elles résultent de la fusion d'une nucléase ZFN à doigts de zinc avec l'endonuclease FokI. Cette dernière est une enzyme de restriction retrouvée naturellement chez *Flavobacterium okeanoikoites*. Deux monomères de FokI doivent être recrutés au niveau d'une séquence d'ADN d'intérêt afin de générer une coupure de l'ADN, ce qui augmente la spécificité de l'enzyme (Figure 16) (Doudna and Sontheimer, 2014). Une nucléase ZFN, visant le récepteur de chimiokine CCR5, corécepteur permettant l'entrée du virus du VIH dans les cellules est actuellement en essai clinique (Marintcheva, 2018).

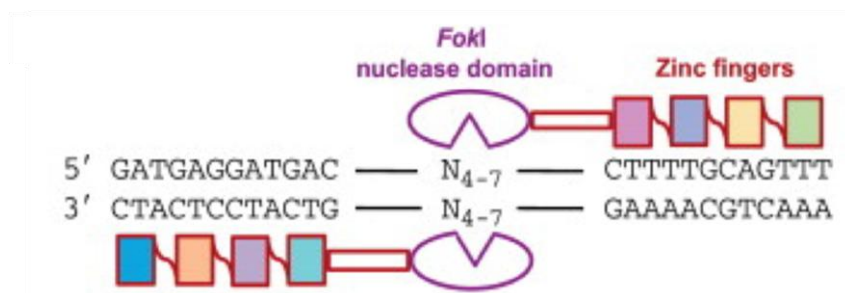


Figure 16 : Structure de la nucléase programmable ZFN et son positionnement au niveau de l'ADN cible (Doudna and Sontheimer, 2014).

b- TALEN

Les nucléases TALEN dérivent de la molécule *transcription activator-like effectors* (TALE) sécrétée par la bactérie *Xanthomonas*. Les TALEN sont composées d'un domaine de reconnaissance de l'ADN TALE fusionné avec la nucléase Fok1. Chaque domaine TALE contiennent 7 à 34 répétitions de 33-35 acides aminés hautement conservées. Dans chaque répétition, en position 12-13 une répétition variable assure la spécificité de liaison à l'ADN (Figure 17)(Doudna and Sontheimer, 2014). Chaque TALE reconnaît 15 à 20 paires de bases ce qui augmente la spécificité de reconnaissance (Boettcher and McManus, 2015). Deux monomères de TALE se fixent à l'ADN, induisant la dimérisation de deux nucléases Fok1 puis le clivage de l'ADN (Doudna and Sontheimer, 2014). Les TALEN ont par exemple été utilisés pour inactiver le récepteur de la lipoprotéine LDL dans un modèle animal, ce qui induit une hypercholestérolémie (Joung and Sander, 2013).

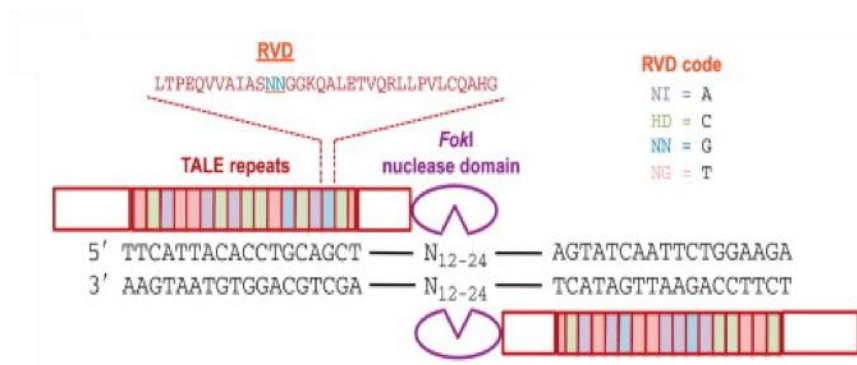


Figure 17 : Structure de la nucléase programmable TALEN et son positionnement au niveau de l'ADN cible (Doudna and Sontheimer, 2014).

c- CRISPR Cas9

La technologie CRISPR-Cas9 utilise aussi une endonucléase. En 2011, l'équipe allemande d'Emmanuelle Charpentier avec l'aide de l'équipe américaine de Jennyfer Doudna ont permis le développement de la technologie du CRISPR-Cas9 à partir de leurs travaux sur les mécanismes bactériens de résistance aux virus ou phages faisant intervenir les gRNA, les protéines Cas9 et CRISPR dans le génome de *Streptococcus pyogenes*. Le gRNA comprend un crRNA et un tracrRNA qui permet la maturation du crRNA par la RNase III. Le gRNA mature reconnaît des fragments d'ADN étranger à cette bactérie et potentiellement pathogène. Cas9 est une endonucléase monomérique permettant de cliver l'ADN. CRISPR est une région caractérisée par de courtes répétitions de 21 à 37 paires de bases régulièrement espacées par des séquences de 20 à 40 paires de bases. Le complexe formé par tracrRNA, Cas9 et CRISPR permet ainsi de dégrader les ADN pathogènes (Figure 18)(Doudna and Charpentier, 2014).

A partir de ces éléments présents naturellement chez *Streptococcus pyogenes* il a été possible d'associer un ARN guide spécifique du gène d'intérêt (sgRNA) à l'enzyme Cas9 (Boettcher and McManus, 2015). La séquence cible de l'ADN est bordée de motifs PAM présents dans la région 3' de la séquence d'intérêt (Boettcher and McManus, 2015). La Cas9 permet alors une coupure double brin de l'ADN (Jiang and Doudna, 2017).

Après coupure de l'ADN double brin par les nucléases ZFN, TALEN ou Cas9, le système de réparation non homologue de l'ADN (*non homologous end joining*) répare la cassure double brin de l'ADN. Ces mécanismes introduisent alors des mutations, des insertions ou des délétions de nucléotides lors de la réparation ce qui peut induire une inactivation du gène ciblé (Figure 19)(Doudna and Sontheimer, 2014).

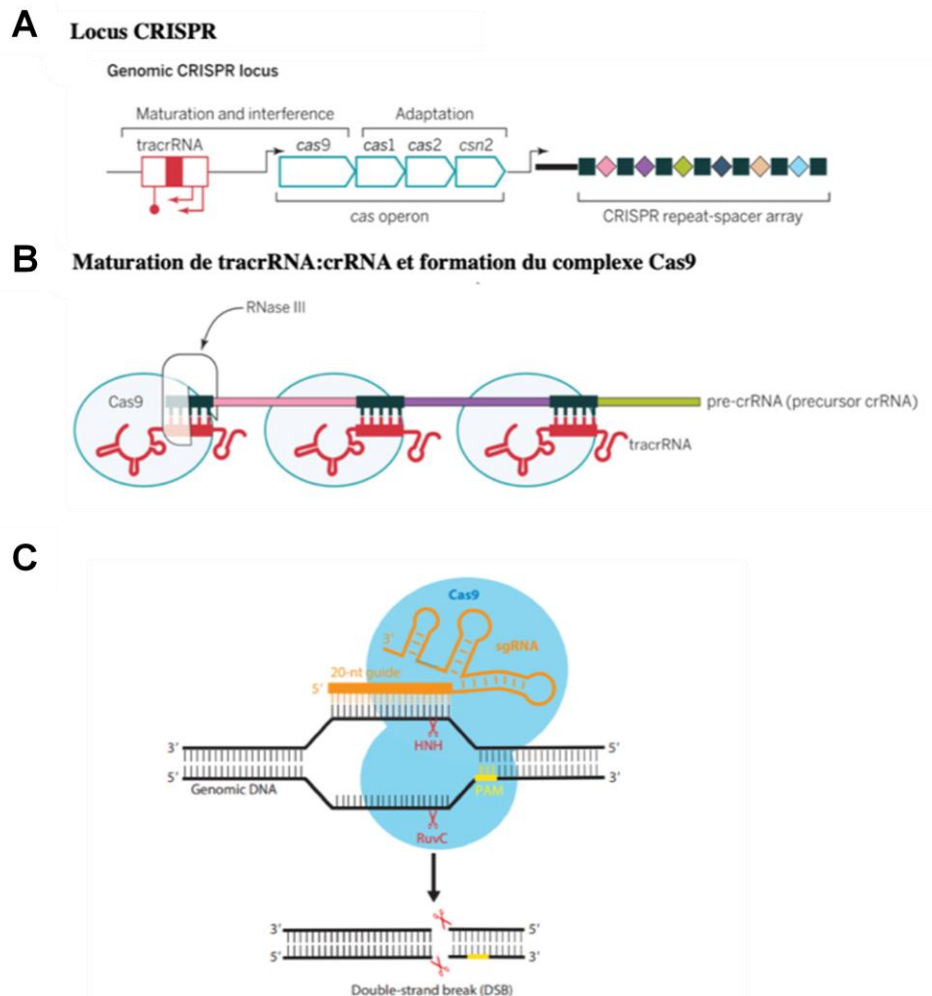


Figure 18 : CRISPR Cas 9 (A) Structure du locus CRISPR-Cas9 chez *Streptococcus pyogenes*; (B) mécanisme de maturation de tracrRNA (Doudna and Charpentier, 2014); et (C) mécanisme moléculaire de Cas9 humanisé (Jiang and Doudna, 2017).

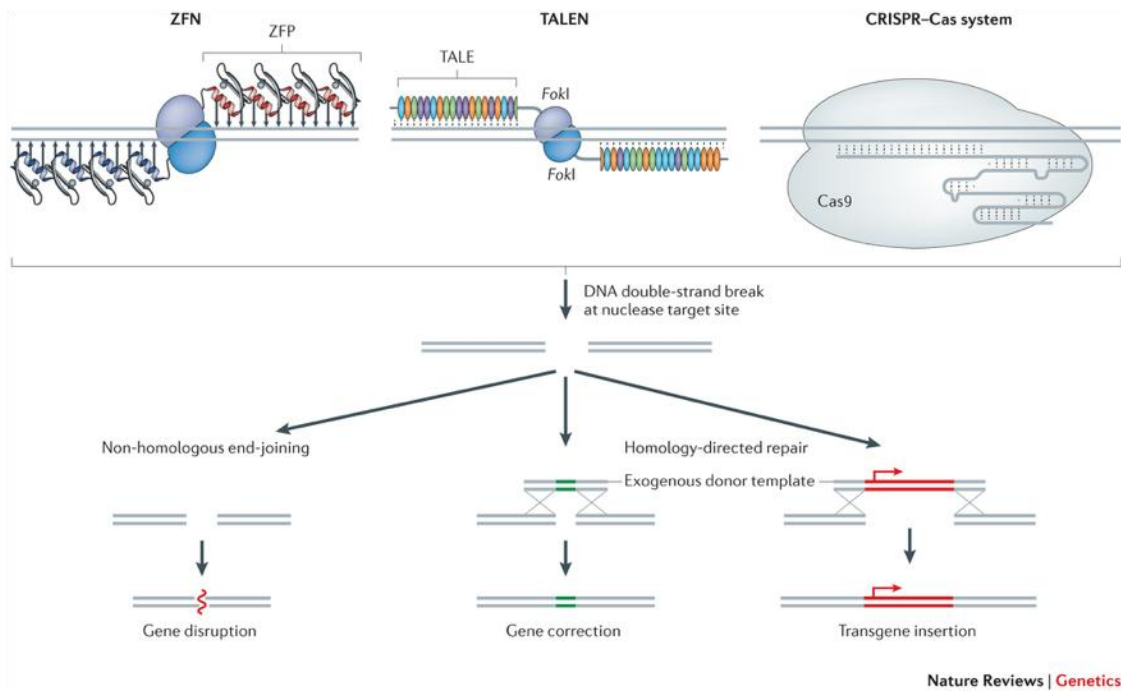


Figure 19 : Mécanismes effecteurs des ZFN, TALEN et du système CRISPR-Cas9 (correction, délétion ou insertion) (Yin, Nat. Rev. Genet. 2014).

5.2- Efficacité des méthodes de modulation d'expression de gènes dans les cellules primaires

5.2.1- Efficacité de délivrance de petites molécules dans les cellules primaires

Plusieurs études ont utilisé des protéines fluorescentes pour évaluer l'efficacité de délivrance de petites molécules dans des cellules primaires humaines. L'efficacité a alors été analysée par cytométrie en flux, microscopie à fluorescence ou western-blot (Tableau 3).

Type cellulaire	Gène rapporteur	Méthode délivrance	% Fluorescence du gène rapporteur
-----------------	-----------------	--------------------	-----------------------------------

Lymphocytes primaires non tumoraux

Schallon et al., 2012	Lymphocyte T	GFP	Electroporation	10 (à 48h) (CMF)
Zhao et al., 2006	Lymphocyte T	GFP	Electroporation	95 (à 48h) (CMF)
Shih et al., 2019	Lymphocyte B naïf	siGlo	Electroporation	27 (à 48h) (CMF)
Schallon et al., 2012	Lymphocyte T	GFP	Nanoparticule (Polymère)	25 (CMF)
Mock et al., 2012	Lymphocyte B	GFP	Virale (Lentivirus)	55 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Frecha et al., 2010	Lymphocyte T et B	GFP	Virale (Lentivirus)	37 (à 72h) (CMF)
Keim et al., 2011	Lymphocyte B	GFP	Virale (Rétrovirus)	23 (à 48h) (CMF)

Lymphocytes primaires tumoraux

Bürgler et al., 2015	Lymphocyte B de LLC	GFP	Electroporation	23 (CMF)
Endo et al., 2007	Lymphocyte B de LLC	GFP	Electroporation	42 (24h) (CMF)

Autres cellules primaires non tumorales

Gresch et Altrogge, 2012	Cellule de sang de cordon	GFP	Electroporation	60 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Welter et al., 2004	Chondrocyte	Luciférase	Electroporation	60 (72h) (Test luciférase)
Marine et al., 2012	Neurone (rat)	GFP	Electroporation	90 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Zeitelhofer et al., 2009	Neurone de l'hippocampe	GFP	Electroporation	80 (à 78h) (Microscope à fluorescence)
Kirton et al., 2013	Neurone de ganglion dorsal (rat)	GFP	Electroporation	80 (à 78h) (Microscope à fluorescence)
Buchser et al., 2006	Neurone	GFP	Electroporation	35 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Fülber et al., 2014	Cellule stromale du tissu adipeux (rat)	GFP	Electroporation	80 (à 72h) (Microscope à fluorescence)
Hyder et al., 2020	Fibroblaste (bovin)	GFP	Electroporation	24 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Smith et al., 2016	Cellule dendritique plasmacytoïde	siGLO-DY-547	Electroporation	30 (à 4h) (CMF)
Ensenauer et al., 2011	Fibroblaste murin	FITC	Hybride (Magnétofection+Lipide cationique)	58 (à 24h) (CMF)
Buerli et al., 2007	Neurone	GFP	Hybride (Magnétofection+Lipide cationique)	59 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
de Carvalho et al., 2018	Cellule mésenchymateuse stromale	GFP	Lipide cationique	20 (à 48h) (Microscope à fluorescence)
Hunt et al., 2010	Cellule de sang de cordon	GFP	Lipide cationique	20 (à 24h) (CMF)
Landin et al., 2005	Cellule de la langue (souris)	GFP	Lipide cationique	15 (à 16h) (Microscope à fluorescence)
Ramachandran et al., 2013	Cellule épithéliale des voies aériennes	Cyanine 3	Lipide cationique	90 (à 48h) (CMF)
Ensenauer et al., 2011	Fibroblaste murin	FITC	Lipide cationique	72 (à 24h) (CMF)
Smith et al., 2016	Cellule dendritique plasmacytoïde	siGLO-DY-547	Lipide cationique	35 (à 4h) (CMF)
Wang et al., 2018	Myoblaste	GFP	Lipide cationique	90 (Microscope à fluorescence)
Przybylski et al., 2017	PBMC	Alexa488	Lipide cationique	50 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Peng et al., 2016	Cellule souche mésenchymateuse (rat)	Cyanine 3	Nanoparticule	80 (à 9h) (CMF)
Sapet et al., 2011	Cellule souche neuronale	DsRed	Nanoparticule	15 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Tierney et al., 2013	Cellule souche mésenchymateuse	GFP	Nanoparticule	40 (à 72h) (Microscope à fluorescence)
Przybylski et al., 2017	PBMC	FAM	Nanoparticule	35 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Subia et al., 2019	Cellule épithéliale de la rétine	GFP	Nanoparticule (CRHC)	20 (à 48h) (Test luciférase)
Li et al., 2016	PBMC	Cyanine 3	Nanoparticule (Ferritine)	90 (à 48h) (Microscope à fluorescence)
Leus et al., 2014	Cellule endothéliale vasculaire	Alexa546	Nanoparticule (Lipoplexes)	30 (à 4h) (Microscope à fluorescence)
Subia et al., 2019	Cellule épithéliale de la rétine	GFP	Nanoparticule (MGPE-9)	55 (à 48h) (Test luciférase)
Morris et Labhasetwar, 2015	Neurone	Luciférase	Nanoparticule (Polyplexes)	90 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Jin et al., 2018	Neurone (rat)	GFP	Nanoparticules (PEI)	60 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Frenster et al., 2018	Cellule de schwann (rat)	GFP	Virale (Lentivirus)	90 (à 15) (Microscope à fluorescence)
Smith et al., 2016	Cellule dendritique plasmacytoïde	GFP	Virale (Lentivirus)	80 (à 48h) (CMF)
Cardona Gloria et al., 2018	Macrophage médullaire (souris)	GFP	Virale (Rétrovirus)	50 (anti-GFP en WB)

Autres cellules primaires tumorales

Larsen et al., 2011	Leucémie aigue myéloïde	FITC	Electroporation	27 (à 24h) (CMF)
Hagemann et al., 2017	Cellule de gliome	GFP	Electroporation	40 (48h) (nd)
Maresch et al., 2016	Test in vivo sur tumeur du pancréas	GFP	Electroporation	50 (à 48h) (Microscope à fluorescence)
Poulain et al., 2000	Cellule de cancer ovarien	Luciférase	Nanoparticule	70 (24h) (Test luciférase)
Wiesner et al., 2009	neurone (souris)	Luciférase	Nanoparticule	60 (à 48h) (CMF)
Curley et al., 2020	Cellule de glioblastome (souris)	Cyanine 5	Nanoparticule	60 (Microscope à fluorescence)
Poulain et al., 2000	Cellule de cancer ovarien	Luciférase	Nanoparticule	47 (24h) (Test luciférase)
Etrych et al., 2019	Test in vivo dans tumeur du colon (souris)	Dy676	Nanoparticule	90 (Cinétique)
Yang et al., 2013	Tumeur métastatique (poumon et foie)	Luciférase	Nanoparticule	65 (24h) (Test luciférase)
Haber et al., 2017	Test in vivo sur tumeur (souris)	pTracer-PEX	Ultrason	84 (à 24h) (Microscope à fluorescence)
Frenster et al., 2018	Cellule de glioblastome	GFP	Virale (Lentivirus)	80 (à 30h) (CMF)
Meel et al., 2018	Cellule de glioblastome	GFP	Virale (Lentivirus)	80 (à 15) (CMF)
Nicholson et al., 2005	Cellule d'ostéosarcome	GFP	Virale (Lentivirus)	80 (à 48h) (CMF)

Tableau 3 : Efficacité de délivrance de petites molécules dans les cellules primaires. Pourcentage de délivrance du rapporteur fluorescent dans des lymphocytes primaires (tumoraux et non tumoraux) (n=9) et autres cellules primaires (tumoraux et non tumoraux) (n=44).

Parmi les études ayant effectué une transfection de lymphocytes primaires non tumoraux avec un rapporteur fluorescent, nous avons identifié trois équipes qui ont utilisé une méthode d'électroporation et ont obtenu une efficacité de délivrance moyenne de 44% [min. 10% - max. 95%]. Une étude utilisant des nanoparticules n'a obtenu que 25% d'efficacité. Des vecteurs viraux (lentivirus ou rétrovirus) ont été utilisés dans trois autres études avec une efficacité moyenne de 38% [23% - 55%].

Une méthode d'électroporation a également été utilisée dans deux études pour transfecter des lymphocytes primaires tumoraux (LLC), avec une efficacité moyenne de 23% et 42% respectivement.

Nous avons également retrouvé 45 études ayant procédé à des transfections de cellules primaires humaines non lymphoïdes (saines ou tumorales) suivies d'une évaluation de l'efficacité de délivrance par rapporteur fluorescent. Les meilleurs résultats de délivrance ont été obtenus en utilisant des méthodes virales (6 études/45) qui ont permis d'obtenir une efficacité de délivrance de 75% [50% - 90%]. Les méthodes utilisant des nanoparticules (16 études/45) ont montré une efficacité de 57% [15% - 90%], proche de l'efficacité de 55% [24% - 90%] obtenue avec les méthodes d'électroporation (12 études/45). Les lipides cationiques (8 études/45) ont permis d'obtenir 49% de délivrance [15% - 90%] et les vecteurs hybrides (2 études/45) de 58% et 59%.

En résumé, les résultats de ces études réalisées dans différents types de cellules primaires montrent une efficacité de délivrance moyenne de 63% avec les vecteurs viraux, suivie en ordre décroissant par les lipides cationiques (49%), les nanoparticules (47%) et l'électroporation (43%). La différence d'efficacité de délivrance observée entre les méthodes virales et lipidiques n'est cependant pas significative (Figure 20). La comparaison de l'efficacité de délivrance obtenue pour les lymphocytes primaires et celle obtenue pour les autres cellules primaires non lymphoïdes est difficile à apprécier compte tenu du faible nombre d'études réalisées avec des lymphocytes. Il semble cependant exister une tendance pour une efficacité de délivrance moins importante dans les lymphocytes primaires par rapport aux autres cellules primaires (Figure 20).

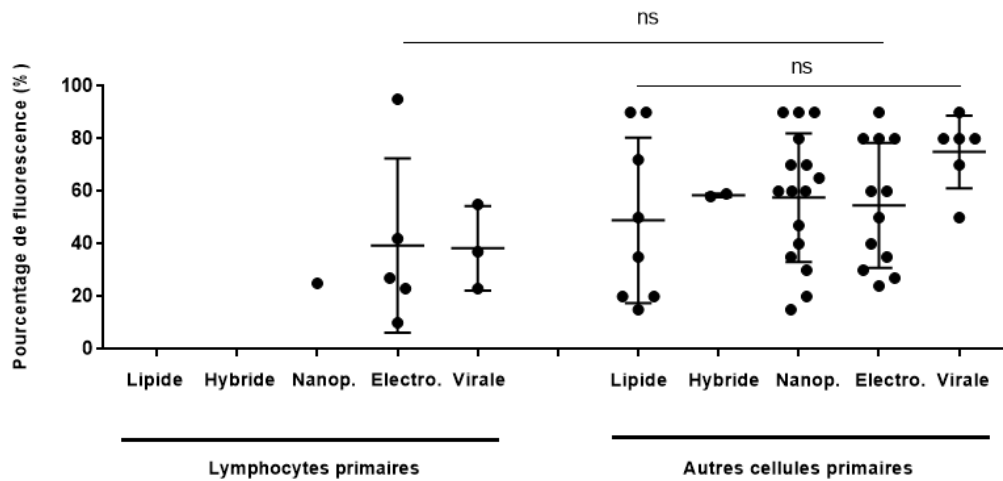


Figure 20 : Efficacité de délivrance de petites molécules dans les cellules primaires. Pourcentage de délivrance du rapporteur fluorescent dans des lymphocytes primaires (tumoraux et non tumoraux) (n=9) et autres cellules primaires (tumoraux ou non) (n=44) avec les vecteurs de type lipidique, des nanoparticules, l'électroporation, des vecteurs viraux et des vecteurs hybrides.

5.2.2- Efficacité de silencing de gènes dans des cellules primaires

Afin d'évaluer l'efficacité de différentes méthodes de diminution d'expression de gènes (silencing), nous avons analysé les résultats d'expériences réalisées à l'aide de lymphocytes primaires (tumoraux ou non tumoraux) (Tableau 4).

Type cellulaire	Gène cible	Méthode délivrance	Méthode de silencing	% silencing	% silencing (PROTEINE)
-----------------	------------	--------------------	----------------------	-------------	------------------------

Lymphocytes primaires non tumoraux

Seki and Rutz, 2018	Lymphocyte T	CTLA4	Electroporation	gRNA CRISPR Cas9	nd	90 (à 72h) (CMF)
Bálint et al., 2020	Lymphocyte T cytotoxique	TSP1	Nanoparticule	gRNA CRISPR Cas9	nd	60 (WB)
Shih et al., 2019	Lymphocyte B naïf	IRF4	Electroporation	siRNA (1,5µM)	nd	50 (à 48h) (CMF)
Eguchi et al., 2009	Lymphocyte T (souris)	CD4	Nanoparticule	siRNA (100nM)	60 (à 6h)	nd
Santarasci et al., 2014	Lymphocyte TH17	IL4I1	Electroporation	siRNA (3uM)	75 (à 72h)	nd
Santarasci et al., 2012	Lymphocyte TH17	IL4I1	Electroporation	siRNA (3uM)	65 (à 72h)	nd

Lymphocytes primaires tumoraux

Shukla et al., 2016	Lymphocyte de LLC	SPRY2	Electroporation	miRNA	nd	40 (Cellule)
Yang et al., 2018	Lymphocyte de LLC	mir285p et mir650	Lipide cationique	miRNA (100nM)	42	nd
Shalek et al., 2012	Lymphocyte de LLC	LEF1	Nanoparticule	siRNA	nd	90 (IHC)
Vallat et al., 2013	Lymphocyte de LLC	DUSP1	Electroporation	siRNA (100nM)	40 (à 16h)	nd
Mittal et al., 2013	Lymphocyte de LLC	CTLA4	Lipide cationique	siRNA (100nM)	nd	20 (à 72h) (WB)
Billot et al., 2011	Lymphocyte de LLC	AIOLOS	Accell	siRNA (1uM)	50 (à 72h)	nd
Kokhaei et al., 2018	Lymphocyte de LLC	KLF6	Accell	siRNA (1uM)	90 (à 48h)	nd
Jahrsdörfer et al., 2002	Lymphocyte de LLC	BCL2	Lipide cationique	siRNA (1uM)	nd	40 (à 16h) (WB)
Amigo-Jiménez et al., 2015	Lymphocyte de LLC	MCL1	Electroporation	siRNA (200-	nd	50 (à 24h) (WB)
Choudhury et al., 2010	Lymphocyte de LLC	FMOD-ROR1	Lipide cationique	siRNA (2uM)	75 (à 24h)	nd
Simon-Gabriel et al., 2018	Lymphocyte de LLC	RELA	Electroporation	siRNA (2uM)	nd	20 (à 24h) (CMF)
Liu et al., 2016	Lymphocyte de LLC	STAT3-RELA	Electroporation	siRNA (2µg)	nd	50 (à 18h) (WB)
El-Khoury et al., 2014	Lymphocyte de LLC	ATG5-LC3B	Electroporation	siRNA (350pmol)	nd	31 (CMF)
van Attekum et al., 2017	Lymphocyte de LLC	MCL1	Electroporation	siRNA (3uM)	nd	80 (à 72h) (WB)
Porpacz et al., 2013	Lymphocyte de LLC	LPL	Lipide cationique	siRNA (60pmol)	25	nd

Autres cellules primaires non tumorales

Yoshida et al., 2011	Cellule musculaire lisse de l'aorte	TSP2	Lipide cationique	siRNA	70 (à 48h)	nd
Hazzan et al., 2017	Mastocyte cutané	GAPDH	Accell	siRNA	80 (48h)	nd
Ensenauer et al., 2011	Fibroblaste (souris)	ACAD9	Hybride (Mannoféction-Lipide)	siRNA	90	nd
Ensenauer et al., 2011	Fibroblaste (souris)	ACAD9	Lipide cationique	siRNA	80	nd
Yu et al., 2013	Macrophage médullaire (souris)	PPIB	Lipide cationique	siRNA	95 (à 24h)	nd
Yu et al., 2013	Macrophage médullaire (souris)	PPIB	Nanoparticule	siRNA	90 (à 24h)	nd
Przybylski et al., 2017	PBMC	Ki67	Nanoparticule	siRNA	35 (à 24h)	nd
Przybylski et al., 2017	PBMC	Ki67	Lipide cationique	siRNA	25 (à 24h)	nd
Kew et al., 2017	Cellule CD34+	ELK1	Viromer	siRNA	nd	90 (à 48h) (WB)
Klose et al., 2019	Macrophage de sang total	SNX1/3	Viromer	siRNA (100nM)	nd	90 (à 48h) (WB)
Hadadi et al., 2016	Monocyte de sang total	Hsp27-HSPB1	Viromer	siRNA (100nM)	nd	90 (à 24h) (WB)
Ramachandran et al., 2013	Cellule épithéliale (VADS)	HPRT	Lipide cationique	siRNA (100nM)	60 (à 24h)	nd
Makki et al., 2017	Chondrocyte	TUT1/2	Lipide cationique	siRNA (100nM)	85 (à 24h)	nd
Eguchi et al., 2009	Cellule de sang de cordon	GAPDH	Nanoparticule	siRNA (100nM)	90 (à 6h)	nd
Smith et al., 2016	Cellule dendritique plasmacytoïde	TLR7-IRF7	Lipide cationique	siRNA (160nM)	nd	60 (à 24h) (CMF)
Li et al., 2016	PBMC	InsR	Nanoparticule (Ferritine)	siRNA (25nM)	nd	45 (à 72h) (WB)
Paijo et al., 2016	Monocyte de sang total	cGAS	Viromer	siRNA (43nM)	nd	90 (à 48h) (WB)
Asgeirsdóttir et al., 2010	Cellule de sang de cordon	VE-cadherin - CD31-TNFR2	Nanoparticule (Lipoplexe)	siRNA (60pmol)	55 (à 72h)	nd
Xu et al., 2020	Monocyte de sang total (souris)	KLF4	Viromer	siRNA (75nM)	85 (à 24h)	nd

Autres cellules primaires tumorales

Serçin et al., 2019	Cellule tumorale de poumon	PLK1	Lipide cationique	gRNA CRISPR Cas9	nd	50 (à 40h) (Micro. à fluo)
Maresch et al., 2016	xénogreffe tumeur du pancréas	Locus CDKN2a	Electroporation	gRNA CRISPR Cas9	67	nd
Wang et al., 2019	xénogreffe cancer de prostate	Récepteur	Ultrason	shRNA (2µg)	nd	37 (taille tumeur)
Medarova et al., 2007	xénogreffe cancer colorectal	SURVIVINE	Nanoparticule	siRNA	97 (à 24h)	nd
Huang et al., 2009	xénogreffe cancer ovaire	CLDN3	Lipide cationique	siRNA	nd	60 (WB)
Yu et al., 2017	xénogreffe de glioblastome	SOX2-OLIG2-SALL2-POU3F2	Nanoparticule	siRNA	nd	40 (72h) (taille tumeur)
Sakurai et al., 2018	Cellule de cancer du poumon	VEGFR2	Nanoparticule	siRNA	50 (à 24h)	nd
Larsen et al., 2011	Cellules leucémie aigue myéloïde	CyclophilinB et CD96	Accell	siRNA	82 (à 24h) (CMF)	nd
Larsen et al., 2011	Cellules leucémie aigue myéloïde	CyclophilinB et CD96	Electroporation	siRNA	37 (à 24h) (CMF)	nd

Tableau 4 : Efficacité de silencing de gènes cibles dans des cellules primaires. Pourcentage de diminution de l'expression du gène cible dans des lymphocytes primaires (tumoraux et non tumoraux) (n=19) et autres cellules primaires (tumoraux ou non) (n=27).

Parmi les 17 études ayant utilisé un siRNA, 8/17 ont quantifié l'effet du silencing par PCR quantitative ont mis en évidence une diminution moyenne du transcrit ciblé de 63% [25% - 90%]. Dans les 9 autres études, l'efficacité de silencing a été évaluée en mesurant l'abondance de la protéine codée par le gène cible (par cytométrie en flux, western-blot ou immuno-histochimie). Ces dernières ont montré une diminution moyenne d'abondance protéique de 49% [20% - 90%]. Les deux études utilisant la méthode CRISPR/CAS9 dirigée contre les gènes TSP1 et CTLA4 ont permis de diminuer l'abondance de la protéine de 60% et 90% (mesuré par western-blot ou cytométrie en flux respectivement).

Par ailleurs, nous avons analysé les résultats d'expériences de silencing réalisées dans des cellules primaires humaines non lymphoïdes (tumorales ou non tumorales).

Parmi les 26 études utilisant des siRNA, la diminution d'expression du transcrit (mesurée dans 18/26 études) était en moyenne de 70% [25% - 97%] et la diminution d'abondance protéique (mesurée dans 8/26 études) était de 64% [40% - 90%]. Une étude ayant utilisé la méthode CRISPR/CAS9 a permis d'obtenir une diminution d'abondance protéique de 50% (mesurée en microscopie à fluorescence).

Dans ces différentes études, la quantification de l'ARN du gène cible est généralement mesurée 24h après transfection et celle des protéines après 48-72h.

Ces résultats suggèrent que l'efficacité de diminution d'expression dans les lymphocytes primaires peut être identique à celle obtenue dans les autres cellules primaires non lymphoïdes (Figure 21).

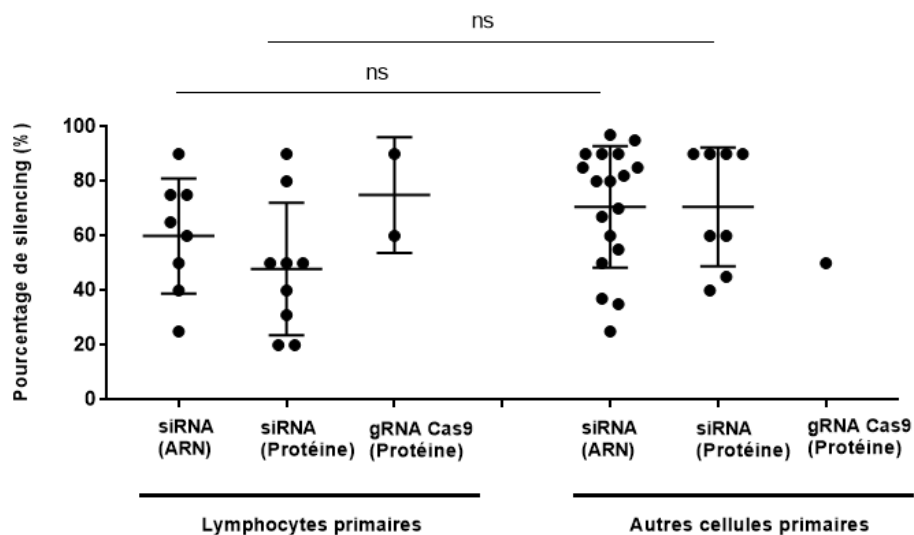


Figure 21 : Efficacité de silencing de gènes cibles dans des cellules primaires. Pourcentage de diminution de l'expression du gène cible dans des lymphocytes primaires (tumoraux et non tumoraux) (n=19) et dans d'autres cellules primaires (tumoraux ou non) (n=27) après transfection de siRNA (diminution d'expression du gène cible quantifié par qPCR ou WB) ou le système CRISPR-Cas9 (quantifié par WB).

5.2.3- Comparaison entre l'efficacité de délivrance et l'efficacité de silencing de gènes

Parmi les études citées précédemment, certaines ont conjointement transfecté un rapporteur fluorescent et une petite molécule de silencing (3 expériences réalisées en même temps et 5 réalisées successivement) (Tableau 5). Malgré le faible nombre d'expériences et la disparité des cellules et des méthodes utilisées, la corrélation entre les pourcentages de délivrance et de silencing reste faible (Figure 22).

Méthode de délivrance	% de délivrance	% silencing (ARN ou protéine)	Mesure concomitante de la délivrance et du silencing	Référence
Electroporation (siGlo)	27	50	Oui	Shih et al., 2019
Hybride (FITC)	58	90	Oui	Ensenauer et al., 2011
Lipide cationique (FITC)	72	80	Oui	Ensenauer et al., 2011
Virale (GFP)	80	60	Non	Smith et al., 2016
Nanoparticule (FAM)	35	35	Non	Przybylski et al., 2017
Lipide cationique (Alexa 488)	50	25	Non	Przybylski et al., 2017
Electroporation (FITC)	27	37	Non	Larsen et al., 2011
Electroporation (FITC)	50	67	Non	Maresh et al., 2016

Tableau 5 : Comparaison entre l'efficacité de délivrance et l'efficacité de silencing de gènes. Mesure du pourcentage de délivrance et du pourcentage de silencing avec différentes méthodes de délivrance dans des cellules primaires tumorales ou non (n=8).

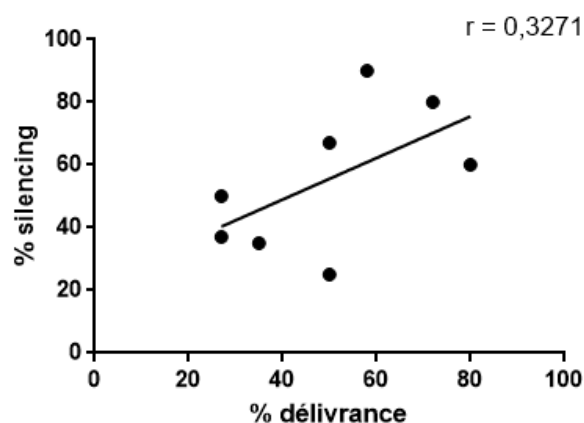


Figure 22 : Comparaison entre l'efficacité de délivrance et l'efficacité de silencing de gènes. Comparaison (lors de la même expérience) entre le pourcentage de délivrance d'un marqueur fluorescent et le pourcentage de diminution d'expression du gène cible ou de sa protéine (n=6).

B- Résultats préliminaires de l'équipe

La thématique de mon équipe porte sur l'étude de la leucémogenèse des lymphoproliférations B matures et notamment la LLC. Le premier objectif de l'équipe a consisté à caractériser les anomalies de réponse à l'activation du BCR qui soutiennent la prolifération lymphocytaire leucémique. Après avoir caractérisé ces anomalies transcriptionnelles, le deuxième objectif consiste à moduler cette réponse cellulaire afin de diminuer la prolifération dans un but thérapeutique.

La méthodologie générale qui a été adoptée pour caractériser la réponse cellulaire aberrante des lymphocytes de LLC comprenait trois étapes : 1) reproduire une stimulation antigénique *ex vivo* de lymphocytes issus de patients porteurs de LLC, 2) analyser la réponse dynamique génique, protéomique et fonctionnelle de ces cellules à différents temps après stimulation et 3) analyser cette réponse cellulaire en utilisant des outils de modélisation mathématiques afin de mettre en évidence des gènes clés dans la réponse cellulaire.

1- Première étude de la réponse transcriptionnelle après activation du BCR

Le premier modèle biologique *ex vivo* mis en place par l'équipe comprenait trois types cellulaires différents : i) des lymphocytes B issus de donneurs sains, ii) des lymphocytes leucémiques issus de patients porteurs de formes indolentes de la LLC (avec IGVH mutés) et iii) des lymphocytes de LLC issus de patients porteurs de formes agressives de la LLC (IGVH non mutés).

Pour chacun de ces types cellulaires, le BCR a été activé à l'aide d'anticorps anti-IgM, classiquement utilisés dans la littérature (Guarini et al., 2008) afin d'induire une stimulation brève et transitoire permettant de synchroniser ces cellules. Cette activation a alors permis d'étudier la réponse transcriptionnelle à différents temps après stimulation (deux temps précoces à 60 et 90 min et deux temps tardifs à 210 et 390 min

qui ont été retenus après une étude pilote de l'expression sur 24h). L'expression génique temporelle de ces trois types cellulaires a été analysée par puces à ADN Affymetrix.

L'analyse non supervisée à l'état basal (avant stimulation) a montré une différence de la réponse transcriptionnelle entre les échantillons de lymphocytes de LLC et les lymphocytes sains (508 gènes différentiellement exprimés (DE)), mais n'a pas révélé de différence entre les lymphocytes de LLC des formes indolentes et agressives.

Après stimulation il est apparu une différence de transcription entre les lymphocytes sains et les lymphocytes de LLC (après activation : 104 gènes DE entre Lymphocytes LLC et lymphocytes sains, par exemple le gène RAN de la famille RAS). Il est également apparu des différences entre les lymphocytes de LLC des formes agressives et indolente (différence maximale aux temps tardifs 3h30 et 6h30) (188 gènes DE entre lymphocytes de LLC agressive et indolente, exemple gène YWHAQ).

Cette première analyse dynamique des différents profils d'expression a donc montré l'existence d'un programme génique spécifique des cellules des formes les plus agressives de LLC et suggère un désordre complexe de l'expression de gènes impliqués dans les régulations de la prolifération et de la mort cellulaire (Vallat et al., 2007).

2- Première étude de la réponse protéomique après activation du BCR

Pour compléter l'analyse de la réponse des lymphocytes de LLC après stimulation du BCR, l'équipe a analysé le protéome dynamique de lymphocytes de LLC à différents temps après stimulation. Pour cela, une étude a été menée en incluant six patients porteurs de LLC de stade A précoce, non traités (3 patients présentant des marqueurs biologiques de forme agressive (IGVH-NM, ZAP70 positive) et 3 patients porteurs de marqueurs de forme indolente (IGVH-M, ZAP70 négative). Les lymphocytes de LLC négativement sélectionnés ont été stimulés par un anticorps anti-IgM selon le protocole établi précédemment pour l'étude du transcriptome.

L'analyse protéique a été réalisée à différents temps (1H, 2H, 4H et 7H) par une technique semi-quantitative d'électrophorèse avec marquage fluorescent (2D-DIGE). Les différents gels ont été analysés à l'aide du logiciel DeCyder, ce qui a permis de détecter et

quantifier 1873 spots polypeptidiques qui ont ensuite été identifiés par spectrométrie de masse.

L'équipe a ainsi établi une première carte du profil protéomique fonctionnel de la LLC. Si le protéome des formes indolentes et agressives de la LLC ne montre pas de différences avant stimulation, l'analyse cinétique après activation du BCR révèle une réponse protéomique dynamique spécifique des formes les plus agressives de la LLC.

A l'état basal, 26 protéines sont différentiellement abondantes entre les lymphocytes de LLC de formes indolentes et agressives. Parmi elles, la protéine *hematopoietic lineage cell-specific* (HCLS1) est surexprimée dans les lymphocytes de LLC avec IGVH non mutés, comparé aux LLC avec IGVH mutés. De plus, dans ces cellules l'analyse des isoformes de HCLS1 a suggéré que cette protéine était constitutivement phosphorylée à l'état basal dans les lymphocytes de LLC agressive. Après activation du BCR, la plus forte augmentation d'abondance entre les échantillons stimulés et non stimulés (contrôles) a été observé pour les protéines *cytoplasmic dynein1 intermediate chain 2* (DYNC1I2), COMT et HNRPK. Parmi les 12 protéines dont l'abondance diminue après activation, la plus forte diminution a été observée pour les protéines *UV excision repair* (RAD23B), *lamin B2* (LMNB2) et PDCD4 (Perrot et al., Blood 2011).

3- Développement d'outils de modélisation de la réponse transcriptionnelle

Suite à ces études de la cinétique transcriptionnelle et protéomique après activation du BCR, l'équipe a entrepris de reconstruire le réseau de régulation transcriptionnel induit dans les lymphocytes de LLC. En effet, au-delà des gènes différentiellement exprimés entre les trois types cellulaires aux différents temps après activation, ce type d'approche permet d'étudier la structure de la dynamique transcriptionnelle et recherche des gènes clés qui pourraient conditionner l'organisation de cette structure.

Pour cela, mon équipe a collaboré avec un chercheur en mathématique appliquée (JW Fisher, MIT) puis un mathématicien de l'UFR de mathématique de Strasbourg (IRMA, CNRS UMR_7501) afin de développer une première méthode d'inférence permettant l'estimation de larges réseaux d'expression dynamique de gènes (Jung et al., Bioinformatics 2014).

La première étape a consisté à sélectionner des gènes dans la cinétique transcriptionnelle selon leur intensité et leur profil d'expression. Ces gènes ont alors été rassemblés en différents groupes temporels homogènes (gènes présentant un maximum d'expression à un des quatre temps ou sur plusieurs temps). En tenant compte de ces critères, 500 gènes ont été retenus par catégorie cellulaire (lymphocytes de LLC avec IGVH non mutés de formes agressives, lymphocytes de LLC avec IGVH mutés indolents et lymphocytes sains), ce qui représente environ 1000 gènes uniques au total.

La deuxième étape a consisté à inférer le modèle statistique à partir des données d'expression de ces différents gènes sélectionnés pour rechercher de potentiels liens statistiques entre les gènes de ces différents groupes pour chaque catégorie cellulaire. Ces résultats ont alors mis en évidence des gènes clés dans la réponse transcriptionnelle de ces différentes cellules : EGR1, IER1 pour les lymphocytes sains, EGR1, ZFP36, DUSP1 et 2 pour les lymphocytes de LLC avec IGVH mutés et EGR1, EGR3, JUNB, NR4A1 ainsi que DUSP1, H3F3B et CD83 pour les lymphocytes de LLC avec IGVH non mutés.

Cette approche a donc permis de retrouver des facteurs transcriptionnels connus pour avoir un rôle crucial dans la réponse transcriptionnelle du BCR (EGR, JUN, NR4A1) et a permis de replacer ces gènes dans des cascades transcriptionnelles pour les trois catégories de cellules. De plus, cette méthode de modélisation mathématique a permis de suivre le signal transcriptionnel (activation séquentielle de gènes) qui se propage dans le réseau d'interaction génique au cours du temps après la stimulation (Vallat et al., 2013).

L'objectif suivant consistait à inhiber l'expression d'un de ces gènes clés dans le programme transcriptionnel afin de moduler la réponse des lymphocytes de LLC après stimulation antigénique. L'équipe a utilisé la méthode d'inférence développée pour prédire *in-silico* les effets de l'invalidation du gène DUSP1 (une phosphatase régulant négativement le signal du BCR) à un temps précoce après stimulation dans le réseau de gènes. Une invalidation partielle de ce gène a alors été réalisée à l'aide siRNA transfectés par électroporation dans des lymphocytes de LLC qui ont ensuite été stimulés et dans lesquels a été à nouveau mesurée l'expression génique à différents temps après stimulation.

L'équipe a alors comparé les prédictions statistiques avec les données biologiques réelles d'expression génique temporelle après invalidation de ce gène, ce qui a permis de valider les capacités prédictives de la modélisation et a apporté la preuve de concept de la faisabilité de cette approche (Vallat et al., 2013).

4- Mise en place d'un modèle de stimulation ex vivo induisant la prolifération des lymphocytes de LLC

Dans ces travaux préliminaires, mon équipe a étudié la réponse des lymphocytes de LLC après activation du BCR par un anticorps anti-IgM soluble. Cependant, cette stimulation constitue uniquement le premier signal de l'activation lymphocytaire et n'induit pas de prolifération *in vitro*. Au contraire, une activation isolée et forte du BCR induit une apoptose de ces cellules (Yoshida et al., 2000).

Pour étudier le programme cellulaire qui soutient la prolifération lymphocytaire dans la LLC, il a donc été nécessaire de reproduire *in vitro* une stimulation proliférative. Cependant, les lymphocytes de LLC prolifèrent difficilement en culture et, malgré différents modèles de stimulation proposés dans la littérature (cf introduction), il n'existait pas de conditions de culture consensuelles permettant d'obtenir une prolifération de lymphocytes de LLC après activation du BCR en milieu soluble.

De plus, les analyses transcriptionnelles et protéomiques pratiquées sur les lymphocytes de LLC après cette stimulation imposent de réaliser une stimulation pulsée (à T0) des lymphocytes de LLC afin d'induire une réponse transcriptionnelle et protéomique synchronisée dans ces cellules. Une stimulation continue ou répétée induit en effet des phénomènes cycliques et perturbe l'analyse statistique des cascades transcriptionnelles.

L'équipe a alors procédé à la mise en place de ces conditions de stimulation en deux temps. Dans un premier temps, elle a recherché les conditions optimales induisant la prolifération de quelques lymphocytes de LLC et lymphocytes sains en procédant à une étude exhaustive des effets de multiples facteurs utilisés isolément ou en combinaison, sur différents supports de culture. L'équipe a confirmé qu'une stimulation isolée du BCR, en milieu soluble, semi-liquide ou sur cellules nourricières n'induit pas de prolifération.

L'utilisation isolée de différentes cytokines (IL-4, IL-10, IL-15, IL-2, IL21) ou de CD40L soluble ou fixé n'induisent pas non plus de prolifération et ont nécessité des combinaisons de certaines d'entre elles pour induire une prolifération (CD40L+IL-4 ou CD40L+IL-21 ou IL-4+IL-21). L'équipe a alors retenu une activation du BCR (anti-IgM) associée avec une stimulation CD40L+IL-4+IL-21 comme stimulation pulsée incluant un nombre minimal de co-stimulant et permettant d'obtenir la meilleure prolifération des lymphocytes de LLC en milieu soluble (Schleiss et al., ScRep 2019).

Dans un deuxième temps, l'équipe a analysé la réponse proliférative d'une cohorte de lymphocytes de LLC isolés de patients au stade initial (A), non traités et représentatifs des différents groupes de LLC (IGVH non mutés, ZAP positive ; IGVH mutés, ZAP positive ; IGVH mutés, ZAP négative), ainsi que d'une cohorte de lymphocytes B naïfs (CD27+ IgM+) et totaux issus de donneurs sains. Une stimulation en conditions solubles de ces différentes cellules a permis d'induire une prolifération de tous les échantillons de lymphocytes sains analysés (avec un maximum de quatre générations cellulaires à J4). Dans ces mêmes conditions, 35% (17/48) de l'ensemble des lymphocytes de LLC prolifèrent à J6 (maximum de 4 générations cellulaires à J6), avec un avantage prolifératif des lymphocytes de LLC qui expriment la protéine ZAP70. En effet, la moitié des lymphocytes de LLC ZAP70+ prolifèrent à J6 dans les conditions mises en place.

Par ailleurs, l'équipe a montré que l'utilisation de cette même stimulation (sans autre cytokine), mais effectuée sur un support semi-solide (méthyl-cellulose) induisait la prolifération de 90% des lymphocytes de LLC (maximum de 6 générations cellulaires). Cette même culture, effectuée sur cellules nourricières (3T6-CD40L) n'induisait pas d'augmentation de prolifération. Bien que ce milieu induise une réponse proliférative supérieure à celle obtenue dans le milieu soluble, il ne permet pas la récupération facile des cellules en culture pour leur caractérisation.

J'ai participé à la réalisation d'expériences de validation protéique lors de la révision de cet article reproduit en annexe (Schleiss C, et al., ScRep 2019).

5- Etude de la réponse transcriptionnelle et protéomique proliférative dans les lymphocytes de LLC

L'équipe s'est ensuite concentrée sur le groupe de LLC IGVH-NM ZAP+ présentant le pronostic le plus péjoratif. La réponse à la stimulation du BCR de lymphocytes issus de différents patients LLC étant différente, ils ont sélectionné dans ce groupe trois patients dont les lymphocytes de LLC prolifèrent et trois patients dont les lymphocytes ne prolifèrent pas après activation du BCR. Ces derniers échantillons ont été utilisés comme contrôles dans la suite de l'analyse.

L'objectif était alors d'étudier la réponse cinétique transcriptionnelle et protéomique dans ce groupe de patients pour mettre en évidence les gènes et protéines associés à la prolifération dans le programme de réponse au BCR.

Une activation du BCR en conditions solubles a été réalisée et des échantillons cellulaires ont été recueillis à différents temps pour extraction d'ARNm et protéines (T0 avant stimulation, 1h, 1h30, 3h30, 6h30, 12h, 24h, J2 et J4), soit un total de 54 points d'analyse transcriptionnelle et 54 points en protéomique. Pour chacun de ces échantillons de lymphocytes de LLC stimulés, la prolifération (à J6) a été quantifiée après un marquage initial par carboxyfluoresceine (CFSE).

Après séquençage de l'ARN (RNAseq) de ces échantillons, une analyse non supervisée a mis en évidence des profils transcriptionnels différents pour les échantillons de lymphocytes de LLC répondeurs (proliférant) et non répondeurs contrôles. De plus, cette analyse a montré une évolution structurée de ces profils, avec conservation de la distinction entre ces deux groupes de lymphocytes de LLC au cours du temps après stimulation. Les analyses supervisées ont mis en évidence 2782 gènes différentiellement exprimés après stimulation (DE T vs T0) pour les cellules proliférantes et 1822 gènes pour les non proliférant, ce qui représente 3100 gènes uniques. Ces gènes, activés après stimulation du BCR constituent la signature temporelle de réponse au BCR (Figure 23). Parmi ces gènes, 754 sont DE entre proliférant et non proliférant, constituant la signature spécifique de la prolifération (signature proliférative, Figure 23) des lymphocytes qui répondent à cette stimulation.

La cinétique de la réponse protéomique par spectrométrie de masse a également été étudiée sur ces mêmes échantillons cellulaires. Cette analyse a ainsi permis de détecter 4664 protéines uniques dont l'abondance a été quantifiée à au moins un temps dans les différents échantillons. Une analyse en composante principale réalisée à partir de ces données d'abondance protéique a également mis en évidence une différence de réponse entre les lymphocytes de LLC proliférant et contrôles non proliférant.

L'analyse statistique a retrouvé 1107 protéines différentiellement abondantes (DA) au cours du temps après stimulation dans les échantillons proliférant et 760 protéines DA dans les échantillons non proliférant, ce qui représente 1200 protéines uniques. Parmi ces dernières, 437 sont DA entre proliférant et contrôles non proliférant (Figure 23).

L'analyse de ces différents gènes et protéines a retrouvé des gènes déjà observés dans l'étude précédente (Vallat et al., 2013) ainsi que différents gènes et protéines qui n'avaient pas été mis en évidence jusqu'à présent dans cette réponse à l'activation du BCR.

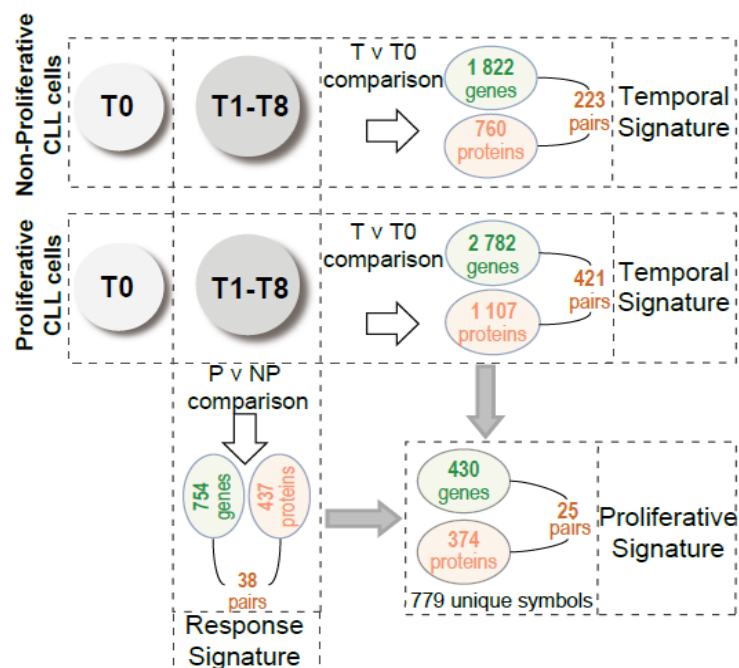


Figure 23 : Analyse statistique supervisée de l'expression dynamique des gènes et des protéines après activation du BCR de lymphocytes de LLC. Signature temporelle (comparaison T vs T0, horizontalement). Nombre de gènes différentiellement exprimés (DE) et protéines différentiellement abondantes (DA) dans des échantillons de LLC proliférantes (n=3) et contrôles non proliférantes (n=3) après la stimulation du BCR (T1 à T8), comparés à l'expression à T0 (FDR <1%). Signature de la réponse (comparaison proliférant vs non proliférant, verticalement). Nombre de gènes DE et nombre de protéines DA dans les cellules de LLC proliférantes comparés aux cellules de LLC non proliférantes (FDR <5%). Signature proliférative (combinaison de la comparaison T vs T0 et de la comparaison proliférant vs non proliférant) (Schleiss et al., submitted).

En parallèle, des développements des outils de modélisations ont été effectués (Bertrand et al., 2020). Ces développements ont permis de modéliser le programme de réponse transcriptionnelle et protéomique induisant la prolifération des lymphocytes de LLC après activation du BCR *ex vivo*. La modélisation de cette réponse cellulaire inclut 2167 gènes et 1074 protéines représentant 2846 symboles uniques (dont 395 paires de gène et protéines). Cette modélisation a permis de mettre en évidence des gènes et protéines ayant une importance prépondérante dans la structure de la réponse cellulaire. En particulier l'analyse du réseau d'interactions génique et protéomique a permis de suggérer l'existence d'un sous-réseau d'interactions géniques et protéomiques lié à la prolifération cellulaire dans les lymphocytes proliférant. Au sein de ce sous-réseau, un groupe de 14 gènes présentant une forte augmentation d'expression correspondant à une réponse proliférative transcriptionnelle très précoce après activation des lymphocytes de LLC (Figure 24). Ces gènes codent des facteurs de transcription majeurs impliqués dans la transition G0/G1 (EGR1, EGR2), dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes B après activation du BCR (NFKB1, NFKB2) qui sont également impliqués dans la lymphomagenèse. D'autres gènes de ce groupe codent des molécules impliquées dans la signalisation et la modulation de NFkB (TANK, RHOF, SDCBP), l'immunoévasion (KMO, IL4I1, SERPINB9) et l'adhésion cellulaire (ICAM1)(Schleiss et al, manuscript soumis).

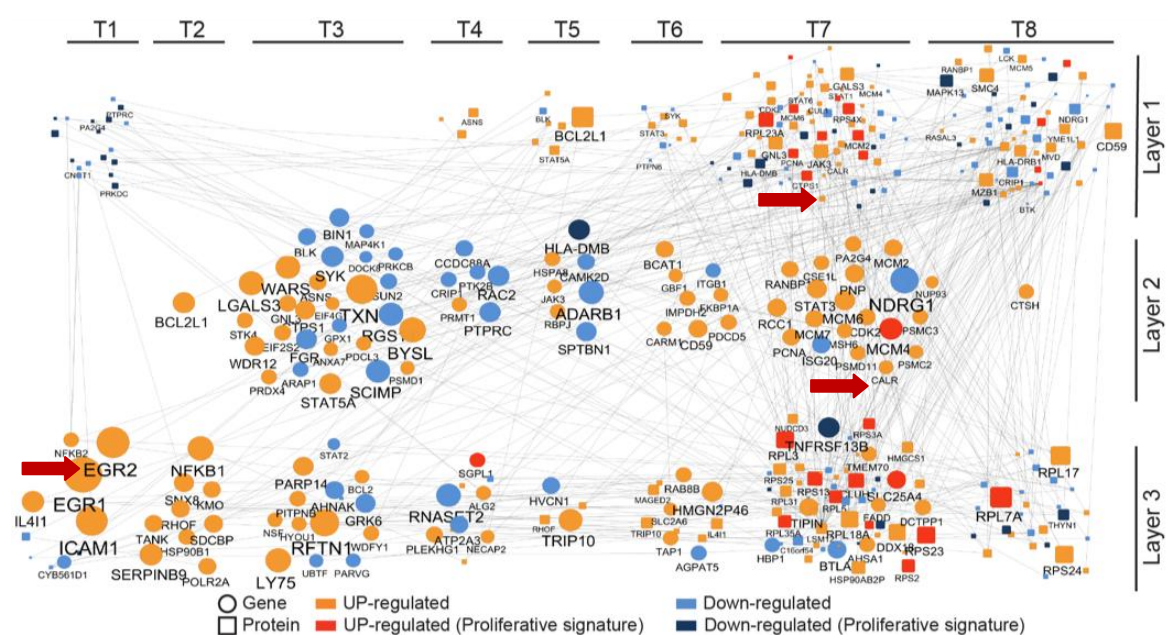


Figure 24 : Programme prolifératif dynamique induit après stimulation du BCR dans les cellules de LLC. Représentation du réseau de régulation génique et protéomique induit dans les lymphocytes de LLC après activation du BCR. Les gènes (cercles) et protéines (carrés) sur-exprimés et sous-exprimés sont représentés en orange et bleu respectivement et leur taille est proportionnelle à leur expression. Les 173 protéines impliquées dans le cycle cellulaire ou la prolifération sont regroupées en haut du graphe (layer#1). Les 71 gènes codant ces 173 gènes sont regroupés au milieu (layer#2). Les 50 gènes et 94 protéines également inclus dans ce sous réseau prolifératif sont regroupés en bas (layer#3) (Schleiss et al., submitted). Les flèches rouges indiquent la position du gène EGR2, du gène et de la protéine CALR dans ce réseau de régulation génique et protéomique.

6- Gènes cibles retenus

Pour ce travail de thèse, nous avons retenu quatre gènes issus des résultats de l'analyse statistique ou de la modélisation mathématique de cette étude préliminaire.

Le premier gène retenu, calréticuline (CALR) code une protéine dont le rôle dans la prolifération cellulaire reste à caractériser. Ce gène et sa protéine sont différentiellement exprimés dans les lymphocytes de LLC (proliférant et contrôles non proliférant) après activation du BCR. Ils appartiennent à la signature temporelle issue de l'analyse statistique (Figure 23). Ce gène et sa protéine font également partie du réseau génique et protéomique prolifératif suggéré par la modélisation mathématique (Figure 24).

Le gène *early growth factor 2* (EGR2) est un facteur transcriptionnel de la voie MAP Kinases, dont l'implication dans la prolifération lymphocytaire est connue. Ce gène fait également partie de la signature temporelle de réponse au BCR des lymphocytes proliférant et contrôle non proliférant. Il possède un rôle clé dans le réseau prolifératif au sein du groupe de 14 facteurs transcriptionnels activés aux temps précoces après activation du BCR.

Le gène *TNF alpha induced protein 3* (TNFAIP3 ou A20) code une protéine régulant négativement NFkB. Ce gène et cette protéine font également partie de la signature temporelle de réponse au BCR des deux types de lymphocytes. Leur expression dans les lymphocytes proliférant étant supérieure à celle observée dans les lymphocytes contrôles, ils font partie de la signature proliférative. Malgré cette caractéristique, ils n'ont pas été retenus dans le réseau prolifératif par la modélisation mathématique.

Le gène *chemokine C-X-C motif receptor 4* (CXCR4) est un récepteur membranaire impliqué dans la migration lymphocytaire. Ce gène appartient à la signature temporelle, mais ne figure pas dans le réseau prolifératif. Ces quatre gènes sont présentés en détails ci-dessous.

Le gène EGR2 est localisé sur le chromosome 10q21.3. Il comprend cinq exons et code une protéine de 476 acides aminés (50 kDa). Cette protéine est un facteur transcriptionnel composé de trois motifs à doigt de zinc reconnaissant chacun des triplets de nucléotides (GGG, GGG ou GCG) (O'Donovan et al., 1999). Ce facteur

transcriptionnel fait partie d'une famille comprenant les gènes EGR1 à 4 dont les activités transcriptionnelles sont proches.

Ce facteur de transcription est principalement exprimé dans les cellules neuronales et les lymphocytes. Dans ces cellules, l'expression de EGR2 est activée par la voie des MAP/kinases en aval du BCR et du TCR (Zaman et al., 2012) qui activent également l'expression d'EGR1, EGR3, JUN et FOS (Abraham et al., 1991; Guha and Mackman, 2001), ainsi que par la voie Wnt (Zaman et al., 2012). Son expression est régulée par l'IL-4 (voie des MAP/kinases) (So et al., 2007), l'IL-21 (voie JAK/STAT1-3) (De Cecco et al., 2015) et PTEN (voie PTEN/PI3K/AKT/mTOR) et l'IL-2 (voie JAK/STAT1-3) (Matsushima-Nishiu et al., 2001; Miao et al., 2013).

Une étude réalisée à l'aide de microarrays a mis en évidence 82 gènes dont l'expression est activée par EGR2 dans le développement des cellules gliales (cellules de Schwann) (Nagarajan et al., 2001), dont le gène PRX responsable de l'activité de myélinisation des axones neuronaux (Jang and Svaren, 2009).

Lors de la lymphopoïèse, EGR2 participe à la différenciation des progéniteurs lymphoïdes proB en préB (Yasuda et al., 2008) en régulant l'expression du gène MEF2 (Herglotz et al., 2016). Il stimule la prolifération cellulaire en activant l'expression des gènes MYC, MYB, BCL2, BCL6 et ID3 (Lauritsen et al., 2008; Miao et al., 2017; Morita et al., 2016; Ogbe et al., 2015). En parallèle, EGR2 inhibe l'expression des gènes ZEB2 et RORC impliqués dans la différenciation cellulaire (Miao et al., 2017).

EGR2 régule la réponse immune lymphocytaire T CD4 en stimulant l'expression d'IL2 (Du et al., 2014; Kao et al., 2009; Symonds et al., 2020).

Une mutation d'EGR2 est impliquée dans le développement de la maladie de Charcot-Marie-Tooth définie par un défaut de myélinisation des cellules neuronales perturbant la conduction de l'influx nerveux. Dans cette maladie de pronostic péjoratif, la mutation hétérozygote Asp305Val dans la séquence codant le premier domaine à doigt de zinc d'EGR2 ne permet pas l'activation des gènes de myélinisation (PRX) nécessaire au développement et fonctionnement neurologique physiologique (Bellone et al., 1999; Chung et al., 2005; Swanberg et al., 2009).

Une surexpression de EGR2 a été mise en évidence dans de nombreux cancers tels que le cancer de l'estomac (Chen et al., 2019; Feng et al., 2015; Szöke et al., 2007), du rein (Natrajan et al., 2006), des os (sarcome d'Ewing)(Postel-Vinay et al., 2012), du sein

(Gregory et al., 2017) et de l'utérus (Davidson and McCray, 2011; Svaren et al., 1996; Yin et al., 2011). Dans le cancer du colon, cette surexpression induit une résistance au 5-Fluorouracil (Szöke et al., 2007). Une inhibition de son expression dans un modèle de sarcome d'Ewing induit une diminution de la prolifération des cellules tumorales osseuses *in vitro* (Grünewald et al., 2015).

Des études de cohortes de patients porteurs de LLC ont montré que EGR2 est muté chez 3,8% à 8,3% des patients (Damm et al., 2014; Young et al., 2017). Ce sont principalement des insertions de nucléotides localisées dans le domaine de fixation à l'ADN de EGR2 au niveau des codons E356, H384 et D411. Cette mutation est fréquemment associée à des mutations de TP53, d'ATM et à un statut mutationnel non muté. Les mutations EGR2 apparaissent cependant comme un facteur indépendant de mauvais pronostic (Young et al., 2017).

Le gène TNFAIP3 (ou A20) comprend 10 exons et est localisé sur le chromosome 6. Il code une protéine de 790 acides aminés (89 kDa) contenant une enzyme de débubiquitination de la famille des *ovarian tumor ubiquitin* (OTU) en N-terminal et des ubiquitines ligases en C-terminal (Wertz et al., 2004). TNFAIP3 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques et notamment dans les progéniteurs lymphoïdes (Tewari et al., 1995). Cette protéine est impliquée dans la régulation de la voie NFκB à plusieurs niveaux. TNFAIP3 induit la débubiquitination de MALT1 et déstabilise ainsi le complexe CARD11/BCL10/MALT1 (Coornaert et al., 2008). Par ailleurs, TNFAIP3 débubiquitine TRAF6 (Shembade et al., 2010) ainsi que IKKα/β ce qui induit la déstabilisation du complexe IKKα/IKKβ/NEMO (Parvatiyar et al., 2010). L'inhibition de la phosphorylation d'IKKα prévient alors la libération des sous-unités de NFκB, bloquant ainsi son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, TNFAIP3 inhibe la voie du TNF pro-apoptotique (Won et al., 2010).

En inhibant la prolifération cellulaire induite par NFκB, TNFAIP3 possède un rôle suppresseur de tumeur ralentissant la croissance tumorale (Chen et al., 2015; Wang et al., 2015). Dans le cancer du sein, miR-221 inhibe l'expression de TNFAIP3, ce qui accélère la progression tumorale (Santolla et al., 2018; Zhao et al., 2016).

Dans les hémopathies, une inactivation de TNFAIP3 par délétion (Novak et al., 2009) ou méthylation de son promoteur (Chanudet et al., 2010) est retrouvée dans 25% des lymphomes de la zone marginale (Hyeon et al., 2018), dans 7% des lymphomes de la

zone marginal splénique (Parry et al., 2015) et dans 27% des lymphomes de Hodgkin (Shi et al., 2016). Ces mutations induisent une activation constitutive de NFkB et une prolifération tumorale. Dans la LLC, l'analyse de TNFAIP3 n'a pas permis de mettre en évidence des délétions, substitutions ou méthylation de ce gène qui peut conserver un rôle de suppresseur de tumeur (Frenzel et al., 2011; Philipp et al., 2011).

Le gène CXCR4 comprend quatre exons et est situé sur le chromosome 2. Il code la protéine CXCR4 ou CD184 (352 acides aminés, 39 kDa) formant un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G dont le ligand est CXCL12 (ou *stromal cell-derived factor*, SDF) (Berger et al., 1999; Oberlin et al., 1996). L'expression du gène CXCR4 est activée par le calcium (Moriuchi et al., 1997), l'AMP cyclique (Cristillo et al., 2002), les cytokines IL-2 (Moriuchi et al., 1997), IL-4, IL-7, IL-15 (Jourdan et al., 2000), IL-10 (Wang et al., 2001) et les facteurs de croissance TGFβ (Wang et al., 2001), VEGF, FGF (Feil and Augustin, 1998; Salcedo et al., 1999) et EGF (Phillips et al., 2005). Son expression est régulée négativement par les cytokines IL-5 (Ara et al., 2003), IL-1β (Gupta et al., 1998), TNFα (Feil and Augustin, 1998), IFNα (Ara et al., 2003), et IFNγ (Gupta et al., 1998).

Ce récepteur est exprimé sur les cellules hématopoïétiques, à la surface des précurseurs et progéniteurs CD34+ (Aiuti et al., 1997), des lymphocytes B et T (Bleul et al., 1997), des cellules NK (Hanna et al., 2003), les cellules dendritiques (Zoetewij et al., 1998) et des macrophages (Bleul et al., 1996; Juremalm et al., 2000). Il est également exprimé à la surface des cellules endothéliales (Gupta et al., 1998), des cellules intestinales (Dwinell et al., 1999), des cellules neuronales (Zou et al., 1998), des cellules musculaires (Schechter et al., 2003), des cellules épithéliales alvéolaires (Murdoch et al., 1999) et des cellules de la rétine (Crane et al., 2000).

Après fixation du ligand CXCL12, le récepteur CXCR4 forme un homodimère avec un autre récepteur CXCR4 (Babcock et al., 2003; Percherancier et al., 2005), ou forme un hétérodimère avec d'autres récepteurs de types glycoprotéines (CD4) et récepteurs couplés aux protéines G (CCR2) (Basmaciogullari et al., 2006; Percherancier et al., 2005; Rodríguez-Frade et al., 2004). Cette dimérisation active les protéines G (Murphy et al., 2000), puis les voies Ras/Raf/MAP Kinases, PI3K/AKT, PLCG/IP3/CA2+/NFAT et PLCG/DAG/PKC/NFKB qui induisent la prolifération cellulaire. La régulation négative de l'activation de CXCR4 se fait par phosphorylation des protéines intracytoplasmique β-

arrestine 1 et 2 qui provoquent l'internalisation de ce récepteur (Fong et al., 2002; Krupnick and Benovic, 1998).

Lors de l'embryogenèse, CXCR4 guide la migration axonale (Chalasani et al., 2003). Chez l'adulte, l'expression de CXCR4 à la surface des progéniteurs hématopoïétiques permet leur expansion dans la niche hématopoïétique (Broxmeyer et al., 2003). L'expression de ce récepteur sur les lymphocytes naïfs permet de ralentir leur migration à travers les organes lymphoïdes secondaires pour favoriser la présentation antigénique (Allen et al., 2004).

L'expression de CXCR4 est un facteur de développement tumoral. Une augmentation de son expression à la surface des cellules tumorales, favorisée par HIF1 (Schioppa et al., 2003), VEGF (Bachelder et al., 2002) a été mise en évidence dans le cancer de la prostate (Taichman et al., 2002), du poumon (Kijima et al., 2002), du colon (Zeelenberg et al., 2003), du sein (Müller et al., 2001a) et le mélanome (Murakami et al., 2002). L'augmentation de la sécrétion de CXCL12 dans le microenvironnement tumoral induit la prolifération tumorale (Müller et al., 2001), le recrutement des progéniteurs endothéliaux favorisant l'angiogenèse (Orimo et al., 2005) et la résistance aux traitements (Li et al., 2014; Nakamura et al., 2015). Chez ces patients, l'expression élevée de CXCL12 dans les organes sains favorise la migration des cellules tumorales et le développement de métastases (Iwasa et al., 2009; Kim et al., 2008; Müller et al., 2001). La surexpression physiologique de CXCL12 dans le microenvironnement lymphoïde favorise la survie des lymphocytes de LLC (Burger et al., 2000). De plus, les lymphocytes de LLC expriment plus fortement CXCR4 par rapport aux lymphocytes B sains (Barretina et al., 2003). L'utilisation *in vitro* d'un anticorps anti-CXCR4 induit une augmentation de l'apoptose de ces lymphocytes tumoraux (Kashyap et al., 2017). Des anticorps monoclonaux dirigés contre CXCR4 (PF-06747143) (Kashyap et al., 2017) ou CXCL12 (NOX-A12) (Roccaro et al., 2015) sont actuellement en développement.

Le gène CALR est localisé sur le chromosome 19, comprend 9 exons et code une protéine de 417 acides aminés (48 kDa). Son expression est ubiquitaire dans l'organisme (Persson et al., 2002). La calréticuline est une protéine chaperonne située dans le réticulum endoplasmique où elle participe à la maturation du complexe CMH-I/β2 microglobuline impliqué dans la présentation antigénique (Cresswell et al., 1999) et où

elle contrôle la conformation tridimensionnelle des protéines intracellulaires (Ireland et al., 2006; Zeng et al., 2006). La calréticuline a également un rôle dans la régulation du métabolisme du calcium. De plus, elle participe au stockage du calcium dans la lumière du réticulum et elle régule les échanges du calcium avec le cytoplasme (Burns et al., 1994). Après clivage de sa partie C-terminale, la calréticuline peut se localiser dans le cytoplasme où elle participe aux modifications protéiques post-traductionnelles (arginylation). Dans le noyau, elle participe à la régulation de la transcription de certains gènes et l'export nucléaire des ARNm (Dedhar et al., 1994; Krause and Michalak, 1997). Lors du phénomène d'apoptose, calréticuline se localise à la surface de la cellule où elle constitue un ligand pour le récepteur LRP1 des phagocytes, favorisant la phagocytose (Gardai et al., 2005; White et al., 1995).

Une surexpression de la calréticuline a été mise en évidence dans certains cancers solides, notamment les cancers ORL (Chiang et al., 2013), de l'œsophage (Du et al., 2007), du sein (Bini et al., 1997; Lwin et al., 2010), du pancréas (Sheng et al., 2014), gastrique (Chen et al., 2009), du colon (Alfonso et al., 2005), la vessie (Kageyama et al., 2009; Minami et al., 2014), de la prostate (Alaiya et al., 2000) et les neuroblastomes (Hsu et al., 2005). Dans ces différents cancers la surexpression de calréticuline corrèle avec un pronostic défavorable (Lu et al., 2015). L'inhibition de l'expression de CALR dans un modèle murin de cancer du pancréas diminue la croissance tumorale (Sheng et al., 2017).

Une insertion ou délétion dans l'exon 9 de CALR est responsable d'une activation constitutive du récepteur pour la thrombopoïétine, d'une activation des voies JAK/STAT et de la prolifération mégacaryocytaire à l'origine du développement de thrombocythémie essentielle ou de myélofibrose. Une mutation de CALR est ainsi retrouvée dans 25% des thrombocythémie essentielle et dans 25% des myélofibroses (Klampfl et al., 2013). CALR pourrait également avoir un rôle dans le développement de la LLC (Binder et al., 2010; Burger et al., 2009; ten Hacken et al., 2017; Molica et al., 2016; Nangalia et al., 2013). Une surexpression de ce gène dans les cellules stromales pourrait favoriser l'activation du récepteur à l'antigène, ce qui contribue à un effet protecteur du stroma sur les cellules de LLC (Binder et al., 2010). Par ailleurs, une calréticuline sérique a été décrite dans les LLC, essentiellement de formes agressives comparées aux formes indolentes, mais la signification de cette présence sérique reste discutée (Molica et al., 2016).

C- Objectifs de la thèse

Les travaux préliminaires de l'équipe ont permis de caractériser le programme transcriptionnel et protéomique qui soutient la prolifération cellulaire après activation du BCR dans des lymphocytes de la forme agressive de LLC (Schleiss et al, soumis). L'analyse statistique et la modélisation mathématique de ce programme ont suggéré que certains gènes ou protéines pourraient avoir un rôle prépondérant dans la réponse proliférative. L'objectif suivant consistait alors à diminuer l'expression de certains de ces gènes dans le but de moduler ce programme de réponse prolifératif et, à terme de diminuer la prolifération leucémique.

Mon objectif de thèse a donc consisté à diminuer l'expression de certains gènes cibles de la réponse transcriptionnelle après activation du BCR afin de moduler le programme de réponse proliférative de lymphocytes de LLC *ex vivo*.

Les objectifs spécifiques de ma thèse ont été :

- 1) valider le profil d'expression génique et d'abondance protéique après activation du BCR des gènes cibles retenus pour les expériences d'intervention (silencing) à l'aide d'échantillons issus de patients supplémentaires inclus dans le protocole d'étude.
- 2) compte tenu de la difficulté de diminuer l'expression des gènes dans des cellules primaires hématopoïétiques, évaluer l'efficacité de délivrance de siRNA dans une lignée lymphoïde et des lymphocytes issus de patients porteurs de LLC en contrôlant la tolérance cellulaire (survie, prolifération) des différentes méthodes de transfection.
- 3) après sélection d'une méthode de transfection, mener les expériences visant à diminuer l'expression des gènes cibles retenus dans la lignée lymphoïde et les lymphocytes primaires de LLC.

Notre approche méthodologique est conditionnée par des contraintes liées aux caractéristiques des lymphocytes primaires de LLC, ainsi qu'à notre modèle d'activation du BCR *ex-vivo*. Malgré leur caractère tumoral, les lymphocytes primaires de LLC entrent rapidement en apoptose dans les 24h après avoir été prélevés et isolés du sang total. Ceci impose d'induire une stimulation proliférative de ces lymphocytes *ex vivo* dans les 24h après prélèvement.

Par ailleurs, notre objectif consiste à diminuer l'expression de gènes dont la transcription est activée par la stimulation du BCR *ex-vivo*. La plupart de ces gènes ne sont pas (ou peu) exprimés à l'état basal dans ces lymphocytes de LLC figés au stade G0 dans le sang périphérique des patients. Notre démarche expérimentale consiste donc à silencer des gènes qui ne sont pas exprimés et dont nous activons la transcription.

Notre approche méthodologique a alors consisté à introduire des siRNA dirigés contre un gène cible, puis à activer le BCR de ces cellules afin d'induire l'expression de ce même gène cible. Nous avons alors validé la diminution d'expression de ces gènes par qPCR et si possible par WB, avant d'analyser l'effet de la diminution d'expression sur la prolifération cellulaire dans les six jours *ex vivo*. La faisabilité de cette approche méthodologique a été validée par l'équipe dans une étude précédente (Vallat et al., 2013).

D- Matériels et méthodes

Échantillons cellulaires et isolement des lymphocytes B

Les échantillons de sang proviennent de patients atteints de LLC suivis dans le service d'hématologie des Hôpitaux Universitaire de Strasbourg. Ces derniers sont inclus, avec leur consentement, dans un protocole d'étude portant sur les syndromes lymphoprolifératifs approuvé par le Comité de protection des personnes (CPP-Est IV du 9/09/2014).

Les caractéristiques cytologiques, phénotypiques (ZAP70, CD38) et moléculaires (statut mutationnel des gènes IGVH par séquençage de la région CDR3) des lymphocytes de LLC sont déterminées au laboratoire d'hématologie des HUS. Une sélection négative des lymphocytes B du sang total prélevé sur héparine est réalisée à l'aide d'une combinaison d'anticorps anti-glycophorine A (globules rouges) et des anticorps anti-CD2, -CD3, -CD16, -CD36, -CD56, CD66b (cellules hématopoïétiques autres que les lymphocytes B) (20µl/ml de sang) (RosetteSep™, Stem Cell Technologies). Après 20 minutes d'incubation, le sang est dilué dans du PBS (1:1), déposé sur un gradient de densité (Ficoll-Paque™, GE Healthcare) et centrifugés (400g, 30min, sans frein). L'anneau, à l'interphase entre le Ficoll™ et le plasma est récupéré et lavé en PBS (200g, 15min). Le comptage des cellules se fait sur cellule de Malassez dans du bleu trypan 10% (Trypan Blue Stain, Gibco). La qualité de l'enrichissement en lymphocytes de LLC est vérifiée par marquage de 10⁶ cellules avec 10µl d'anticorps anti-CD19-PC7 (Beckman-Coulter) et 10µl d'anticorps anti-CD5-FITC (Beckman-Coulter) ainsi que par le marqueur de viabilité 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Sigma). L'acquisition est réalisée sur un cytomètre LSR Fortessa X20 (BD Biosciences) et les données sont analysées avec le logiciel FACSDiva 5.0 (BD Biosciences). Un pourcentage de lymphocytes de LLC >95% est fixé comme prérequis pour la poursuite des expérimentations.

La lignée cellulaire *Burkitt lymphoma 2* (BL2) dérivée d'un lymphome de Burkitt et EBV négatives (DSMZ ACC625), sont cultivées dans du RPMI-1640 (avec GlutaMax et Hepes, Gibco), de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 1% Pénicilline/Streptomycine (Gibco) dans un incubateur (37°C, 5% CO₂).

Les cellules de la lignée *gastric adenocarcinoma* (AGS) dérivée d'un adénocarcinome de l'estomac (ATCC CRL-1739) sont cultivées dans du RPMI-1640 (avec GlutaMax et Hepes, Gibco), de 10% de SVF et de 1% Pénicilline/Streptomycine (Gibco) dans un incubateur (37°C, 5% CO₂).

Marquage au Carboxyfluorescein succinimidyl ester

Pour permettre l'observation de la prolifération, les cellules sont marquées au carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE) afin de pouvoir mesurer le pourcentage de cellules ayant proliféré après 6 jours de culture. Le CFSE est une molécule fluorescente (fluorescéine-492nm/517nm) dérivée du CFSE qui diffuse passivement dans les cellules. Le groupement ester succinimidyl se fixe de façon covalente aux amines intracellulaires. Ainsi, à chaque division cellulaire, la quantité de protéine et l'intensité de fluorescence émise par la fluorescéine est divisée par deux. Le nombre de divisions cellulaire est mesuré par cytométrie en flux.

Les lymphocytes de LLC sont incubés avec 0.5µM de CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, for flow cytometry, ThermoFisher) pendant 10 min à 37°C. Le marquage est arrêté avec du SVF froid (volume à volume ; GIBCO) pendant 5 min dans la glace à l'obscurité, puis les cellules sont lavées dans du milieu de culture afin d'éliminer le CFSE en excès. Avant le passage au cytomètre, les cellules sont reprises dans du PBS contenant du DAPI afin de mesurer la prolifération des cellules vivantes.

Activation des lymphocytes de LLC *ex vivo*

La stimulation associe une activation du récepteur à l'antigène des lymphocytes de LLC avec 10µg/mL d'anticorps anti-IgM F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch), 100ng/ml de CD40L (EnzoLife Science), 10ng/ml d'IL-4 (R&D Systems) et 25ng/ml d'IL-21 (Invitrogen) (Schleiss et al., 2019). Les lymphocytes sont incubées 6 jours en plaque 48 puits (0,5.10⁶ cellules/500µl/puits) à 37°C avec 5% de CO₂ en milieu soluble (RPMI-1640 avec GlutaMax et Hepes (Gibco), 10% de SVF (Gibco), 1% Pénicilline/Streptomycine (Gibco) et 0,01% β-Mercapto-éthanol (BME) (Gibco). La culture peut également être réalisée en milieu semi-solide (milieu soluble précédent auquel de la méthylcellulose (Méthocult™, Stem Cell) est ajoutée à raison de 800µl de méthylcellulose pour 200µL de milieu soluble).

Transfection cellulaire

Lipofectamine.

La transfection par lipofectamine est réalisée suivant les instructions du fabricant. Les lymphocytes à transfecter (4×10^6) sont repris dans 700 μ l de milieu de culture (RPMI 1640, 10% SVF) sans antibiotique. Parallèlement à cela, 4 μ l de lipides cationiques (Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent, Invitrogen) sont mélangés à 150 μ l de milieu réduit en sérum (Opti-MEM, Gibco). Les siRNA (ou siRNA contrôle) sont également mélangés à 150 μ l de milieu Opti-MEM. Les lipides cationiques et la dilution de siRNA sont ensuite mélangés puis incubés 15min à température ambiante. Ce mélange est ajouté au milieu contenant les cellules qui sont incubées à 37°C, 5% CO₂.

Accel.

Cette méthode utilise un siRNA modifié lui permettant de traverser la membrane cellulaire de manière passive et de le protéger des nucléases intracellulaires. Les lymphocytes à transfecter (4×10^6) sont repris dans 1ml de milieu sans sérum fourni par le fabricant (Accell siRNA Delivery Media, Dharmacon) et les siRNA sont ajoutés (60nM). Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂.

Viromer.

Cette méthode permet l'entrée du siRNA à l'aide d'un agent de transfection à base de polymères et d'une protéine de fusion membranaire d'origine virale.

Les lymphocytes à transfecter (4×10^6) sont repris dans 900 μ l de milieu de culture sans antibiotique. Parallèlement à cela, un mélange de transfection est préparé. Ce mélange contient le viromer (1 μ l) (Viromer™ Blue, Lipocalyx), le siRNA à la concentration voulue dans un tampon (100 μ l) (Buffer Viromer, Lipocalyx). Les cellules reprises dans ce mélange sont incubées à 37°C, 5% CO₂.

Electroporation.

Les lymphocytes à transfecter (4×10^6) sont repris dans du tampon V supplémenté (Cell Line Nucleofector Solution, Lonza), auquel est ajouté le siRNA (60nM) selon les recommandations du fournisseur. Après électroporation (X-0001) (Amaxa BioSystems, Lonza), 500 μ L de milieu de culture préchauffé à 37°C est ajouté aux cellules qui sont ensuite incubées à 37°C, 5% CO₂.

Nom du siRNA	Référence	Fabricant
Accel Red non targeting siRNA	D-001960-01	Dharmacon
siGlo Red transfection Indicator	D-001630-02	Dharmacon
CALR silencer select siRNA	4390824_s115	Ambion
Silencer select negative control	4390843	Ambion

Tableau 6 : Liste des siRNA utilisés pour les transfections.

Extraction des ARN totaux

Les lysats cellulaires conservés dans 600µl de RLT (Qiagen) contenant 0,01% BME sont dilués dans un volume d'éthanol à 70%. Le mélange est déposé sur une colonne RNeasy mini (Qiagen) constituée d'une membrane silice qui permet de retenir les ARN. Après traitement à la désoxyribonucléase (DNase) (Qiagen) et plusieurs lavages successifs (8000g, 30sec), les ARN sont élués à l'aide de 25µl d'eau sans RNase (Qiagen) préalablement chauffée à 30°C (10000g, 5min). La qualité et la quantité des ARN sont vérifiées par spectrophotométrie (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) en mesurant les rapports de densités optiques (DO) à 230, 260 et 280 nm).

Transcription inverse et PCR quantitative

La rétrotranscription (RT) des ARN en ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir de 400ng d'ARN. Les ARN sont dénaturés en présence d'hexadeoxynucléotides (70µg/ml) (randomhexamer, Promega) pendant 10 min à 70°C. Les ARN sont repris dans un mélange contenant l'enzyme transcriptase inverse (40U) (ImPromII Reverse Transcriptase, Promega), un mélange de quatre deoxynucléotides (0,25mM) (dNTP, AppliedBiosystems), de chlorure de magnésium (3mM) (Promega), d'un inhibiteur de ribonucléases (1U/µL) (Rnasin, Promega), de tampon (1x) (ImProm Buffer, Promega) et de l'eau stérile. La réaction de RT s'effectue dans un volume de 20 µL avec le Thermo Cyclor GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) (5 min à 25°C, hybridation des hexamères ; 60 min à 42°C, étape d'élongation et 15 min à 70°C, dénaturation finale de l'enzyme).

La quantité relative des transcrits d'intérêt est évaluée par PCR quantitative (qPCR). Chaque qPCR est réalisée en triplicat dans un volume réactionnel de 10µL. L'expression des gènes d'intérêt est quantifiée par rapport à l'expression d'un gène de ménage (ABL1 ou GUSB) dans les différents échantillons d'ADNc ainsi que dans un échantillon d'ADNc de calibration (préparé à partir d'un mélange de plusieurs ARN afin de normaliser les différentes plaques de qPCR entre elles).

Pour les gènes quantifiés avec la technologie TaqMan (CXCR4, TNFAIP3, ABL1), le volume réactionnel contient 4,5µL d'ADNc (soit 10ng d'équivalent ARN), auquel est ajouté 5µl de master mix TaqMan™ (TaqMan Gene Expression MasterMix) et 0,5µl de Sonde TaqMan (TaqMan gene expression Assay 20x)(Tableau 7). L'amplification et la détection en temps réel des ADNc s'effectuent selon le programme : dénaturation initiale 2min à 94°C, suivie de 40 cycles d'amplification (dénaturation de l'ADN 15sec à 94°C, hybridation des amorces 30sec à 53°C et une étape d'élongation 60sec à 60°C) (LightCycler480, Roche). Pour les gènes quantifiés avec la technologie SYBR™ Green (EGR2, CALR et GUSB), le volume réactionnel contient 2µl d'ADNc (soit 10ng d'équivalent ARN), auquel est ajouté 5µl de master mix SYBR™ Green (LightCycler™ 480 SYBR Green I Master), 1µl d'amorces sens et antisens (2,5µM)(Tableau 7) ainsi que de l'eau sans RNase/DNase (Qiagen) en quantité suffisante pour un volume final de 10µl. L'amplification et la détection en temps réel des ADNc s'effectue selon le programme : dénaturation initiale 2min à 94°C, suivie de 40 cycles d'amplification (dénaturation de l'ADN 15sec, 94°C ; hybridation des amorces 30sec à 53°C et une étape d'élongation 1min à 60°C)(LightCycler480, Roche). Une courbe de fusion permet de vérifier l'absence d'amplification aspécifique.

Les résultats sont analysés avec le logiciel LightCycler480 (Roche) selon la méthode de quantification $\Delta\Delta Ct$. Le rapport ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ (gène d'intérêt) - Ct (gène de ménage)) est normalisé à l'aide de la quantification d'un ARN calibrateur ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (échantillon 1) - ΔCt (calibrateur)). L'expression relative du gène d'intérêt par rapport au gène contrôle et à l'échantillon calibrateur est exprimée sous la forme $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Gène	Référence	Fournisseur
<i>hCXCR4</i>	Hs00976734_m1	ThermoFisher
<i>hTNFAIP3</i>	Hs00234713_m1	ThermoFisher
<i>hABL1</i>	Hs01104728_m1	ThermoFisher
<i>hEGR2</i>	Fwd : GAG GCC CCT TTG ACC AGA TGA A Rev : TGC CCA TGT AAG TGA AGG TCT GGT	ThermoFisher
<i>hCALR</i>	Fwd : GAG CCT GCC GTC TAC TTC AA Rev : TCG TCA CCG TAG AAC TTG CC	ThermoFisher
<i>hGUSB</i>	Fwd : GCC ACC CAG TTT GAG AGA ACT GGT Rev : TGG ATC CTG GTG AAA CCC TGC AAT	ThermoFisher

Tableau 7 : Liste des sondes TaqMan et des amorces SybrGreen utilisées en qPCR.

Extraction protéique et Western blot

Les protéines sont extraites par lyse chimique avec un tampon contenant du Tris 1M pH8, NaCl 5M, Igepal 2% (CA-630, Sigma-Aldrich), des inhibiteurs de protéases (Roche) et de phosphatases (Sigma). La concentration protéique des échantillons est mesurée par la méthode de Bradford (protein assay dye reagent concentrate, BioRad) à l'aide d'un spectrophotomètre (Bio-Tek Instruments). Après reprise des protéines dans du tampon de dépôt 4X (Laemmli sample buffer 4X, BioRad) et dénaturation (100°C pendant 5min), les protéines (30µg) ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (prestained two colors protein ladder 10-170 kDa, Euromedex) sont séparées sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE 10%) (1h30-30mA) associant un gel de séparation (450mM Tris-HCl pH 8.7, 8% v/v Acrylamide/Bis Solution 37.5:1, 0,1% p/v SDS, 0,1% p/v Ammonium persulfate, 0.1% v/v Temed, BioRad) et un gel de concentration (500 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% v/v acrylamide/bis Solution 37.5:1, 0,1% p/v SDS, 0,075% p/v ammonium persulfate, 0.1% v/v Temed, BioRad). La migration électrophorétique se fait dans un tampon de migration Tris-glycin (25mM Tris-base pH 8.3, 192 mM glycine pH 8.3, 0.1% v/v SDS) à 30mA/gel (Mini Protean, BioRad). Après migration, les protéines sont transférées pendant 1h à 350mA par électrophorèse sur une membrane de polyfluorure de vinylidène préalablement activée à l'éthanol pur (Immuno-Blot PVDF Membrane 0.2µm, Millipore). Le transfert s'effectue dans un tampon composé de 25mM Tris-base pH 8.3, 192mM glycine, 20% v/v éthanol pur. La membrane est ensuite saturée pendant 30 min à température ambiante

avec une solution contenant de l'albumine de sérum de bœuf (Euromedex) (1% p/v BSA, PBS, 0.1% v/v Tween20). La membrane est alors incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Tableau 8) dilué sous agitation douce puis incubée 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) dilué dans du tampon de saturation (1% p/v BSA, PBS, 0.1% v/v Tween20) sous agitation douce. Après lavage de la membrane (PBS-0,1% v/v Tween20), les protéines sont révélées par chimioluminescence selon les recommandations du fabricant (ECL Western blotting detection reagents, Amersham) et révélées soit sur un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham), soit par chimioluminescence sur l'appareil PXI (Syngene). L'intensité relative des bandes est mesurée et calculée à l'aide du logiciel ImageJ. L'abondance de chaque protéine est normalisée grâce à l'utilisation d'un échantillon standard.

Protéine	Référence	Fournisseur	Isotype	Spécificité	Dilution
Anti-TNFAIP3	sc-1666692	SantaCruz Biotechnology	IgG de souris	Monoclonal	1/5000
Anti-CALR	12238S	Cell Signalling	IgG de lapin	Monoclonal	1/5000
Anti-GAPDH	sc-20357	SantaCruz Biotechnology	IgG de chèvre	Monoclonal	1/10 000
Anti-mouse HRP	7076P2	Cell Signalling	IgG de cheval	Polyclonal	1/10 000
Anti-Rabbit HRP	5127S	Cell Signalling	IgG de souris	Monoclonal	1/10 000
Anti-goat HRP	sc-2354	SantaCruz Biotechnology	IgG de souris	Monoclonal	1/10 000

Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés en Western-Blot.

Microscope à illumination structurée (apotome Zeiss™)

Après transfection avec un siRNA fluorescent (siRed ou siGlo), les cellules sont récupérées à différents temps, lavées au PBS, puis fixées au paraformaldéhyde 4% (Electron microscopy Science). Les cellules fixées sont ensuite marquées au DAPI afin de visualiser les noyaux puis déposées entre lame et lamelle dans 20µl de milieu de montage (Vectastain, Fluor Save reagent, Merck). Les lames sont incubées pendant 1 nuit à température ambiante puis sont analysées à l'aide d'un microscope à illumination structurée (apotome Zeiss™) permettant la visualisation du DAPI et du siRNA fluorescents.

Analyses statistiques

Les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel Graphpad Prism 7.0 (Graphpad software Inc). Dans un premier temps, la normalité de chaque échantillon est testée par un test Shapiro-Wilk. Si les échantillons suivent la loi normale, un t-test apparié est appliqué. Sinon, un test de Wilcoxon est utilisé. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

E- Résultats

1- Validation de l'expression des gènes cibles retenus

Des échantillons de lymphocytes ont été isolés de prélèvements issus de patients porteurs de LLC, suivis aux Hôpitaux de Strasbourg et n'ayant pas été inclus dans l'étude transcriptionnelle et protéomique précédente. Une activation du BCR (anti-IgM et cytokines T) de ces lymphocytes de LLC et de la lignée BL2 réalisées *ex vivo* dans les mêmes conditions que précédemment. L'expression des différents gènes cibles et de leur protéine ont été quantifiés à différents temps après stimulation cellulaire et les cinétiques d'expression obtenus par qPCR et WB ont été comparées aux données de RNAseq et protéomique.

a- CALR

L'analyse par RNAseq de l'expression de CALR dans des échantillons de lymphocytes primaires de LLC a montré que ce gène est exprimé à l'état basal (avant activation du BCR) dans les lymphocytes de LLC et que son expression augmente régulièrement après activation du BCR (Figure 25A). Ce profil temporel d'expression a été confirmé dans des lymphocytes de patients LLC supplémentaires (n=3). Cette augmentation d'expression a été retrouvée dans la lignée BL2 (n=3), mais uniquement pendant 6h après l'activation du BCR. Après 6h, l'expression de CALR diminue dans cette lignée (Figure 25C).

Dans les lymphocytes de LLC, la protéine CALR a été retrouvée à l'état basal par spectrométrie et son abondance augmente légèrement au cours du temps après activation du BCR (Figure 25D). L'analyse de cette abondance par WB dans les lymphocytes d'un premier patient LLC permet de retrouver cette augmentation régulière après activation du BCR (Figure 25E) et cette dynamique temporelle a également été retrouvée dans la lignée BL2 (n=3) par WB (Figure 25F).

b- EGR2

Le facteur transcriptionnel EGR2 n'est pas exprimé à l'état basal dans les lymphocytes de LLC. Son expression est induite aux temps précoces après activation de ce récepteur, avec un pic d'expression à 1h-1h30 (Figure 26A). Nous avons validé ce profil d'expression par qPCR dans une autre série de lymphocytes issus de patients LLC (n= 3) (Figure 26B), ainsi que dans des lymphocytes de la lignée BL2. Dans cette lignée, l'augmentation d'expression est cependant plus faible que dans les lymphocytes primaires et elle persiste jusqu'à trois jours après activation du BCR (Figure 26C).

La protéine EGR2 n'a pas été détectée par spectrométrie de masse dans cette étude et n'a pas été recherchée par WB.

c- TNFAIP3

L'analyse par RNAseq a montré que le gène TNFAIP3 n'est pas exprimé à l'état basal dans les lymphocytes de LLC. Son expression est induite précocement (1h-1h30) après activation du BCR, puis diminue, avant d'augmenter à nouveau à 24h (Figure 27A). Ce profil d'expression temporel bi-phasique a été confirmé par qPCR dans des échantillons issus de patients supplémentaires (n=3) (Figure 27B) et a également été observé dans la lignée BL2, mais en quantité plus faible.

L'analyse par spectrométrie de masse a mis en évidence une augmentation progressive de son abondance après activation du BCR (Figure 27D). Une première analyse par WB dans un échantillon de lymphocyte de patient supplémentaire et de lymphocytes BL2 a également montré une augmentation de son abondance (Figure 27E-F).

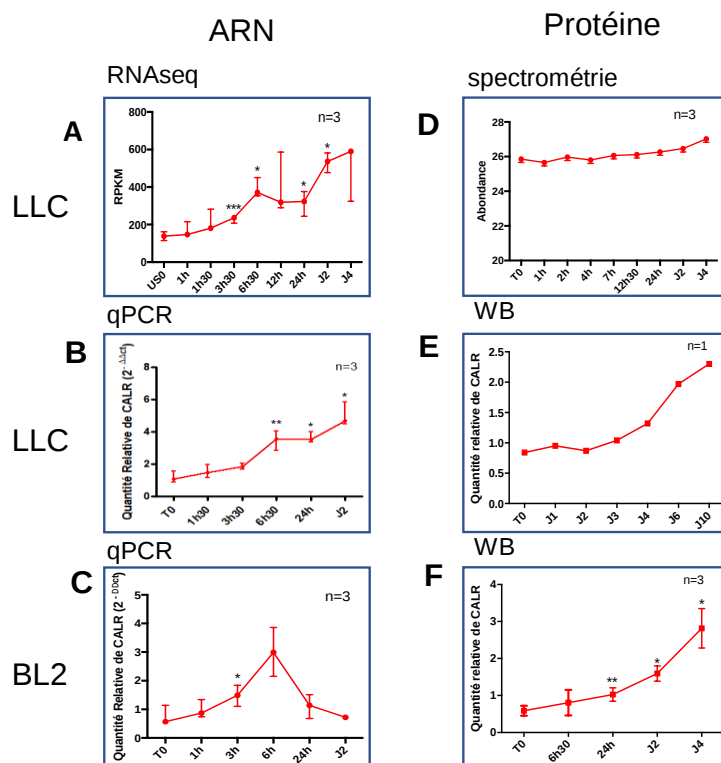


Figure 25 : CALR.

Expression du gène CALR (A) et abondance de sa protéine (D), respectivement mesurée par RNAseq (RPKM) et par spectrométrie de masse (UA) déterminées dans 3 échantillons de lymphocytes de LLC après activation du BCR. Validation de l'expression par qPCR (quantité relative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) ou WB dans des échantillons supplémentaires de LLC (B, E) ou de la lignée BL2 (C, F). La médiane et l'intervalle de confiance à 95% sont représentés pour chaque condition.

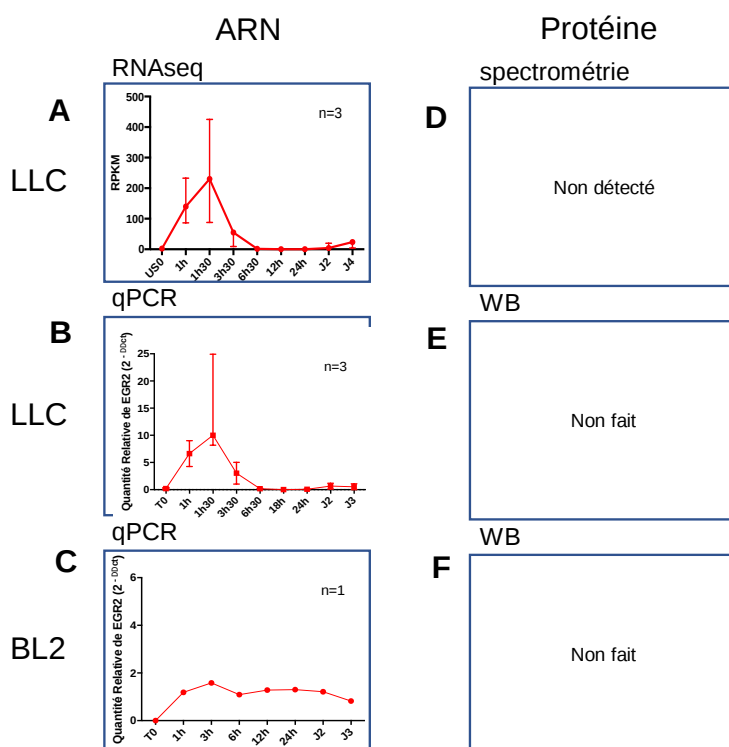


Figure 26 : EGR2.

Expression du gène EGR2 au cours du temps après activation du BCR mesurée par RNAseq dans 3 échantillons de lymphocytes de LLC (A). Trois autres échantillons cellulaires prolifératifs issus de patients porteurs de la LLC (B) ou issus de la lignée cellulaire BL2 (C) ont permis de valider la cinétique temporelle d'EGR2 après activation du BCR, par qPCR. La médiane et l'intervalle de confiance à 95% sont représentés pour chaque condition.

d-CXCR4

L'analyse du profil temporel d'expression du gène CXCR4 par RNAseq a montré une expression à l'état basal et une augmentation de cette expression 1h après activation du BCR. Après ce pic, on observe une forte diminution de son expression qui devient inférieur à l'état basal après 6h de stimulation et jusqu'au 4^{ème} jour de la stimulation. (Figure 28A). Ce profil d'expression a été validé dans des lymphocytes issus de patients supplémentaires (n=3) (Figure 28B), ainsi que dans la lignée BL2 (Figure 28C).

L'étude par spectrométrie de masse a montré que la protéine CXCR4 est présente à l'état basal et son abondance persiste dans les lymphocytes de LLC après activation du BCR. Nous observons tout de même une diminution brève de son abondance 1h après la stimulation du BCR (Figure 28D).

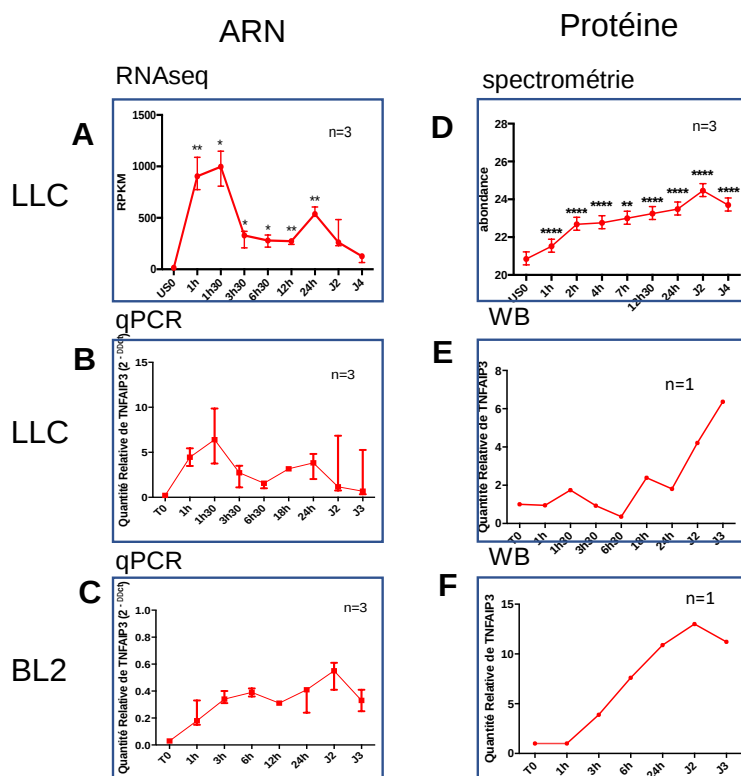


Figure 27 : TNFAIP3. Expression du gène TNFAIP3 (A) et de sa protéine (D) au cours du temps après activation du BCR. Validation de l'expression par qPCR ou WB dans des échantillons de patients supplémentaires (B, C) ou dans la lignées BL2 (C, F). La médiane et l'intervalle de confiance à 95% sont représenté pour chaque condition.

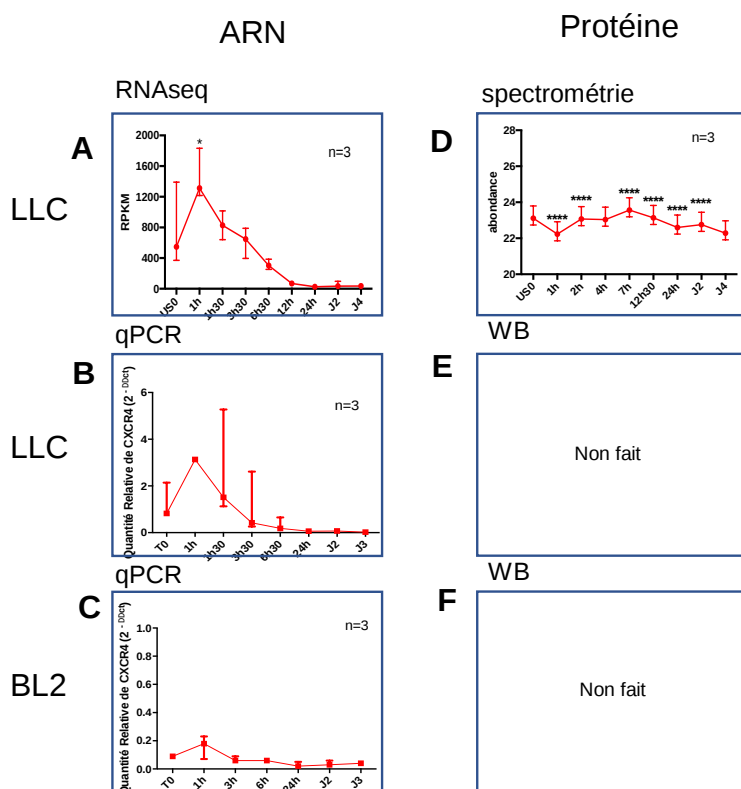


Figure 28 : CXCR4. Expression du gène CXCR4 (A) et de sa protéine (D) au cours du temps après activation du BCR. Validation de l'expression par qPCR ou WB dans des échantillons de patients supplémentaires (B, C) ou dans la lignées BL2 (C, F). La médiane et l'intervalle de confiance à 95% sont représenté pour chaque condition.

La protéine CXCR4 étant fixée à la membrane, nous avons analysé son expression par cytométrie en flux. Nous avons détecté ce récepteur à la surface des lymphocytes de LLC à l'état basal et cette expression persiste *ex vivo* en culture. Cependant, nous avons observé une diminution de son expression à la surface cellulaire après activation du BCR dans des échantillons de lymphocytes de LLC (n= 2) (Figure 29).

Une étude a rapporté que la stimulation des lymphocytes de LLC avec de l'IL21 induit une surexpression de la protéine GRK6 qui phosphoryle CXCR4, ce qui induit une activation de vésicules à clathrine et l'endocytose de ce récepteur (Yoshida et al., 2011). Cette perte d'expression ne nous a donc pas permis d'utiliser l'analyse en cytométrie de flux comme marqueur d'efficacité des expériences de diminution d'expression du gène CXCR4 comme nous l'avions envisagé.

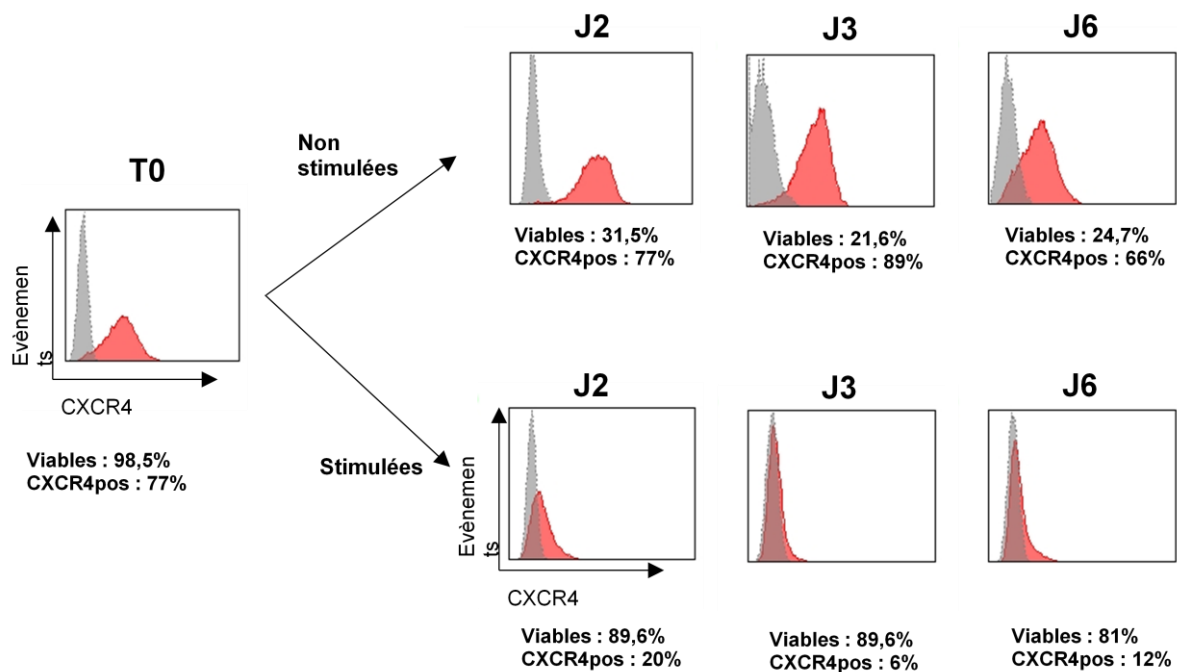


Figure 29 : Effet de l'activation du BCR sur l'abondance protéique de CXCR4. L'abondance de la protéine CXCR4 est mise en évidence par cytométrie en flux grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-CXCR4 (histogramme rouge) et d'un isotype contrôle correspondant (histogramme gris). Cette abondance protéique est déterminée sur la fraction cellulaire viable grâce à l'utilisation de DAPI. L'abondance protéique a été mesurée au cours du temps (T0/J2/J3/J6) sur 2 échantillons cellulaires issus de patients porteurs de LLC après activation du BCR (anti-IgM + CD40L + IL4). Les résultats obtenus avec un échantillon de lymphocytes de LLC sont représentés.

2- Validation des méthodes de délivrance de siRNA dans les lymphocytes

Avant de réaliser des expériences de diminution d'expression des gènes cibles, nous avons analysé l'efficacité et la tolérance de différentes méthodes de délivrance de petites molécules. Dans un premier temps nous avons retenus différents vecteurs non viraux couramment utilisés pour la transfection de cellules primaires : un vecteur lipidique (lipofectamine®RNAimax), un vecteur lipidique associé à des protéines virales (Viromer®), ainsi que la méthode par électroporation (Amaxa® Nucleofector).

2.1- Analyse de l'efficacité de transfection

Après avoir transfecté un siRNA fluorescent (siGLO) avec chacune de ces trois méthodes, nous avons analysé les lymphocytes transfectés à l'aide d'un microscope à illumination structurée (Apotome de Zeiss).

Les expériences menées sur la lignée BL2 (n=2) montrent un faible pourcentage de délivrance du siRNA fluorescent à l'intérieur des cellules avec ces trois méthodes à 6h et 24h après transfection (Figure 30). L'analyse microscopique a montré que de nombreux liposomes contenant des siRNA fluorescents semblent se fixer à la membrane sans pénétrer dans la cellule.

Ces mêmes expériences répétées avec des lymphocytes de LLC (n=2) montrent la présence de siRNA fluorescent à l'intérieur des cellules avec les deux méthodes lipidiques (Figure 31). Cette fluorescence est mise en évidence dès 6h et augmente à 24h après transfection. Les expériences de transfection par électroporation n'ont pas permis de mettre en évidence de fluorescence intra-cellulaire et doivent être répétées (nécessité de quantifier le pourcentage de cellules fluorescentes dans les différentes conditions).

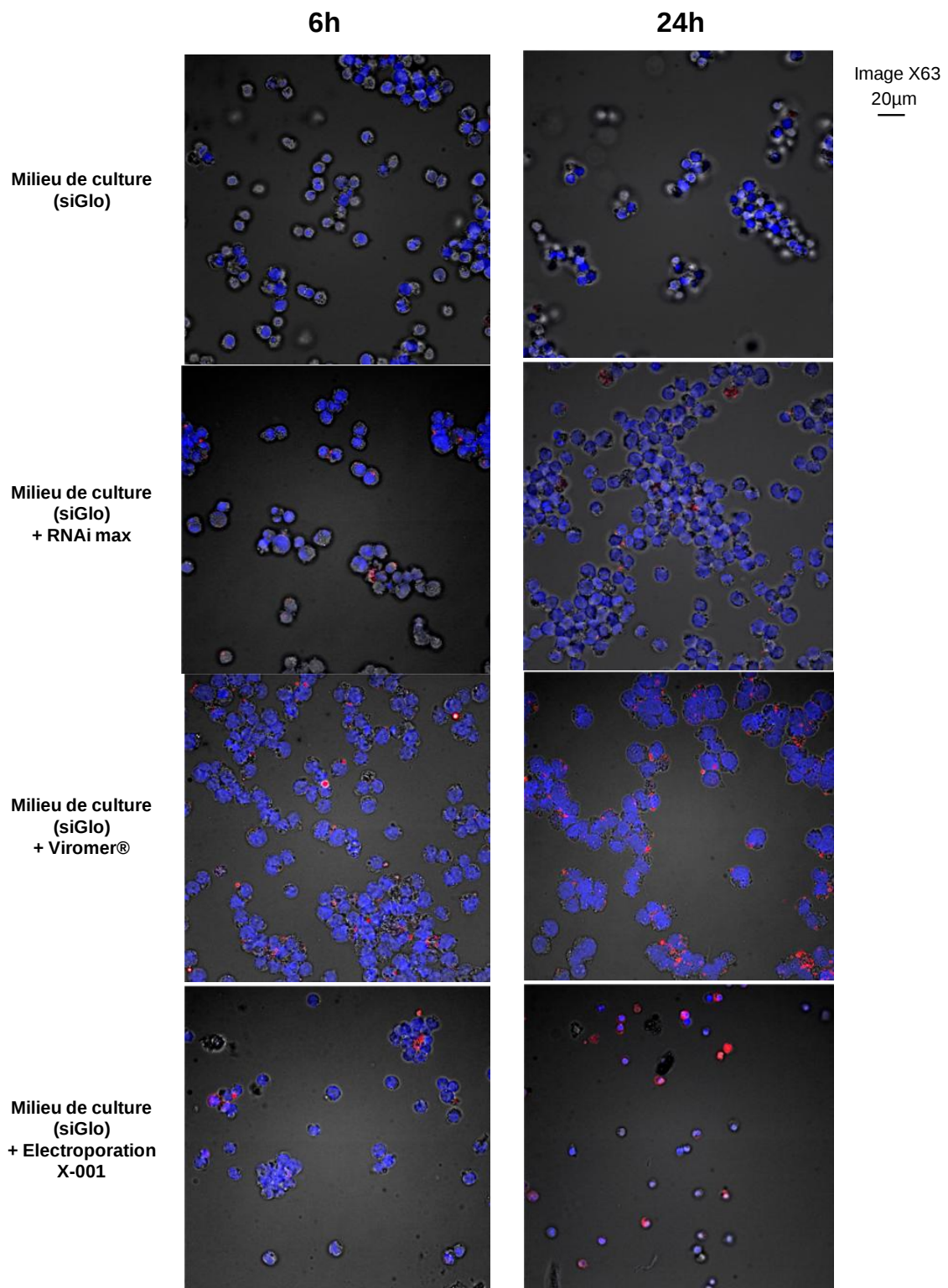


Figure 30 : Délivrance de siRNA fluorescent (siGlo) dans la lignée cellulaire BL2. Les cellules ont été mises en présence de siGlo ou en présence de siGlo associés à une méthode de transfection (RNAimax, Viromer ou électroporation). Après une incubation d'une durée de 6h (panneau de gauche) ou de 24h (panneau de droite), les cellules ont été perméabilisées, fixées puis marquées au DAPI. La fluorescence analysée à l'aide d'un microscope à illumination structurée permet de mettre en évidence les noyaux cellulaires (bleu) ainsi que la présence du SiGlo (rouge).

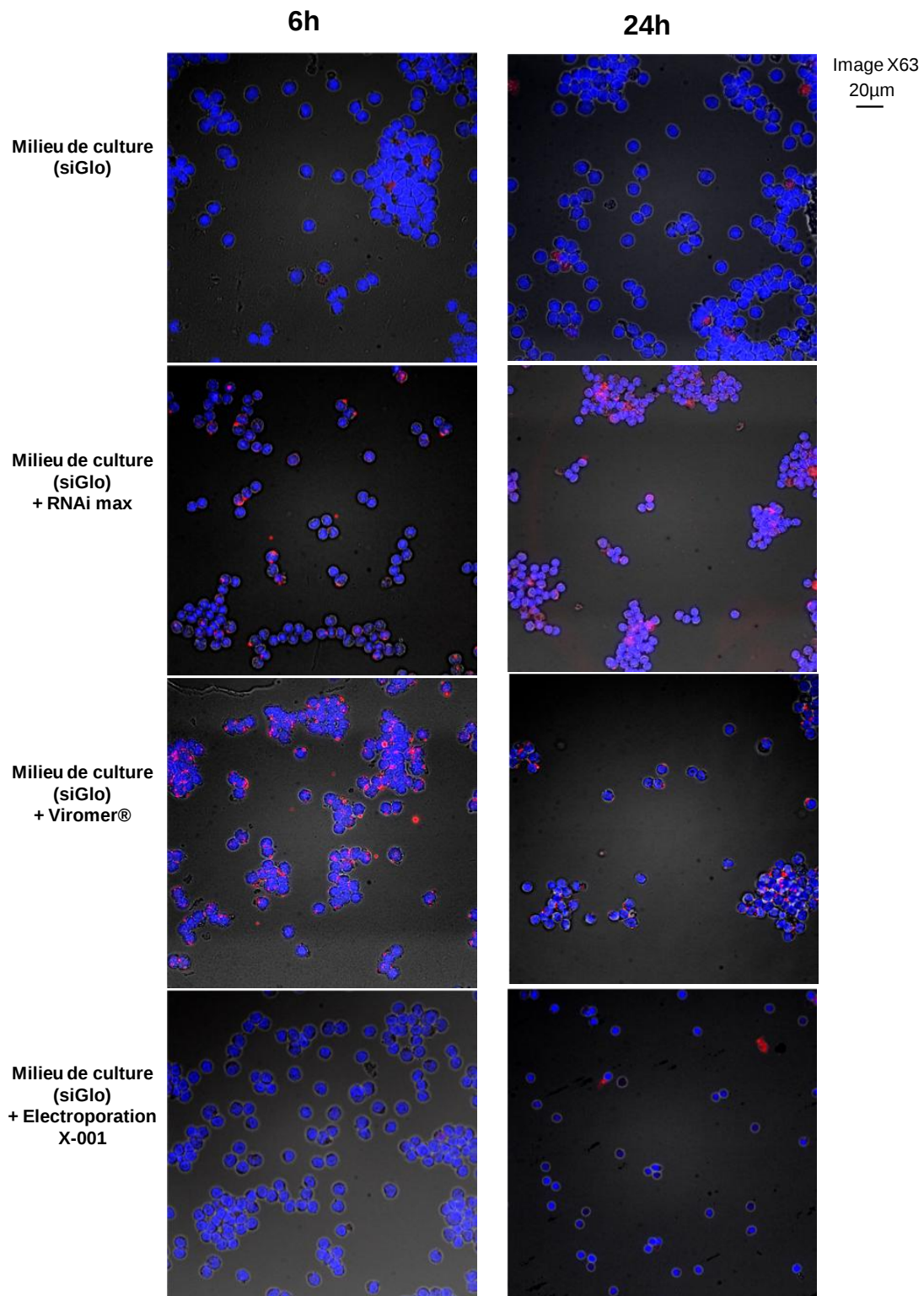


Figure 31 : Délivrance de siRNA fluorescent (siGlo) dans des lymphocytes primaires de LLC. Les cellules ont été mises en présence de siGlo ou en présence de siGlo associés à une méthode de transfection (RNAimax, Viromer ou électroporation). Après une incubation d'une durée de 6h (panneau de gauche) ou de 24h (panneau de droite), les cellules ont été perméabilisées, fixées puis marquées au DAPI. La fluorescence analysée à l'aide d'un microscope à illumination structurée permet de mettre en évidence les noyaux cellulaires (bleu) ainsi que la présence du SiGlo (rouge).

2.2- Analyse de la tolérance de la transfection

Nous avons ensuite analysé l'effet de ces trois méthodes de transfection, ainsi que de la méthode Accell (siRNA modifié pour permettre sa pénétration directe dans la cellule) sur la viabilité lymphocytaire et la prolifération. Sur la lignée BL2, les vecteurs lipidiques et la technologie Accell n'ont pas montré de modification de la survie cellulaire dans les 24h après transfection (Figure 32A-C). En revanche, nous avons observé une forte mortalité cellulaire avec l'électroporation (Figure 32D).

Aucune modification de la survie des lymphocytes primaires de LLC n'a été observée avec la lipofectamine® RNAimax ou la technologie Accell (Figure 32E-F). Une mortalité importante a cependant été observée avec le Viromer® 24h et 6 jours après transfection (Figure 32G). De même, dès 24h et après 6 jours, une forte mortalité a également été observée avec l'électroporation (Figure 8H), confirmant les résultats précédant de l'équipe (Vallat et al., 2013). Un comptage des cellules vivantes six jours après transfection et activation du BCR (n=5) montre une diminution de 78% et de 80% avec le Viromer® et l'électroporation, par rapport aux conditions non transfectées (Figure 32I).

Nous avons ensuite étudié la répercussion des différentes méthodes de délivrance préservant la viabilité cellulaire (lipofectamine et accell) sur la prolifération cellulaire six jours après transfection et activation du BCR. Les résultats montrent que la capacité de prolifération est conservée avec ces deux méthodes (Figure 33A-B). Compte tenu de ces résultats, le vecteur lipidique Lipofectamine RNAimax a été retenu pour la suite de l'étude.

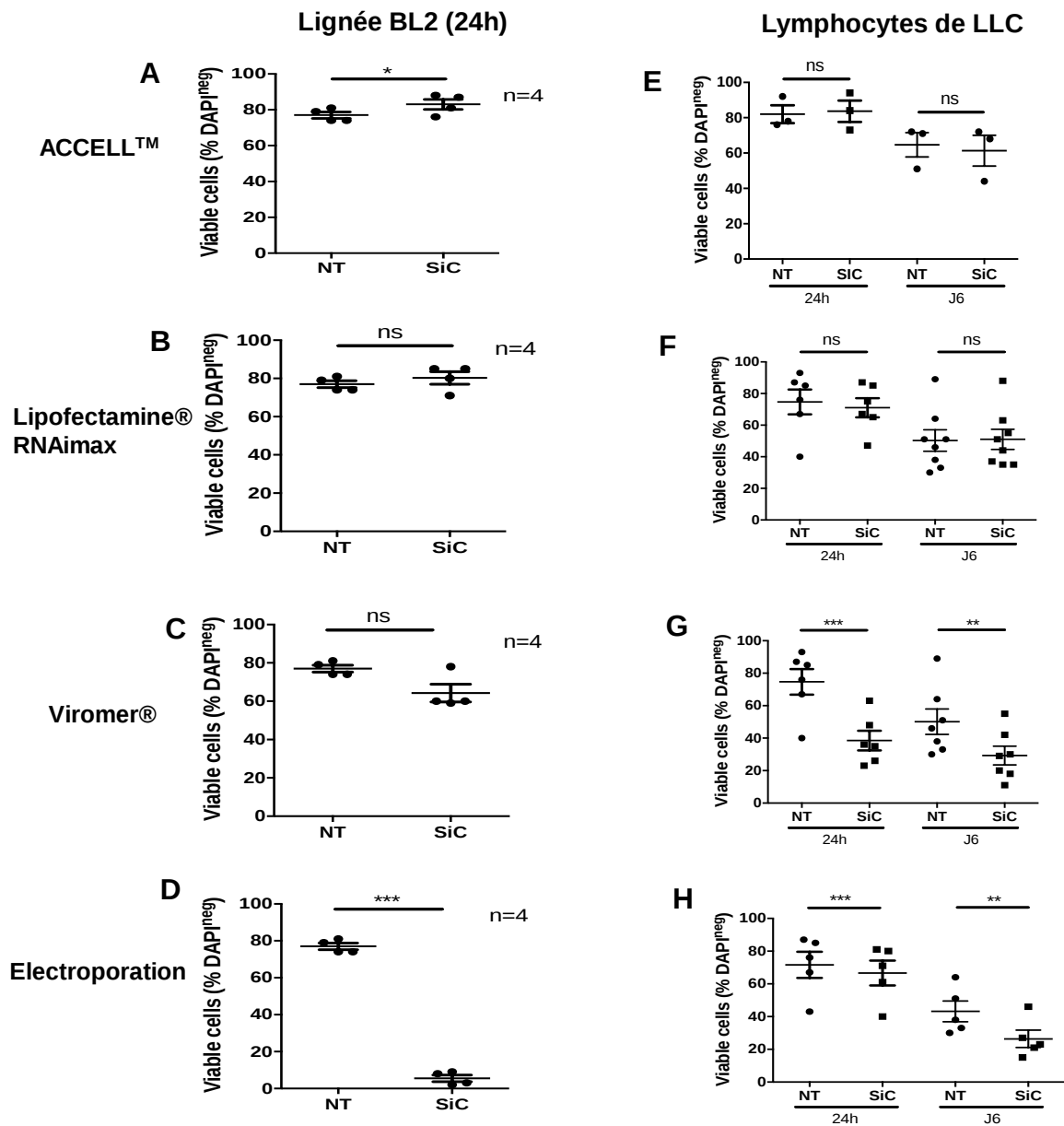


Figure 32 : Effet du milieu de transfection sur la viabilité cellulaire. Le pourcentage de cellules viables a été déterminé par cytométrie en flux grâce à l'utilisation du DAPI. L'effet de différentes méthodes de transfection sur la viabilité de la lignée cellulaire BL2 (A, B, C, D) ou sur les lymphocytes de LLC (E, F, G, H) a été mesurée 24h après transfection ou non d'un siRNA control dans les BL2 et 24h et 6 jours après transfection ou non d'un siRNA control dans les lymphocytes de LLC. Les méthodes de transfection par Accell (A, E), par RNAimax (B, F), par Viromer (C, G) et par Electroporation (D, H) ont été testées. Comptage cellulaire 6 jours après transfection. Ratio du nombre de cellules dans la condition transfectée / nombre de cellules dans la condition non transfectée après transfections par méthodes RNAimax, Viromer ou électroporation (I).

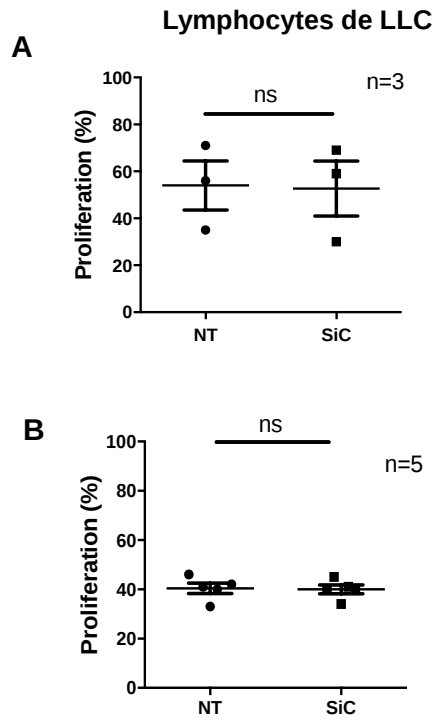


Figure 33 : Effet de la méthode de transfection sur la prolifération de lymphocytes primaires de LLC. L'effet de la méthode de transfection par ACCELL (A) et RNAimax (B) sur la prolifération lymphocytaire a été déterminé 6 jours après activation du BCR et transfection ou non d'un siRNA control. Le pourcentage de prolifération des cellules viable a été déterminé par cytométrie en flux grâce à l'utilisation du CFSE et du DAPI.

3- Diminution d'expression du gène CALR dans les lymphocytes de LLC

3.1- Validation de l'efficacité du siRNA CALR dans la lignée AGS

Nous avons utilisé des cellules de la lignée AGS (facilement transfectables) afin de valider les conditions expérimentales du silencing du gène CALR. Après transfection d'un siRNA fluorescent à l'aide de Lipofectamine RNAimax, nous avons validé l'efficacité de délivrance de siRNA dans ces cellules par microscopie 6h après transfection (Figure 34A). Nous avons ensuite mis en évidence une diminution de 93% des transcrits CALR à 24h (qPCR) (Figure 34B) et une diminution de 76% de l'abondance de la protéine à 48h (WB) (Figure 34C), confirmant ainsi l'efficacité du siRNA dirigé contre CALR dans ce modèle cellulaire.

3.2- Détermination des conditions d'utilisation du siRNA CALR dans les lymphocytes de LLC

Nous avons ensuite déterminé les meilleures conditions expérimentales pour réaliser le silencing dans des lymphocytes issus de différents patients. L'analyse des résultats de fluorescence cellulaire à différents temps (6h, 12h et 24h) après transfection d'un siRNA fluorescent (Figure 31), ainsi que des premiers résultats de silencing laissent supposer qu'un délai de 6h est nécessaire pour l'entrée du siRNA et sa biodisponibilité dans le cytoplasme lymphocytaire.

Ces résultats nous ont permis d'établir un plan expérimental comprenant plusieurs étapes pour réaliser le silencing : 1) recueil de sang total et isolement des lymphocytes de LLC, 2) transfection du siRNA et marquage CFSE, 3) après un délai de 6h, activation du BCR induisant l'expression de CALR dans les lymphocytes, 4) à J1, J2, J3 et J4, recueil ARN et protéines et 5) à J6 mesure de la prolifération lymphocytaire (Figure 35A).

Par ailleurs, malgré une hétérogénéité des caractéristiques cellulaires des lymphocytes tumoraux des différents patients, des tests de molarité (n=2 ; 30nM, 60 nM, 120 nM) (Figure 35B-C) nous ont permis de retenir une concentration de 60nM de siRNA pour réaliser les transfections dans la suite de l'étude.

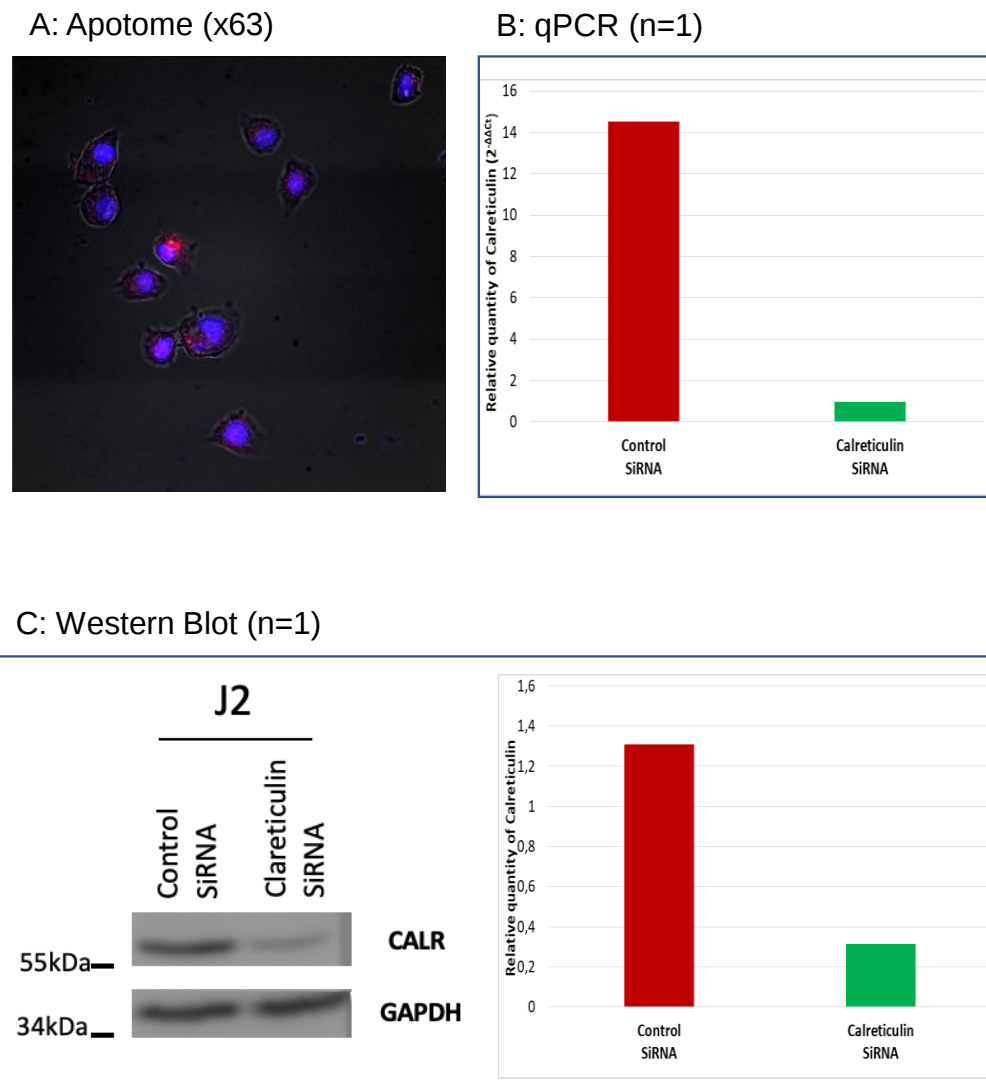


Figure 34 : Validation du siRNA anti-CALR sur la lignée cellulaire AGS après transfection à l'aide de lipofectamine RNAimax. (A) Cellules AGS après transfection de siGlo (30nM) par RNAimax. Après 24h d'incubation, les cellules ont été perméabilisées, fixées puis marquées au DAPI. La fluorescence permet de mettre en évidence les noyaux cellulaires (bleu) ainsi que la présence du siGlo (rouge). (B) La quantité relative du gène CALR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) est déterminée par qPCR après 24h de transfection avec un siRNA control ou anti-CALR (C). La quantité relative de la protéine CALR est déterminée par Western Blot après 48h de transfection avec un siRNA control ou anti-CALR.

A Plan expérimental

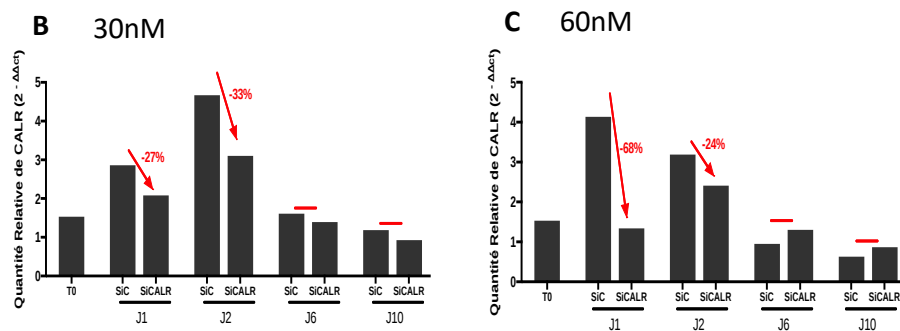
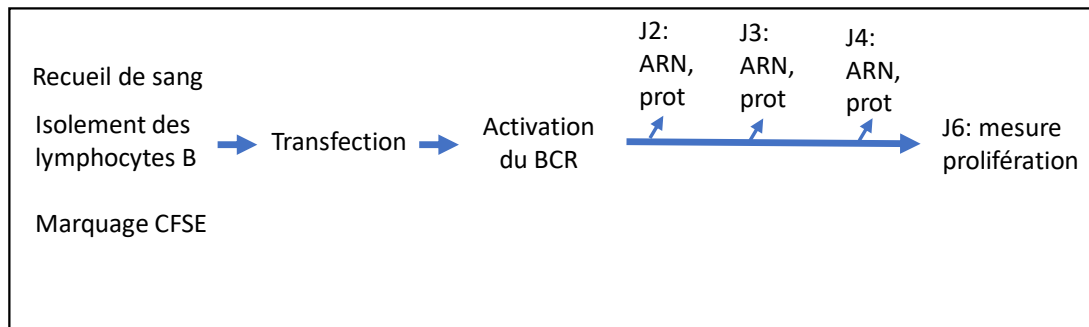


Figure 35 : Plan expérimental et détermination des conditions d'utilisation du siRNA anti-CALR. Plan expérimental (A) Représentation de la quantité relative du gène CALR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dans 2 échantillons de lymphocytes primaires de LLC, déterminée par qPCR, au cours du temps, après transfection par RNAimax de 30nM (B) ou 60nM (C) de siRNA control ou anti-CALR.

3.3- Modulation de l'expression du gène CALR dans les lymphocytes de LLC

Les expériences de diminution d'expression du gène CALR ont été réalisées avec des lymphocytes primaires issus d'une série de 12 patients porteurs de LLC, vus en consultation dans le service d'hématologie des HUS.

Compte tenu de l'hétérogénéité de réponse cellulaire des lymphocytes issus de différents patients (Cedric, Screp 2019), un contrôle de la réponse transcriptionnelle et proliférative a été réalisé pour les lymphocytes issus de ces 12 patients. Ce contrôle a révélé que 9 échantillons lymphocytaires, sur les 12 testés présentent une réponse transcriptionnelle avec augmentation de l'expression du gène CALR (avec quantité relative >2) par rapport à l'expression à l'état basal (Figure 36A).

Une expérience de silencing a alors été réalisée sur les lymphocytes de 7 des 9 patients retenus.

Parmi ces 7 échantillons, 6 présentent une diminution de l'expression du gène CALR (min 18%, moyenne 31% ; max 68%) ($p=0,0077$) après transfection du siRNA dirigé contre ce gène, comparé à l'échantillon transfecté avec un siRNA contrôle (Figure 36B).

L'analyse de l'abondance de la protéine CALR effectuée par WB à différents temps (J2, J3, J6, J10) dans deux de ces échantillons silencés n'ont pas permis de mettre en évidence une diminution de l'abondance protéique de CALR.

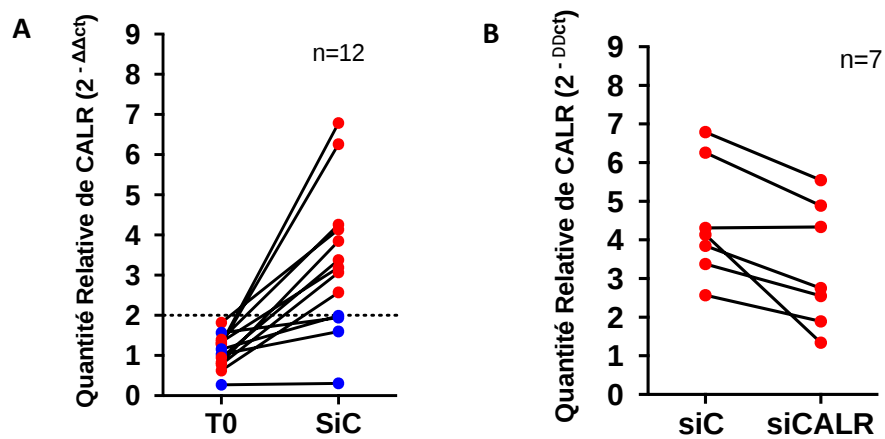


Figure 36 : Modulation d'expression du gène CALR après activation du BCR. (A) Représentation de la quantité relative du gène *CALR* dans une cohorte de 12 échantillons de lymphocytes LLC avant (T0) et 24h après stimulation et transfection control (SiC). (B) Représentation de la quantité relative du gène *CALR* dans une série de 7 échantillons de lymphocytes LLC 24h après stimulation et transfection par RNAimax de 60nM de siRNA control (SiC) ou de 60nM de SiRNA anti-CALR (SiCALR).

3.4- Un faible pourcentage de délivrance limite le silencing

Pour un de ces échantillons lymphocytaires transfecté avec un siRNA dirigé contre le gène *CALR*, nous avons réalisé en parallèle une transfection de siRNA fluorescent (siGLO).

L'analyse microscopique a montré que 30% des lymphocytes transfectés présentaient une fluorescence cytoplasmique (comptage réalisé sur 10 champs au microscope, soit environ 300 lymphocytes). A noter que l'analyse de ces mêmes cellules en cytométrie en flux montrait 80% de lymphocytes fluorescents. Ces faux positifs pouvant être expliqués par l'observation de molécules de siRNA fluorescente dans des liposomes fixés à la membrane cellulaire, mais non internalisés après 24h de contact.

La transfection de siRNA anti-CALR réalisée en parallèle a mis en évidence une diminution de 30% de l'expression du transcrit de CALR dans cet échantillon transfecté, comparé à l'expression de ce gène dans l'échantillon siControl (qPCR).

Cette observation, qui doit être répétée avec d'autres échantillons lymphocytaires permet de faire l'hypothèse que 30% des lymphocytes de cet échantillon ont internalisé des siRNA anti-CALR et que le silencing pourrait être complet dans ces lymphocytes transfectés.

La faible délivrance de siRNA dans les lymphocytes primaires issus de certains patients pourrait donc expliquer la faible diminution d'expression du transcrit du gène cible dans ces cellules.

4- Amélioration du modèle de stimulation lymphocytaire *ex vivo*.

Pour réaliser les expériences décrites précédemment, mon équipe a mis en place un modèle d'activation du BCR *ex vivo* permettant d'induire la prolifération de lymphocytes primaires tumoraux issus du sang périphérique (lymphocytes arrêtés au stade G0/G1) de patients porteurs de LLC (Schleiss et al., 2019). Cette activation est réalisée en milieu soluble (permettant de récupérer facilement les lymphocytes en culture), ou en milieu semi-solide (permettant de recréer un environnement 3D présent dans les organes lymphoïdes). Le méthyl-cellulose utilisé pour ce milieu 3D contient du BME, un agent

anti-oxydant. Etant donné que les lymphocytes de LLC présentent une réponse proliférative plus importante dans le méthyl-cellulose (Schleiss et al., 2019) nous avons cherché à savoir si le BME contenu dans ce milieu pourrait favoriser également la réponse proliférative en milieu soluble. Pour cela, nous avons comparé la réponse proliférative d'une série de patients porteurs de LLC (n=10), six jours après activation du BCR et cultivés ensuite *ex vivo* en milieu soluble avec et sans BME, ainsi qu'en milieu semi-solide.

Nos résultats ont montré que l'ajout de BME dans le milieu soluble augmente effectivement la prolifération cellulaire six jours après activation du BCR ($p=0,002$). Cependant, cet ajout de BME n'a pas permis d'atteindre une prolifération identique à celle observée dans le milieu semi-solide ($p=0,006$) (Figure 37A).

Pour préciser l'effet du BME sur la réponse proliférative, nous avons alors procédé à des activations lymphocytaires en utilisant les différentes cytokines de façon isolées puis en combinaison. Ces expériences ont permis de confirmer que l'association anti-IgM + CD40L + IL4 + IL21 est nécessaire pour obtenir une prolifération en milieu soluble (Figure 37B). Il est intéressant de noter que l'ajout de BME pourrait éviter d'utiliser de l'IL4 dans cette combinaison en milieu soluble. Compte tenu de l'hétérogénéité de réponse cellulaire des lymphocytes issus de différentes catégories de patients, ces expériences doivent cependant être répétées avec un nombre plus important d'échantillon lymphocytaire avant de conclure. Par ailleurs, ces expériences ont confirmé l'intérêt de la combinaison retenue pour induire une prolifération en milieu semi-solide.

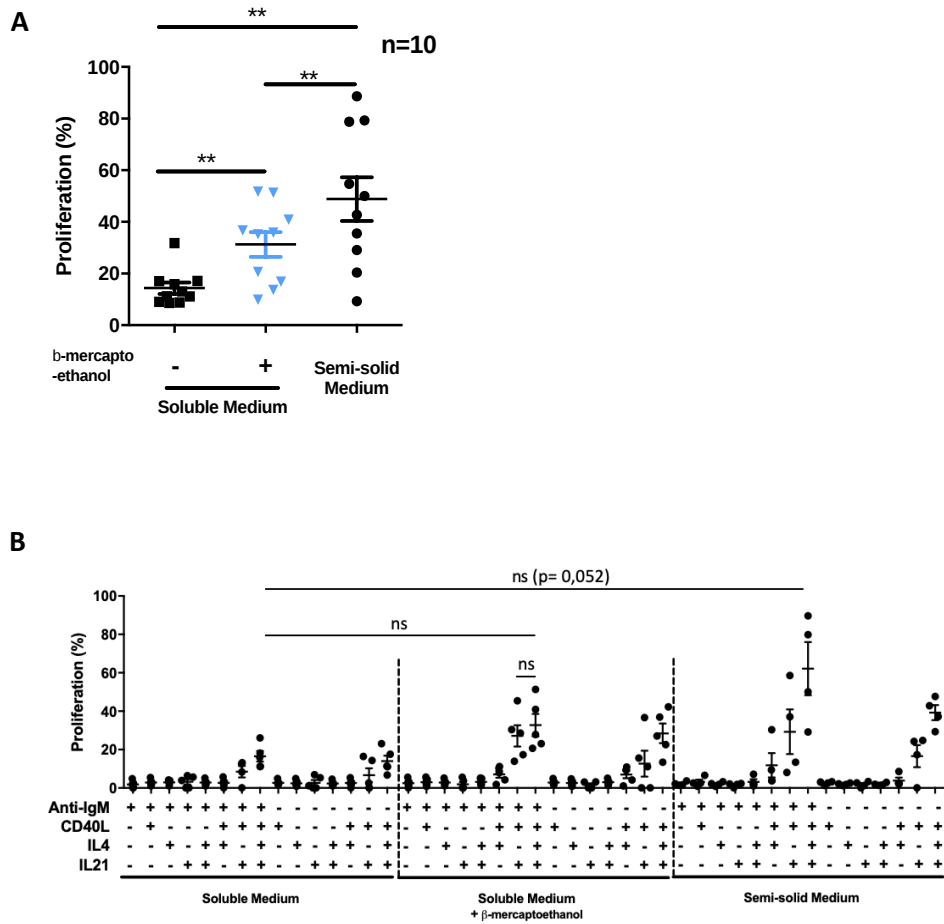


Figure 37 : Pourcentage de prolifération des lymphocytes de LLC après activation du BCR. (A) Après isolement et marquage au CFSE (J0), les lymphocytes (n=10) sont activés par anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21, avec ou sans β-mercapthoéthanol (BME) en milieu soluble ou en milieu semi-solide sans BME. le pourcentage de prolifération des lymphocytes est mesuré à J6 par cytométrie en flux. Les symboles représentent le milieu dans lequel les cellules sont stimulées (carré noir : soluble sans BME ; triangle bleu : soluble avec BME ; carré noir : semi-solide sans BME). (B) Effet de la stimulation du BCR (anti-IgM) et des cytokines (utilisées isolées ou en combinaison) sur la prolifération des lymphocytes de LLC (n=4) en culture en milieu soluble sans BME, ou en milieu soluble avec BME et semi-solide sans BME. Un seuil de 25% de diminution de CFSE avec au moins une génération sont retenus comme critères de prolifération. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

F-Conclusion et perspectives

Nous avons validé les différents profils d'expressions temporels des quatre gènes cibles après activation du BCR dans des prélèvements issus de patients supplémentaires. Une validation du profil d'abondance protéique a également été débutée et devra être poursuivie avec un plus grand nombre d'échantillons.

Nous avons également validé les profils d'expression de ces gènes cibles dans des lymphocytes de la lignée BL2. Une cinétique différente a été observée pour le gène CALR à partir de 6h après stimulation. Ces résultats montrent que la lignée BL2 possède un BCR fonctionnel, mais dont la réponse transcriptionnelle est différente de celle des lymphocytes primaire de LLC.

L'entrée rapide en apoptose des lymphocytes primaires de LLC *ex vivo* limite les possibilités de manipulation de ces cellules. Nous avons retenu une approche par siRNA pour moduler l'expression de gènes cibles.

Un siRNA fluorescent a été utilisé pour mettre en place les conditions expérimentales de transfection. Bien que l'adjonction d'une molécule fluorescente puisse modifier les propriétés d'entrée et de diffusion de ce siRNA à l'intérieur des cellules, cette molécule nous a permis de contrôler l'efficacité de délivrance de plusieurs méthodes de transfection non virales.

L'utilisation d'un microscope à fluorescence a confirmé la délivrance intracytoplasmique de ce siRNA et d'éliminer un aspect faussement positif observé en cytométrie en flux résultant d'une fixation extra-membranaire de liposomes.

Les résultats obtenus nous ont permis de valider l'efficacité de délivrance de méthodes lipidiques et ont montré une hétérogénéité importante de délivrance entre des lymphocytes primaires issus de différents patients. Ces premiers résultats n'ont cependant pas mis en évidence des caractéristiques clinico-biologiques de patients permettant d'expliquer ces variations.

Par ailleurs, les premières expériences de délivrance réalisées par électroporation n'ont pas permis d'objectiver une délivrance dans ces cellules et elles devront être répétées.

Ces analyses ont également été réalisées à l'aide de lymphocytes de la lignée BL2. Les premiers résultats ont montré une faible délivrance de siRNA marqué dans ces cellules. Ces analyses, qui doivent être répétées suggèrent cependant que cette lignée n'est pas plus facilement transfectable que les cellules primaires de patients.

Par ailleurs, nous avons analysé la tolérance de ces différentes méthodes de transfection et nous avons montré que les vecteurs lipidiques permettent de préserver la viabilité des lymphocytes. En revanche, nous avons confirmé la sensibilité des lymphocytes aux lésions membranaires induites par l'électroporation qui entraîne une forte mortalité cellulaire.

Nous avons également mis en évidence une forte mortalité liée à l'utilisation du Viromer avec les lymphocytes primaires.

Compte tenu de la mortalité observée et du faible nombre de cellules persistant après six jours de culture, ces deux dernières méthodes n'ont pas été retenues pour la suite de nos expériences et nous avons conservé la méthode lipidique.

En s'appuyant sur ces résultats de cinétique d'apparition de siRNA fluorescent dans le cytoplasme lymphocytaire, nous avons précisé le timing de notre protocole expérimental qui associe une transfection de siRNA suivie de l'activation du BCR six heures après (Figure 35A).

Nous avons également précisé les conditions d'utilisation des siRNA dans nos expériences. Dans la littérature, les siRNA sont classiquement utilisés à une concentration de 2,5 à 50nM (Allen et al., 2014; Giffin et al., 2014; Iwata et al., 2016; Voelkl et al., 2014). Dans les expériences impliquant des lymphocytes primaires tumoraux, une concentration allant jusqu'à 100nM voire 3uM est utilisée par certaines équipes (Amigo-Jiménez et al., 2015; van Attekum et al., 2017; Billot et al., 2011; Choudhury et al., 2010; Kokhaei et al., 2018; Mittal et al., 2013; Santarlasci et al., 2014; Vallat et al., 2013), au risque de provoquer une toxicité cellulaire ou des effets non spécifiques (off-target). Après avoir testé plusieurs molarités, dont celles rapportées

dans ce mémoire concernant siCALR (30, 60nM), nous avons retenu une concentration de 60nM de façon empirique.

Par ailleurs, nous avons utilisé un seul siRNA dans cette expérience. L'apport d'un mélange de deux à trois siRNA, comme recommandé par certaines équipes (Anderson et al., 2008; Lee et al., 2020; Mackin et al., 2018; Moerkens et al., 2014) devra être évalué.

A l'aide du protocole expérimental retenu, nous avons transfecté des lymphocytes primaires issus de sept patients pour lesquels nous avons contrôlé l'augmentation d'expression attendue de CALR après activation du BCR. Pour six de ces échantillons de lymphocytes, nous avons montré une diminution d'expression du gène CALR mesurée par qPCR de 31% (min 18%, max 68%). Les premières analyses de l'abondance de cette protéine par WB à J2, J3, J4 et jusque J10 n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une diminution protéique associée. Ces mesures devront être répétées à des temps différents après activation du BCR et silencing dans ces cellules. Cependant, lors des expériences préliminaires réalisées à l'aide des cellules de la lignée AGS, une diminution de l'abondance protéique de 76% avait été objectivée 48h après transfection. L'importante diminution d'expression du gène CALR de 90% observée dans ces cellules est sans doute nécessaire pour permettre d'objectiver une diminution de l'abondance protéique.

Par ailleurs, les résultats des analyses conjointes de l'efficacité de délivrance avec un siRNA fluorescent et de l'efficacité de diminution de l'expression du gène CALR dans un même échantillon de lymphocyte de LLC constitue un résultat important. Bien que cette expérience nécessite d'être répétée, ces résultats montrent la corrélation entre le pourcentage de délivrance (pourcentage de cellules fluorescentes) et le pourcentage de diminution d'expression du gène. Dans cet échantillon cellulaire, les résultats suggèrent qu'il pourrait exister un silencing de 100% dans les 30% de lymphocytes transfectés. Ces résultats confirment que l'efficacité de délivrance est un des facteurs limitant majeur dans ces expériences.

De plus, cette étude met en évidence l'hétérogénéité de l'efficacité de délivrance dans les différents échantillons cellulaires issus de patients différents. La détermination de facteurs moléculaires limitant cette efficacité de délivrance dans certains lymphocytes

devrait apporter des éléments cruciaux sur la compréhension de cette difficulté de transfection des lymphocytes primaires.

La recherche de vecteurs de meilleure efficacité constitue également un point majeur de poursuite de cette étude. Stewart et ses collaborateurs (Stewart et al., 2016) ont retenu plusieurs critères de sélections des méthodes de transfection de nouvelle génération afin d'optimiser l'efficacité de transfection de matériel génétique. Ces critères sont : l'utilisation de méthode le moins agressive pour la cellule, le système utilisé doit être compatible à différentes densités cellulaires (allant du million à 100 cellules), méthode universelle utilisable sur tout type cellulaire, méthode indépendant du matériel génétique, méthode permettant de contrôler la concentration minimale nécessaire pour être au maximum de silencing et le prix. Ces méthodes de transfection de nouvelle génération comprennent notamment des nanoparticules construites à façon (en fonction des propriétés de la cellule) afin de favoriser le passage de la membrane plasmique mais également de la membrane des endosomes (car très souvent, le siRNA peut rester bloquer dans les vésicules d'endosome). Cette optimisation de vecteurs pourra être réalisée en collaboration avec une équipe développant des vecteurs à la Faculté de pharmacie de Strasbourg, dans le cadre d'une collaboration au sein du nouvel Institut Interdisciplinaire Inovec (Labex) de l'Université de Strasbourg.

Un autre point majeur de la poursuite de cette étude repose sur la sélection des gènes cibles retenus pour les expériences d'intervention. L'analyse statistique menée lors de l'étude préliminaire a permis de mettre en évidence des gènes et protéines différenciellement exprimés au cours du temps dans les lymphocytes développant une réponse proliférative après activation du BCR (signature temporelle, Figure 23). Certains de ces gènes ou protéines sont spécifiquement exprimés dans les lymphocytes qui prolifèrent après activation du BCR (signature proliférative). La modélisation mathématique de cette réponse transcriptionnelle et protéomique suggère l'existence d'une organisation très structurée de cette réponse temporelle. Cette modélisation a de plus suggéré l'existence d'un réseau d'interaction génique et protéomique liés à la réponse proliférative dans les échantillons lymphocytaires qui prolifèrent (Figure 24). Certains gènes ou protéines présentent des rôles clés dans la structure de ce réseau transcriptionnel aux temps précoces de la réponse à l'activation du BCR.

Ces gènes et protéines clés sont donc des cibles évidentes dans les expériences visant à moduler la réponse proliférative lymphocytaire. Dans ce travail de thèse, nous avons ainsi ciblé le gène CALR qui fait partie des gènes différentiellement exprimés après activation du BCR dans les cellules proliférantes (signature temporelle) et qui appartient à ce réseau prolifératif dans la modélisation. Le gène EGR2 présente les mêmes caractéristiques et il appartient de plus au groupe de 14 facteurs transcriptionnels exprimés précocement dans ce réseau prolifératif.

Dans la suite de cette étude, il sera nécessaire d'utiliser la modélisation mathématique pour préciser la sélection des gènes à silencer. Pour cela, une collaboration avec des mathématiciens de l'IECL / INRIA/ Université de Lorraine vise à développer des outils de modélisation afin de prédire les gènes dont le silencing pourrait permettre de diminuer la prolifération cellulaire après activation du BCR.

En parallèle des expériences de transfection visant à diminuer l'expression de gènes activés après stimulation du BCR dans les lymphocytes de LLC, mon équipe poursuit la caractérisation des anomalies de réponse de ces cellules après activation du BCR.

Des conditions expérimentales permettant de reproduire une activation du BCR proche des conditions *in vivo* sont nécessaires afin de poursuivre cette caractérisation.

Dans ce cadre, j'ai participé au développement de ces conditions de stimulation *ex vivo* en analysant l'effet de l'ajout d'un agent anti-oxydant (BME) dans le modèle de stimulation *ex vivo*. Cet apport induit une augmentation de la réponse proliférative globale des lymphocytes issus de différents patients en milieu liquide. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour préciser l'effet de ce réactif sur la prolifération induite par d'autres cytokines ou agonistes des TLR.

L'augmentation de prolifération mis en évidence après ajout du BME en milieu liquide ne permet cependant pas d'atteindre le niveau de prolifération observé en milieu semi-solide. Des développements de ce milieu semi-solide qui permettrait de mimer une architecture tissulaire présente dans les organes lymphoïdes où s'effectue la prolifération des lymphocytes de LLC sont encore nécessaires. En plus des cytokines mimant l'effet des lymphocytes T, il serait intéressant d'évaluer l'apport d'autres cellules présentes dans le microenvironnement lymphoïde sur la prolifération lymphocytaire tumorale.

Annexe

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

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

Cédric Schleiss^{1,2}, Wassila Ilias^{1,2}, Ouria Tahar^{1,2,3}, Yonca Güler⁴, Laurent Miguët^{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) OMICARE, 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)

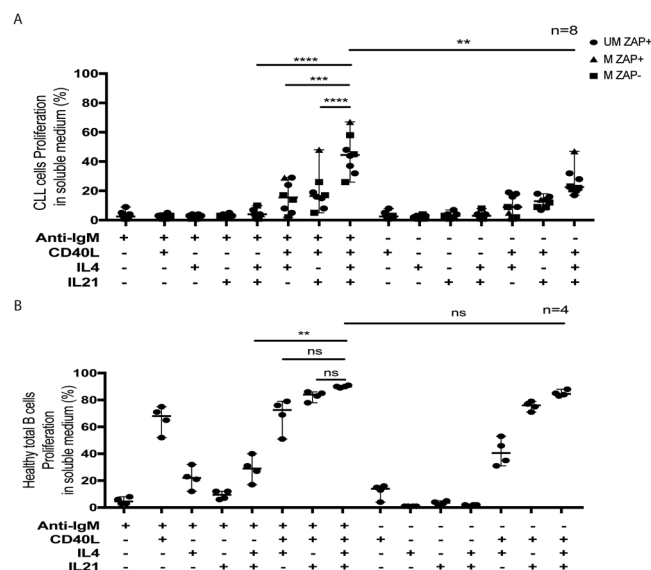


Figure 1. Determination of the optimal culture conditions for CLL and healthy B cells proliferation *ex vivo*. (A) Effect of BCR and cytokines stimulation, isolated or in combination, on the proliferation of B cells harvested from CLL patients and cultured on soluble medium (n = 8; CLL samples #6, 14, 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)^{21,22,30,32–34} 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 cytocentrifugation 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, pI κ B) 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 ($p = 0.03$). I κ B 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-21²², 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 intracolonal 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 rational 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

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.

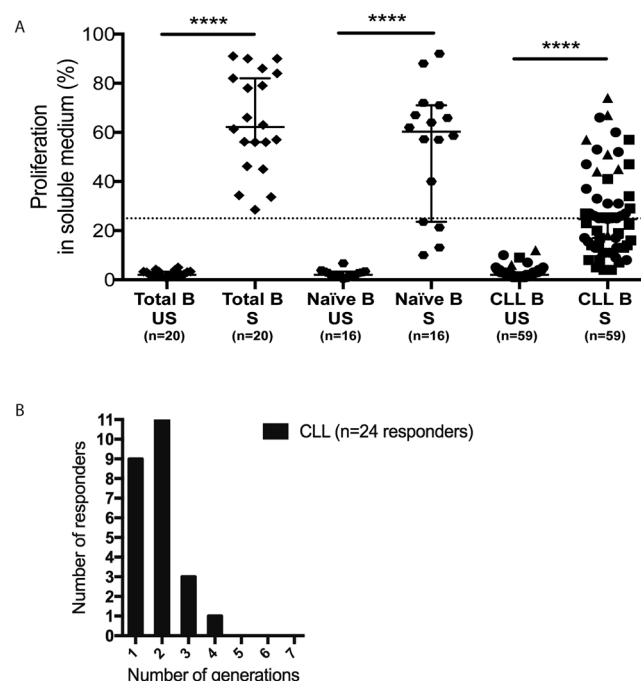


Figure 2. Cell proliferation of CLL and healthy B cells after soluble [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation. (A) CLL cells isolated from a cohort of 59 CLL patients and healthy donors (naïve B cells, $n = 16$ or total B cells, $n = 20$) were stimulated *ex vivo* with anti-IgM, CD40L, IL-4 and 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)

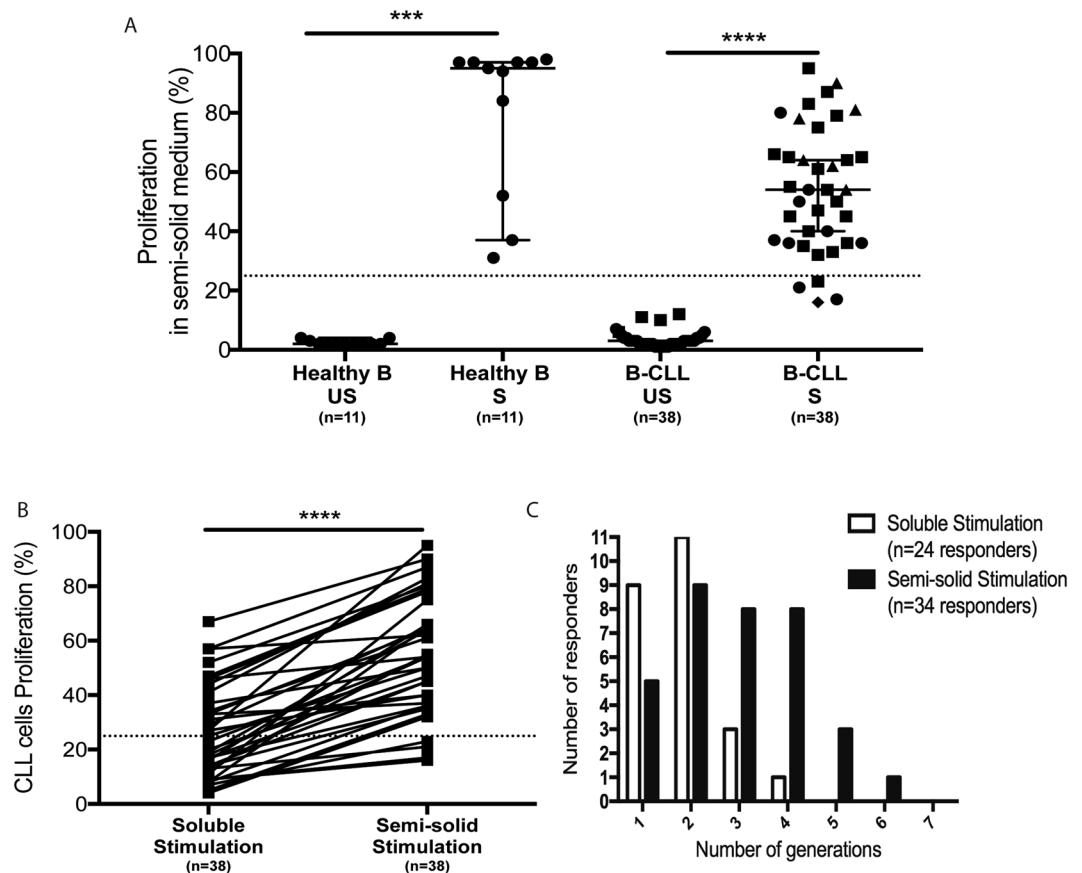


Figure 3. Cell proliferation of CLL and healthy B cells after [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation on a semi-solid medium. (A) CLL cells isolated from a cohort of 38 CLL patients and naïve and total B cells ($n = 11$) isolated from healthy donors have been stimulated *ex vivo* with anti-IgM, 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 (MethoCult™, Stemcell™ 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.

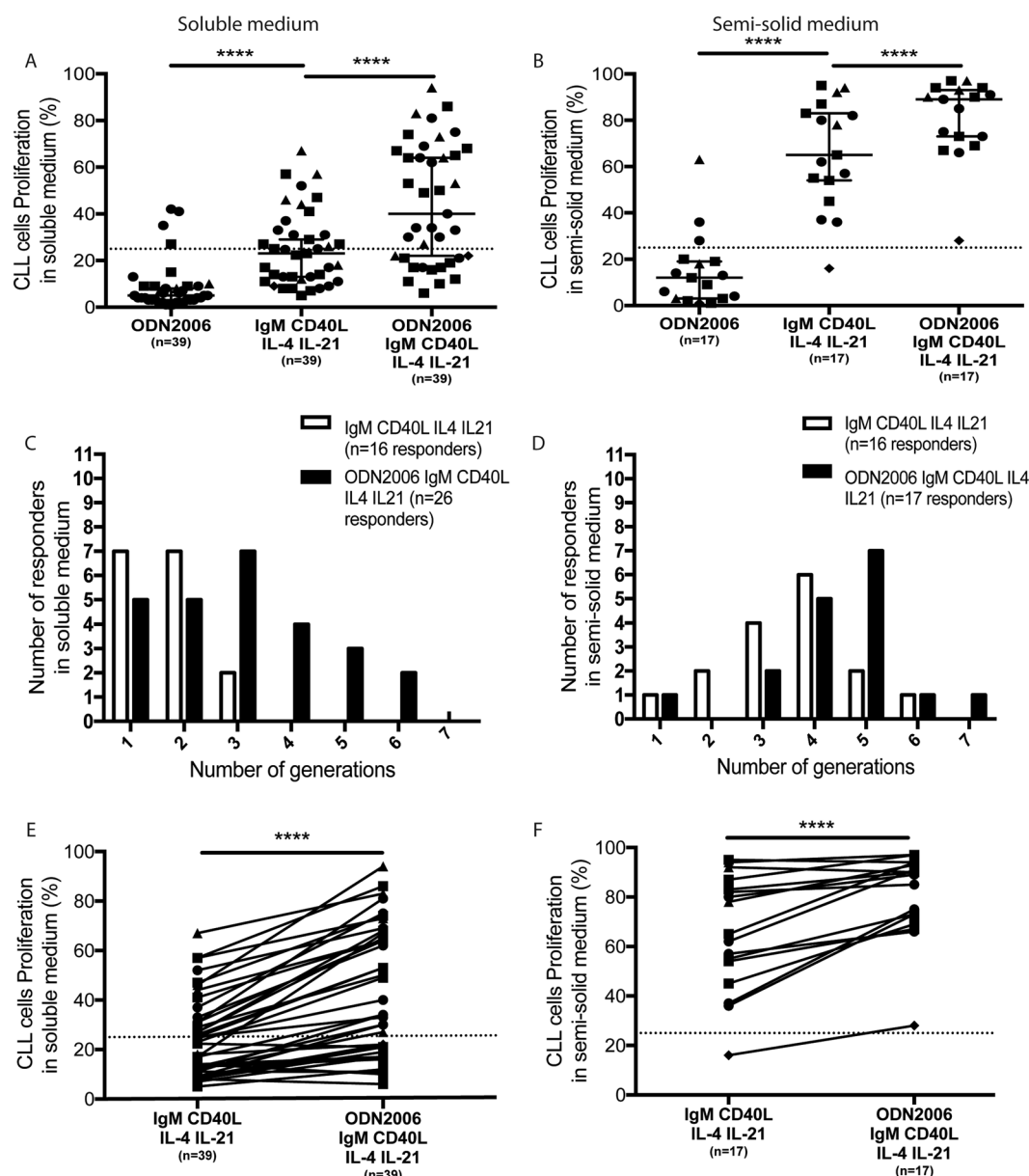


Figure 4. Additive effect of TLR9 activation on CLL cells after [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation. (A) CLL cells ($n = 39$) were stimulated either by CpG-ODN2006, or IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 or the combination of CpG-ODN2006 and anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21. After initial CFSE staining (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 $0.5 \mu\text{M}$ 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 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. 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 (10^6) were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and re-suspended in annexin buffer before the addition of FITC annexin-V

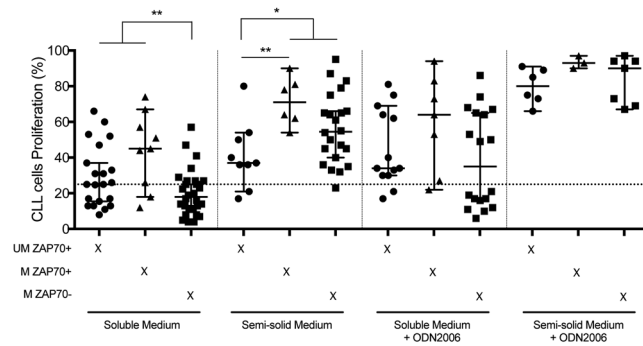


Figure 5. Proliferative response according to the IGHV mutational status and ZAP70 protein expression. Recapitulation of CLL cells proliferation for UM ZAP+ (circle), M ZAP70+ (triangle) and M ZAP70- (square) CLL cells after anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21 stimulation in soluble medium, semi-solid medium,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

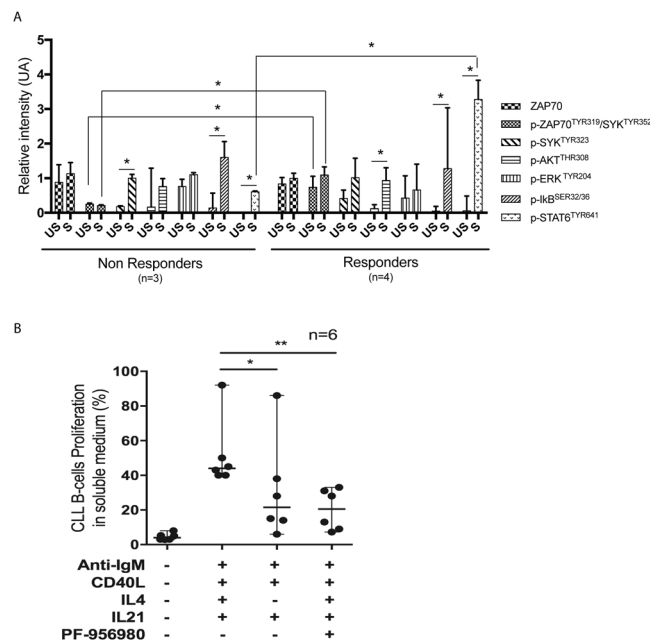


Figure 6. Signaling pathways activated by [anti-IgM + CD40L + IL-4 + IL-21] stimulation of responding and non-responding UM ZAP70+ CLL cells. (A) Normalized protein expression of ZAP70, phospho-ZAP70^{Tyr319}/SYK^{Tyr352} (pZAP70/pSYK), phospho-SYK^{Tyr323} (pSYK), phospho-AKT^{Thr308} (pAKT), phospho-ERK1/2^{Tyr204} (pERK), phospho-IκB^{Ser32/36} (pIκB) and phospho-STAT6^{Tyr641} (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 ZAP70^{Tyr319} (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 LabTM 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 (lmpm R package, <https://github.com/mtorchiano/lmpm>) 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.1211130110> (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 Totto, 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.cytogr.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., Thijssen, 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. Konietschke, F., 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. Damlé, 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

Bibliographie

Abraham, W.C., Dragunow, M., and Tate, W.P. (1991). The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol. Neurobiol.* *5*, 297–314.

Addo, R.K., Heinrich, F., Heinz, G.A., Schulz, D., Sercan-Alp, Ö., Lehmann, K., Tran, C.L., Bardua, M., Matz, M., Löhning, M., et al. (2019). Single-cell transcriptomes of murine bone marrow stromal cells reveal niche-associated heterogeneity. *Eur. J. Immunol.* *49*, 1372–1379.

Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* *9*, 1911.

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.

Ahearne, M.J., Willimott, S., Piñon, L., Kennedy, D.B., Miall, F., Dyer, M.J.S., 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.

Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* *185*, 111–120.

Alaiya, A., Roblick, U., Egevad, L., Carlsson, A., Franzén, B., Volz, D., Huwendiek, S., Linder, S., and Auer, G. (2000). Polypeptide expression in prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Anal. Cell. Pathol. J. Eur. Soc. Anal. Cell. Pathol.* *21*, 1–9.

Alfonso, P., Núñez, A., Madoz-Gurpide, J., Lombardia, L., Sánchez, L., and Casal, J.I. (2005). Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics* 5, 2602–2611.

Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* 5, 943–952.

Allen, R.M., Marquart, T.J., Jesse, J.J., and Baldán, A. (2014). Control of very low-density lipoprotein secretion by N-ethylmaleimide-sensitive factor and miR-33. *Circ. Res.* 115, 10–22.

Amigo-Jiménez, I., Bailón, E., Aguilera-Montilla, N., Terol, M.J., García-Marco, J.A., and García-Pardo, A. (2015). Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3K δ or PKC β signaling pathways. *Oncotarget* 6, 44832–44848.

Anderson, E.M., Birmingham, A., Baskerville, S., Reynolds, A., Maksimova, E., Leake, D., Fedorov, Y., Karpilow, J., and Khvorova, A. (2008). Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA N. Y. N* 14, 853–861.

Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., and Nagasawa, T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5319–5323.

Asgeirsdóttir, S.A., Talman, E.G., de Graaf, I.A., Kamps, J.A.A.M., Satchell, S.C., Mathieson, P.W., Ruiters, M.H.J., and Molema, G. (2010). Targeted transfection increases siRNA uptake and gene silencing of primary endothelial cells in vitro--a quantitative study. *J Control Release* 141, 241–251.

Asslaber, D., Grössinger, 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.

van Attekum, M.H.A., Terpstra, S., Slinger, E., von Lindern, M., Moerland, P.D., Jongejan, A., Kater, A.P., and Eldering, E. (2017). Macrophages confer survival signals via CCR1-dependent translational MCL-1 induction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* *36*, 3651–3660.

Babcock, G.J., Farzan, M., and Sodroski, J. (2003). Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *J. Biol. Chem.* *278*, 3378–3385.

Bachelder, R.E., Wendt, M.A., and Mercurio, A.M. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res.* *62*, 7203–7206.

Bálint, Š., Müller, S., Fischer, R., Kessler, B.M., Harkiolaki, M., Valitutti, S., and Dustin, M.L. (2020). Supramolecular attack particles are autonomous killing entities released from cytotoxic T cells. *Science* *368*, 897–901.

Banchereau, J., and Rousset, F. (1991). Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature* *353*, 678–679.

Barretina, J., Juncà, J., Llano, A., Gutiérrez, A., Flores, A., Blanco, J., Clotet, B., and Esté, J.A. (2003). CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease. *Ann. Hematol.* *82*, 500–505.

Bartlett, D.W. (2006). Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.* *34*, 322–333.

Basmaciogullari, S., Pacheco, B., Bour, S., and Sodroski, J. (2006). Specific interaction of CXCR4 with CD4 and CD8alpha: functional analysis of the CD4/CXCR4 interaction in the context of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Virology* *353*, 52–67.

Bellone, E., Di Maria, E., Soriani, S., Varese, A., Doria, L.L., Ajmar, F., and Mandich, P. (1999). A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Hum. Mutat.* *14*, 353–354.

Berger, E.A., Murphy, P.M., and Farber, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 657–700.

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.

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.

Bertrand, F., Aouadi, I., Jung, N., Carapito, R., Vallat, L., Bahram, S., and Maumy-Bertrand, M. (2020). selectBoost: a general algorithm to enhance the performance of variable selection methods. *Bioinformatics*.

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.

Billot, K., Soeur, J., Chereau, F., Arrouss, I., Merle-Béral, H., Huang, M.-E., Mazier, D., Baud, V., and Rebollo, A. (2011). Deregulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic modifications. *Blood* *117*, 1917–1927.

Binder, M., Léchenne, B., Ummanni, R., Scharf, C., Balabanov, S., Trusch, M., Schlüter, H., Braren, I., Spillner, E., and Trepel, M. (2010). Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells. *PloS One* *5*, e15992.

Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, 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.

Bini, L., Magi, B., Marzocchi, B., Arcuri, F., Tripodi, S., Cintorino, M., Sanchez, J.C., Frutiger, S., Hughes, G., Pallini, V., et al. (1997). Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis* *18*, 2832–2841.

Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* *382*, 829–833.

Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., and Mackay, C.R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1925–1930.

Boettcher, M., and McManus, M.T. (2015). Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol. Cell* *58*, 575–585.

Bolhassani, A., and Rafati, S. (2011). Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy and Vaccine Development. In *Non-Viral Gene Therapy*, X. Yuan, ed. (InTech), p.

Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Kohli, L., Hangoc, G., Lee, Y., Mantel, C., Clapp, D.W., and Kim, C.H. (2003). Transgenic expression of stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12 enhances myeloid progenitor cell survival/antiapoptosis in vitro in response to growth factor withdrawal and enhances myelopoiesis in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *170*, 421–429.

Buchser, W.J., Pardinas, J.R., Shi, Y., Bixby, J.L., and Lemmon, V.P. (2006). 96-well electroporation method for transfection of mammalian central neurons. *BioTechniques* *41*, 619–624.

Buerli, T., Pellegrino, C., Baer, K., Lardi-Studler, B., Chudotvorova, I., Fritschy, J.-M., Medina, I., and Fuhrer, C. (2007). Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection. *Nat Protoc* *2*, 3090–3101.

Bürgler, S., Gimeno, A., Parente-Ribes, A., Wang, D., Os, A., Devereux, S., Jebsen, P., Bogen, B., Tjønnfjord, G.E., and Munthe, L.A. (2015). Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Express CD38 in Response to Th1 Cell-Derived IFN- γ by a T-bet-Dependent Mechanism. *J.I.* *194*, 827–835.

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.

- Burger, J.A., Quiroga, M.P., Hartmann, E., Bürkle, A., Wierda, W.G., Keating, M.J., and Rosenwald, A. (2009). High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* *113*, 3050–3058.
- Burns, K., Duggan, B., Atkinson, E.A., Famulski, K.S., Nemer, M., Bleackley, R.C., and Michalak, M. (1994). Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* *367*, 476–480.
- 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. *Br. J. Haematol.* *123*, 380–388.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2999–3004.
- Cardarelli, F., Digiaco, L., Marchini, C., Amici, A., Salomone, F., Fiume, G., Rossetta, A., Gratton, E., Pozzi, D., and Caracciolo, G. (2016). The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci. Rep.* *6*, 25879.
- Cardona Gloria, Y., Latz, E., and De Nardo, D. (2018). Generation of Innate Immune Reporter Cells Using Retroviral Transduction. *Methods Mol. Biol.* *1714*, 97–117.
- de Carvalho, T.G., Pellenz, F.M., Laureano, A., da Rocha Silla, L.M., Giugliani, R., Baldo, G., and Matte, U. (2018). A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Lett.* *40*, 617–622.
- Chalasani, S.H., Sabelko, K.A., Sunshine, M.J., Littman, D.R., and Raper, J.A. (2003). A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 1360–1371.

Chanudet, E., Huang, Y., Ichimura, K., Dong, G., Hamoudi, R.A., Radford, J., Wotherspoon, A.C., Isaacson, P.G., Ferry, J., and Du, M.-Q. (2010). A20 is targeted by promoter methylation, deletion and inactivating mutation in MALT lymphoma. *Leukemia* *24*, 483–487.

Chaouchi, N., Wallon, C., Goujard, C., Tertian, G., Rudent, A., Caput, D., Ferrera, P., Minty, A., Vazquez, A., and Delfraissy, J. (1996). Interleukin-13 inhibits interleukin-2-induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from in vitro apoptosis. *Blood* *87*, 1022–1029.

Chen, C.-N., Chang, C.-C., Su, T.-E., Hsu, W.-M., Jeng, Y.-M., Ho, M.-C., Hsieh, F.-J., Lee, P.-H., Kuo, M.-L., Lee, H., et al. (2009). Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* *16*, 524–533.

Chen, H., Hu, L., Luo, Z., Zhang, J., Zhang, C., Qiu, B., Dong, L., Tan, Y., Ding, J., Tang, S., et al. (2015). A20 suppresses hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis through inhibition of Twist1 expression. *Mol. Cancer* *14*, 186.

Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2002). Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *100*, 4609–4614.

Chen, M., Fan, L., Zhang, S.-M., Li, Y., Chen, P., Peng, X., Liu, D.-B., Ma, C., Zhang, W.-J., Zou, Z.-W., et al. (2019). LINC01939 inhibits the metastasis of gastric cancer by acting as a molecular sponge of miR-17-5p to regulate EGR2 expression. *Cell Death Dis.* *10*, 70.

Chiang, W.-F., Hwang, T.-Z., Hour, T.-C., Wang, L.-H., Chiu, C.-C., Chen, H.-R., Wu, Y.-J., Wang, C.-C., Wang, L.-F., Chien, C.-Y., et al. (2013). Calreticulin, an endoplasmic reticulum-resident protein, is highly expressed and essential for cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* *49*, 534–541.

Chiaretti, S., Marinelli, M., Del Giudice, I., Bonina, S., Piciocchi, A., Messina, M., Vignetti, M., Rossi, D., Di Maio, V., Mauro, F.R., et al. (2014). *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* and *TP53* mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia undergoing first-line treatment: correlation with biological parameters and response to treatment. *Leuk. Lymphoma* *55*, 2785–2792.

- Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2011). Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* *117*, 1781–1791.
- Choudhury, A., Derkow, K., Daneshmanesh, A.H., Mikaelsson, E., Kiaii, S., Kokhaei, P., Österborg, A., and Mellstedt, H. (2010). Silencing of ROR1 and FMOD with siRNA results in apoptosis of CLL cells: siRNA-Mediated Silencing of ROR1 and FMOD. *Br. J. Haematol.* *151*, 327–335.
- Chu, Y.W., Wang, R., Schmid, I., and Sakamoto, K.M. (1999). Analysis with flow cytometry of green fluorescent protein expression in leukemic cells. *Cytometry* *36*, 333–339.
- Chung, K.W., Sunwoo, I.N., Kim, S.M., Park, K.D., Kim, W.-K., Kim, T.S., Koo, H., Cho, M., Lee, J., and Choi, B.O. (2005). Two missense mutations of EGR2 R359W and GJB1 V136A in a Charcot-Marie-Tooth disease family. *Neurogenetics* *6*, 159–163.
- 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.
- Coombs, C.C., Rassenti, L.Z., Falchi, L., Slager, S.L., Strom, S.S., Ferrajoli, A., Weinberg, J.B., Kipps, T.J., and Lanasa, M.C. (2012). Single nucleotide polymorphisms and inherited risk of chronic lymphocytic leukemia among African Americans. *Blood* *120*, 1687–1690.
- Coornaert, B., Baens, M., Heyninck, K., Bekaert, T., Haegman, M., Staal, J., Sun, L., Chen, Z.J., Marynen, P., and Beyaert, R. (2008). T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat. Immunol.* *9*, 263–271.
- 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.
- Crane, I.J., Wallace, C.A., McKillop-Smith, S., and Forrester, J.V. (2000). CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from the blood-retina barrier leads

to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 alpha. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 4372–4378.

Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., and Diedrich, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* *172*, 21–28.

Cristillo, A.D., Highbarger, H.C., Dewar, R.L., Dimitrov, D.S., Golding, H., and Bierer, B.E. (2002). Up-regulation of HIV coreceptor CXCR4 expression in human T lymphocytes is mediated in part by a cAMP-responsive element. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 354–364.

Curley, C.T., Mead, B.P., Negron, K., Kim, N., Garrison, W.J., Miller, G.W., Kingsmore, K.M., Thim, E.A., Song, J., Munson, J.M., et al. (2020). Augmentation of brain tumor interstitial flow via focused ultrasound promotes brain-penetrating nanoparticle dispersion and transfection. *Sci. Adv.* *6*, eaay1344.

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.

Davidson, B.L., and McCray, P.B. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 329–340.

De Cecco, L., Capaia, M., Zupo, S., Cutrona, G., Matis, S., Brizzolara, A., Orengo, A.M., Croce, M., Marchesi, E., Ferrarini, M., et al. (2015). Interleukin 21 Controls mRNA and MicroRNA Expression in CD40-Activated Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *PloS One* *10*, e0134706.

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.

Dedhar, S., Rennie, P.S., Shago, M., Hagesteijn, C.Y., Yang, H., Filmus, J., Hawley, R.G., Bruchovsky, N., Cheng, H., and Matusik, R.J. (1994). Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature* *367*, 480–483.

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 Res.* *66*, 7158–7166.

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.

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.

Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1910–1916.

Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* *346*, 1258096.

Doudna, J.A., and Sontheimer, E.J. (2014). Methods in Enzymology. The use of CRISPR/Cas9, ZFNs, and TALENs in generating site-specific genome alterations. Preface. *Methods Enzymol.* *546*, xix–xx.

Douglas, R.S., Capocasale, R.J., Lamb, R.J., Nowell, P.C., and Moore, J.S. (1997). Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta. *Blood* *89*, 941–947.

Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., and Dick, J.E. (2012). Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* *10*, 120–136.

Du, N., Kwon, H., Li, P., West, E.E., Oh, J., Liao, W., Yu, Z., Ren, M., and Leonard, W.J. (2014). EGR2 is critical for peripheral naïve T-cell differentiation and the T-cell response to influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 16484–16489.

Du, X.-L., Hu, H., Lin, D.-C., Xia, S.-H., Shen, X.-M., Zhang, Y., Luo, M.-L., Feng, Y.-B., Cai, Y., Xu, X., et al. (2007). Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *85*, 863–875.

Dwinell, M.B., Eckmann, L., Leopard, J.D., Varki, N.M., and Kagnoff, M.F. (1999). Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* *117*, 359–367.

Eguchi, A., Meade, B.R., Chang, Y.-C., Fredrickson, C.T., Willert, K., Puri, N., and Dowdy, S.F. (2009). Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat. Biotechnol.* *27*, 567–571.

Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M., Buske, C., and ESMO Guidelines Committee (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *26 Suppl 5*, v78-84.

El-Khoury, V., Pierson, S., Szwarcbart, E., Brons, N.H.C., Roland, O., Cherrier-De Wilde, S., Plawny, L., Van Dyck, E., and Berchem, G. (2014). Disruption of autophagy by the histone deacetylase inhibitor MGCD0103 and its therapeutic implication in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *28*, 1636–1646.

Endo, T., Nishio, M.,ENZLER, T., Cottam, H.B., Fukuda, T., James, D.F., Karin, M., and Kipps, T.J. (2007). BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood* *109*, 703–710.

Ensenauer, R., Hartl, D., Vockley, J., Roscher, A.A., and Fuchs, U. (2011). Efficient and gentle siRNA delivery by magnetofection. *Biotech Histochem* *86*, 226–231.

Etrych, T., Janoušková, O., and Chytil, P. (2019). Fluorescence Imaging as a Tool in Preclinical Evaluation of Polymer-Based Nano-DDS Systems Intended for Cancer Treatment. *Pharmaceutics* *11*.

Fabbri, G., and Dalla-Favera, R. (2016). The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 145–162.

Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S.L., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K., Rassenti, L.Z., et al. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest.* *102*, 1515–1525.

Fechheimer, M., Boylan, J.F., Parker, S., Siskin, J.E., Patel, G.L., and Zimmer, S.G. (1987). Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 8463–8467.

Feil, C., and Augustin, H.G. (1998). Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *247*, 38–45.

Feng, D., Ye, X., Zhu, Z., Wei, Z., Cai, Q., and Wang, Y. (2015). Comparative transcriptome analysis between metastatic and non-metastatic gastric cancer reveals potential biomarkers. *Mol. Med. Rep.* *11*, 386–392.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806–811.

Fong, A.M., Premont, R.T., Richardson, R.M., Yu, Y.-R.A., Lefkowitz, R.J., and Patel, D.D. (2002). Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7478–7483.

Frecha, C., Costa, C., Lévy, C., Nègre, D., Russell, S.J., Maisner, A., Salles, G., Peng, K.-W., Cosset, F.-L., and Verhoeven, E. (2009). Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood* *114*, 3173–3180.

Frenster, J.D., Inocencio, J., and Placantonakis, D.G. (2018). Lentiviral Transduction of Primary Human Glioblastoma Cultures. *Methods Mol. Biol.* *1741*, 81–89.

Frenzel, L.P., Claus, R., Plume, N., Schwamb, J., Konermann, C., Pallasch, C.P., Claasen, J., Brinker, R., Wollnik, B., Plass, C., et al. (2011). Sustained NF-kappaB activity in chronic lymphocytic leukemia is independent of genetic and epigenetic alterations in the TNFAIP3 (A20) locus. *Int. J. Cancer* *128*, 2495–2500.

Fülbier, A., Schnabel, R., Michael, S., Vogt, P.M., Strauß, S., Reimers, K., and Radtke, C. (2014). Successful nucleofection of rat adipose-derived stroma cells with *Ambystoma mexicanum* epidermal lipoxygenase (AmbLOXe). *Stem Cell Res Ther* *5*, 113.

Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.-A., Michalak, M., and Henson, P.M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* *123*, 321–334.

Gardlík, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turna, J., and Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *11*, RA110-121.

Giffin, L., Yan, F., Ben Major, M., and Damania, B. (2014). Modulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interleukin-6 function by hypoxia-upregulated protein 1. *J. Virol.* *88*, 9429–9441.

- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 5236–5247.
- Gresch, O., and Altrogge, L. (2012). Transfection of difficult-to-transfect primary mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* *801*, 65–74.
- Gregory, K.J., Morin, S.M., and Schneider, S.S. (2017). Regulation of early growth response 2 expression by secreted frizzled related protein 1. *BMC Cancer* *17*, 473.
- Grünewald, T.G.P., Bernard, V., Gilardi-Hebenstreit, P., Raynal, V., Surdez, D., Aynaud, M.-M., Mirabeau, O., Cidre-Aranaz, F., Tirode, F., Zaidi, S., et al. (2015). Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite. *Nat. Genet.* *47*, 1073–1078.
- Guarini, A., Chiaretti, S., Tavolaro, S., Maggio, R., Peragine, N., Citarella, F., Ricciardi, M.R., Santangelo, S., Marinelli, M., De Propriis, 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.
- Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* *13*, 85–94.
- Gupta, S.K., Lysko, P.G., Pillarisetti, K., Ohlstein, E., and Stadel, J.M. (1998). Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* *273*, 4282–4287.
- 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.
- ten Hacken, E., Gounari, M., Back, J.W., Shimanovskaya, E., Scarfò, L., Kim, E., Burks, J., Ponzoni, M., Ramirez, G.A., Wierda, W.G., et al. (2017). Calreticulin as a novel B-cell receptor antigen in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* *102*, e394–e396.

Haber, T., Baruch, L., and Machluf, M. (2017). Ultrasound-Mediated Mesenchymal Stem Cells Transfection as a Targeted Cancer Therapy Platform. *Sci Rep* 7, 42046.

Hadadi, E., Zhang, B., Baidžajevs, K., Yusof, N., Puan, K.J., Ong, S.M., Yeap, W.H., Rotzschke, O., Kiss-Toth, E., Wilson, H., et al. (2016). Differential IL-1 β secretion by monocyte subsets is regulated by Hsp27 through modulating mRNA stability. *Sci Rep* 6, 39035.

Hagemann, C., Amend, D., Kessler, A.F., Linsenmann, T., Ernestus, R.-I., and Löhr, M. (2017). High-Efficiency Transfection of Glioblastoma Cells and a Simple Spheroid Migration Assay. *Methods Mol. Biol.* 1622, 63–79.

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., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R., et al. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111, 5446–5456.

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.B., 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. *Br. J. Haematol.* 158, 589–599.

Hanna, J., Wald, O., Goldman-Wohl, D., Prus, D., Markel, G., Gazit, R., Katz, G., Haimov-Kochman, R., Fujii, N., Yagel, S., et al. (2003). CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* *102*, 1569–1577.

Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* *418*, 244–251.

Haselager, M.V., Kater, A.P., and Eldering, E. (2020). Proliferative Signals in Chronic Lymphocytic Leukemia; What Are We Missing? *Front. Oncol.* *10*, 592205.

Hazzan, T., Guhl, S., Artuc, M., Franke, K., Worm, M., Zuberbier, T., and Babina, M. (2017). An efficient method for gene knock-down by RNA interference in human skin mast cells. *Exp. Dermatol.* *26*, 1136–1139.

Herglotz, J., Unrau, L., Hauschildt, F., Fischer, M., Kriebitzsch, N., Alawi, M., Indenbirken, D., Spohn, M., Müller, U., Ziegler, M., et al. (2016). Essential control of early B-cell development by Mef2 transcription factors. *Blood* *127*, 572–581.

Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., et al. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *117*, 563–574.

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.

Hervé, 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. *J. Clin. Invest.* *115*, 1636–1643.

Hsu, W.M., Hsieh, F.J., Jeng, Y.M., Kuo, M.L., Chen, C.N., Lai, D.M., Hsieh, L.J., Wang, B.T., Tsao, P.N., Lee, H., et al. (2005). Calreticulin expression in neuroblastoma--a novel independent prognostic factor. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *16*, 314–321.

Huang, Y.-H., Bao, Y., Peng, W., Goldberg, M., Love, K., Bumcrot, D.A., Cole, G., Langer, R., Anderson, D.G., and Sawicki, J.A. (2009). Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 3426–3430.

Hunt, M.A., Currie, M.J., Robinson, B.A., and Dachs, G.U. (2010). Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents. *J Biomol Tech* *21*, 66–72.

Hyder, I., Eghbalsaied, S., and Kues, W.A. (2020). Systematic optimization of square-wave electroporation conditions for bovine primary fibroblasts. *BMC Mol Cell Biol* *21*, 9.

Hyeon, J., Lee, B., Shin, S.-H., Yoo, H.Y., Kim, S.J., Kim, W.S., Park, W.-Y., and Ko, Y.-H. (2018). Targeted deep sequencing of gastric marginal zone lymphoma identified alterations of TRAF3 and TNFAIP3 that were mutually exclusive for MALT1 rearrangement. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *31*, 1418–1428.

Ireland, B.S., Niggemann, M., and Williams, D.B. (2006). In vitro assays of the functions of calnexin and calreticulin, lectin chaperones of the endoplasmic reticulum. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *347*, 331–342.

Iwasa, S., Yanagawa, T., Fan, J., and Katoh, R. (2009). Expression of CXCR4 and its ligand SDF-1 in intestinal-type gastric cancer is associated with lymph node and liver metastasis. *Anticancer Res.* *29*, 4751–4758.

Iwata, H., Goettsch, C., Sharma, A., Ricchiuto, P., Goh, W.W.B., Halu, A., Yamada, I., Yoshida, H., Hara, T., Wei, M., et al. (2016). PARP9 and PARP14 cross-regulate macrophage activation via STAT1 ADP-ribosylation. *Nat. Commun.* *7*, 12849.

Jahrsdörfer, B., Jox, R., Mühlenhoff, L., Tschoep, K., Krug, A., Rothenfusser, S., Meinhardt, G., Emmerich, B., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J. Leukoc. Biol.* *72*, 83–92.

Jang, S.-W., and Svaren, J. (2009). Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. *J. Biol. Chem.* *284*, 20111–20120.

- Janusz, M., and Lisowski, J. (1993). Proline-rich polypeptide (PRP)--an immunomodulatory peptide from ovine colostrum. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *41*, 275–279.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 1738–1742.
- Jiang, F., and Doudna, J.A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* *46*, 505–529.
- Jin, W., Lin, D., Nguyen, A.H., Abdelrasoul, G.N., Chen, J., Mar, A., Qian, F., Fang, Q., Kovalchuk, I., Wang, Y., et al. (2018). Transfection of Difficult-to-Transfect Rat Primary Cortical Neurons with Magnetic Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* *14*, 1654–1664.
- Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 49–55.
- Jourdan, P., Vendrell, J.P., Huguet, M.F., Segondy, M., Bousquet, J., Pène, J., and Yssel, H. (2000). Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 716–724.
- 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. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *30*, 571–573.
- Juremalm, M., Hjertson, M., Olsson, N., Harvima, I., Nilsson, K., and Nilsson, G. (2000). The chemokine receptor CXCR4 is expressed within the mast cell lineage and its ligand stromal cell-derived factor-1alpha acts as a mast cell chemotaxin. *Eur. J. Immunol.* *30*, 3614–3622.
- Kageyama, S., Isono, T., Matsuda, S., Ushio, Y., Satomura, S., Terai, A., Arai, Y., Kawakita, M., Okada, Y., and Yoshiki, T. (2009). Urinary calreticulin in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* *16*, 481–486.

Kalil, N., and Cheson, B.D. (1999). Chronic lymphocytic leukemia. *The Oncologist* 4, 352–369.

Kao, S.-C., Wu, H., Xie, J., Chang, C.-P., Ranish, J.A., Graef, I.A., and Crabtree, G.R. (2009). Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science* 323, 651–654.

Kashyap, M.K., Amaya-Chanaga, C.I., Kumar, D., Simmons, B., Huser, N., Gu, Y., Hallin, M., Lindquist, K., Yafawi, R., Choi, M.Y., et al. (2017). Targeting the CXCR4 pathway using a novel anti-CXCR4 IgG1 antibody (PF-06747143) in chronic lymphocytic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 10, 112.

Kater, A.P., Evers, L.M., Remmerswaal, E.B.M., Jaspers, A., Oosterwijk, M.F., van Lier, R.A.W., van Oers, M.H.J., 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.

Kay, N.E., Han, L., Bone, N., and Williams, G. (2001). Interleukin 4 content in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) B cells and blood CD8+ T cells from B-CLL patients: impact on clonal B-cell apoptosis. *Br. J. Haematol.* 112, 760–767.

Keim, C., Grinstein, V., and Basu, U. (2011). Recombinant retroviral production and infection of B cells. *J Vis Exp*.

Kew, V., Wills, M., and Reeves, M. (2017). HCMV activation of ERK-MAPK drives a multifactorial response promoting the survival of infected myeloid progenitors. *J Mol Biochem* 6, 13–25.

Kijima, T., Maulik, G., Ma, P.C., Tibaldi, E.V., Turner, R.E., Rollins, B., Sattler, M., Johnson, B.E., and Salgia, R. (2002). Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 62, 6304–6311.

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.

Kim, D.H., and Rossi, J.J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 173–184.

Kim, S.Y., Lee, C.H., Midura, B.V., Yeung, C., Mendoza, A., Hong, S.H., Ren, L., Wong, D., Korz, W., Merzouk, A., et al. (2008). Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clin. Exp. Metastasis* *25*, 201–211.

Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., Wierda, W.G., O'Brien, S., Gribben, J., and Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Primer* *3*, 16096.

Kirton, H.M., Pettinger, L., and Gamper, N. (2013). Transient overexpression of genes in neurons using nucleofection. *Methods Mol. Biol.* *998*, 55–64.

Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A.S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., et al. (2013). Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* *369*, 2379–2390.

Klose, M., Salloum, J.E., Gonschior, H., and Linder, S. (2019). SNX3 drives maturation of *Borrelia* phagosomes by forming a hub for PI(3)P, Rab5a, and galectin-9. *Journal of Cell Biology* *218*, 3039–3059.

Kokhaei, P., Hojjat-Farsangi, M., Mozaffari, F., Moshfegh, A., Pak, F., Rashidy-Pour, A., Palma, M., Hansson, L., Österborg, A., and Mellstedt, H. (2018). Autologous T cells expressing the oncogenic transcription factor KLF6-SV1 prevent apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *PLOS ONE* *13*, e0192839.

Krause, K.-H., and Michalak, M. (1997). Calreticulin. *Cell* *88*, 439–443.

Krupnick, J.G., and Benovic, J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *38*, 289–319.

- Krzysztoń, R., Woschée, D., Reiser, A., Schwake, G., Strey, H.H., and Rädler, J.O. (2019). Single-cell kinetics of siRNA-mediated mRNA degradation. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *21*, 102077.
- Kulkarni, M., Ozgur, S., and Stoecklin, G. (2010). On track with P-bodies. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 242–251.
- Kumar, P., Nagarajan, A., and Uchil, P.D. (2019). Electroporation. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2019*.
- 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.
- Landin, A.M., Kim, J.W., and Chaudhari, N. (2005). Liposome-mediated transfection of mature taste cells. *J. Neurobiol.* *65*, 12–21.
- 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., Söderberg, A., Baxendale, H., Dahle, C., Willander, K., Tobin, G., Bäckman, E., Söderberg, O., et al. (2008). A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* *111*, 3838–3848.
- Larsen, H.Ø., Roug, A.S., Nielsen, K., Søndergaard, C.S., and Hokland, P. (2011). Nonviral transfection of leukemic primary cells and cells lines by siRNA-a direct comparison between Nucleofection and Accell delivery. *Exp. Hematol.* *39*, 1081–1089.

Lauritsen, J.-P.H., Kurella, S., Lee, S.-Y., Lefebvre, J.M., Rhodes, M., Alberola-Ila, J., and Wiest, D.L. (2008). Egr2 is required for Bcl-2 induction during positive selection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 7778–7785.

Lee, J., Jung, E., Gestoso, K., and Heur, M. (2020). ZEB1 Mediates Fibrosis in Corneal Endothelial Mesenchymal Transition Through SP1 and SP3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *61*, 41.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.

Leus, N.G.J., Talman, E.G., Ramana, P., Kowalski, P.S., Woudenberg-Vrenken, T.E., Ruiters, M.H.J., Molema, G., and Kamps, J.A.A.M. (2014). Effective siRNA delivery to inflamed primary vascular endothelial cells by anti-E-selectin and anti-VCAM-1 PEGylated SAINT-based lipoplexes. *Int J Pharm* *459*, 40–50.

Li, J., Jiang, K., Qiu, X., Li, M., Hao, Q., Wei, L., Zhang, W., Chen, B., and Xin, X. (2014). Overexpression of CXCR4 is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer. *BMB Rep.* *47*, 33–38.

Li, L., Muñoz-Culla, M., Carmona, U., Lopez, M.P., Yang, F., Trigueros, C., Otaegui, D., Zhang, L., and Knez, M. (2016). Ferritin-mediated siRNA delivery and gene silencing in human tumor and primary cells. *Biomaterials* *98*, 143–151.

Liu, F.-T., Jia, L., Wang, P., Wang, H., Farren, T.W., and Agrawal, S.G. (2016). STAT3 and NF-κB cooperatively control in vitro spontaneous apoptosis and poor chemoresponsiveness in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* *7*, 32031–32045.

Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 719–723.

Longo, P.G., Laurenti, L., Gobessi, S., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2008). The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals

downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* *111*, 846–855.

Lu, Y.-C., Weng, W.-C., and Lee, H. (2015). Functional roles of calreticulin in cancer biology. *BioMed Res. Int.* *2015*, 526524.

Lwin, Z.-M., Guo, C., Salim, A., Yip, G.W.-C., Chew, F.-T., Nan, J., Thike, A.A., Tan, P.-H., and Bay, B.-H. (2010). Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *23*, 1559–1566.

Mackin, S.-J., O'Neill, K.M., and Walsh, C.P. (2018). Comparison of DNMT1 inhibitors by methylome profiling identifies unique signature of 5-aza-2'deoxyctidine. *Epigenomics* *10*, 1085–1101.

Makki, M.S., Akhtar, N., and Haqqi, T.M. (2017). An effective and efficient method of transfecting primary human chondrocytes in suspension. *Anal. Biochem.* *526*, 29–32.

Mansouri, L., Wierzbinska, J.A., Plass, C., and Rosenquist, R. (2018). Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biological impact. *Semin. Cancer Biol.* *51*, 1–11.

Marintcheva, B. (2018). Viral Tools for Genome Manipulations In Vivo. In *Harnessing the Power of Viruses*, (Elsevier), pp. 69–102.

Maresch, R., Mueller, S., Veltkamp, C., Öllinger, R., Friedrich, M., Heid, I., Steiger, K., Weber, J., Engleitner, T., Barenboim, M., et al. (2016). Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. *Nat Commun* *7*, 10770.

Marine, S., Freeman, J., Riccio, A., Axenborg, M.-L., Pihl, J., Ketteler, R., and Aspengren, S. (2012). High-throughput transfection of differentiated primary neurons from rat forebrain. *J Biomol Screen* *17*, 692–696.

Matsushima-Nishiu, M., Unoki, M., Ono, K., Tsunoda, T., Minaguchi, T., Kuramoto, H., Nishida, M., Satoh, T., Tanaka, T., and Nakamura, Y. (2001). Growth and gene expression profile analyses of endometrial cancer cells expressing exogenous PTEN. *Cancer Res.* *61*, 3741–3749.

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.

McConkey, D.J., Aguilar-Santelises, M., Hartzell, P., Eriksson, I., Mellstedt, H., Orrenius, S., and Jondal, M. (1991). Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *146*, 1072–1076.

McKenzie, A.N., Culpepper, J.A., de Waal Malefyt, R., Brière, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B.G., and Menon, S. (1993). Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3735–3739.

Medarova, Z., Pham, W., Farrar, C., Petkova, V., and Moore, A. (2007). In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. *Nat. Med.* *13*, 372–377.

Meel, M.H., Metselaar, D.S., Waranecki, P., Kaspers, G.J.L., and Hulleman, E. (2018). An efficient method for the transduction of primary pediatric glioma neurospheres. *MethodsX* *5*, 173–183.

Messmer, B.T., Albesiano, E., Efremov, D.G., Ghiotto, F., Allen, S.L., Kolitz, 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. *J. Exp. Med.* *200*, 519–525.

Miao, T., Raymond, M., Bhullar, P., Ghaffari, E., Symonds, A.L.J., Meier, U.C., Giovannoni, G., Li, S., and Wang, P. (2013). Early growth response gene-2 controls IL-17 expression and Th17 differentiation by negatively regulating Batf. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 58–65.

Miao, T., Symonds, A.L.J., Singh, R., Symonds, J.D., Ogbe, A., Omodho, B., Zhu, B., Li, S., and Wang, P. (2017). Egr2 and 3 control adaptive immune responses by temporally uncoupling expansion from T cell differentiation. *J. Exp. Med.* *214*, 1787–1808.

Minami, S., Nagashio, R., Ueda, J., Matsumoto, K., Goshima, N., Hattori, M., Hachimura, K., Iwamura, M., and Sato, Y. (2014). Detection of tumor-associated antigens in culture

supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* *35*, 25–35.

Mittal, A.K., Chaturvedi, N.K., Rohlfen, R.A., Gupta, P., Joshi, A.D., Hegde, G.V., Bociek, R.G., and Joshi, S.S. (2013). Role of CTLA4 in the Proliferation and Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE* *8*, e70352.

Mock, U., Thiele, R., Uhde, A., Fehse, B., and Horn, S. (2012). Efficient Lentiviral Transduction and Transgene Expression in Primary Human B Cells. *Human Gene Therapy Methods* *23*, 408–415.

Moerkens, M., Zhang, Y., Wester, L., van de Water, B., and Meerman, J.H.N. (2014). Epidermal growth factor receptor signalling in human breast cancer cells operates parallel to estrogen receptor α signalling and results in tamoxifen insensitive proliferation. *BMC Cancer* *14*, 283.

Mohr, S.E., Smith, J.A., Shamu, C.E., Neumüller, R.A., and Perrimon, N. (2014). RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 591–600.

Molica, S., Digiesi, G., D'Arena, G., Mirabelli, R., Antenucci, A., Conti, L., Gentile, M., Musto, P., Neri, A., and Morabito, F. (2016). Serum levels of soluble calreticulin predict for time to first treatment in early chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* *175*, 983–985.

Morita, K., Okamura, T., Sumitomo, S., Iwasaki, Y., Fujio, K., and Yamamoto, K. (2016). Emerging roles of Egr2 and Egr3 in the control of systemic autoimmunity. *Rheumatology* *55*, ii76–ii81.

Moriuchi, M., Moriuchi, H., Turner, W., and Fauci, A.S. (1997). Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J. Immunol. Baltim. Md* *159*, 4322–4329.

Morris, V.B., and Labhasetwar, V. (2015). Arginine-rich polyplexes for gene delivery to neuronal cells. *Biomaterials* *60*, 151–160.

- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50–56.
- Murakami, T., Maki, W., Cardones, A.R., Fang, H., Tun Kyi, A., Nestle, F.O., and Hwang, S.T. (2002). Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res.* *62*, 7328–7334.
- Murdoch, C., Monk, P.N., and Finn, A. (1999). Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells. *Immunology* *98*, 36–41.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* *52*, 145–176.
- Nagarajan, R., Svaren, J., Le, N., Araki, T., Watson, M., and Milbrandt, J. (2001). EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* *30*, 355–368.
- Nakamura, T., Shinriki, S., Jono, H., Guo, J., Ueda, M., Hayashi, M., Yamashita, S., Zijlstra, A., Nakayama, H., Hiraki, A., et al. (2015). Intrinsic TGF- β 2-triggered SDF-1-CXCR4 signaling axis is crucial for drug resistance and a slow-cycling state in bone marrow-disseminated tumor cells. *Oncotarget* *6*, 1008–1019.
- Nangalia, J., Massie, C.E., Baxter, E.J., Nice, F.L., Gundem, G., Wedge, D.C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, D.G., et al. (2013). Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* *369*, 2391–2405.
- Natrajan, R., Little, S.E., Reis-Filho, J.S., Hing, L., Messahel, B., Grundy, P.E., Dome, J.S., Schneider, T., Vujanic, G.M., Pritchard-Jones, K., et al. (2006). Amplification and overexpression of CACNA1E correlates with relapse in favorable histology Wilms' tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 7284–7293.
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., and Ali, P.A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.* *1*, 27.

- Neuhaus, B., Tosun, B., Rotan, O., Frede, A., Westendorf, A.M., and Epple, M. (2016). Nanoparticles as transfection agents: a comprehensive study with ten different cell lines. *RSC Adv.* *6*, 18102–18112.
- Neumann, E., and Rosenheck, K. (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* *10*, 279–290.
- Nicholson, L.J., Philippe, M., Paine, A.J., Mann, D.A., and Dolphin, C.T. (2005). RNA interference mediated in human primary cells via recombinant baculoviral vectors. *Mol. Ther.* *11*, 638–644.
- Nosari, A. (2012). Infectious complications in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* *4*, e2012070.
- Novak, U., Rinaldi, A., Kwee, I., Nandula, S.V., Rancoita, P.M.V., Compagno, M., Cerri, M., Rossi, D., Murty, V.V., Zucca, E., et al. (2009). The NF- κ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood* *113*, 4918–4921.
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., et al. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* *382*, 833–835.
- O'Donovan, K.J., Tourtellotte, W.G., Millbrandt, J., and Baraban, J.M. (1999). The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci.* *22*, 167–173.
- Ogbe, A., Miao, T., Symonds, A.L.J., Omodho, B., Singh, R., Bhullar, P., Li, S., and Wang, P. (2015). Early Growth Response Genes 2 and 3 Regulate the Expression of Bcl6 and Differentiation of T Follicular Helper Cells. *J. Biol. Chem.* *290*, 20455–20465.
- 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.

Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* *121*, 335–348.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* *132*, 631–644.

Os, A., Bürgler, S., Ribes, A.P., Funderud, A., Wang, D., Thompson, K.M., Tjønnfjord, 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.

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.

Paijo, J., Döring, M., Spanier, J., Grabski, E., Nooruzzaman, M., Schmidt, T., Witte, G., Messerle, M., Hornung, V., Kaefer, V., et al. (2016). cGAS Senses Human Cytomegalovirus and Induces Type I Interferon Responses in Human Monocyte-Derived Cells. *PLoS Pathog* *12*, e1005546.

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.

Parry, M., Rose-Zerilli, M.J., Ljungström, V., Gibson, J., Wang, J., Walewska, R., Parker, H., Parker, A., Davis, Z., Gardiner, A., et al. (2015). Genetics and Prognostication in Splenic Marginal Zone Lymphoma: Revelations from Deep Sequencing. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 4174–4183.

Parvatiyar, K., Barber, G.N., and Harhaj, E.W. (2010). TAX1BP1 and A20 inhibit antiviral signaling by targeting TBK1-IKK ϵ kinases. *J. Biol. Chem.* *285*, 14999–15009.

Pascutti, M.F., Jak, M., Tromp, J.M., Derks, I.A.M., Remmerswaal, E.B.M., Thijssen, R., van Attekum, M.H.A., 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.M., Buggins, A.G.S., 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.

Peng, L.-H., Huang, Y.-F., Zhang, C.-Z., Niu, J., Chen, Y., Chu, Y., Jiang, Z.-H., Gao, J.-Q., and Mao, Z.-W. (2016). Integration of antimicrobial peptides with gold nanoparticles as unique non-viral vectors for gene delivery to mesenchymal stem cells with antibacterial activity. *Biomaterials* *103*, 137–149.

Percherancier, Y., Berchiche, Y.A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M., and Heveker, N. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* *280*, 9895–9903.

Persson, S., Rosenquist, M., and Sommarin, M. (2002). Identification of a novel calreticulin isoform (Crt2) in human and mouse. *Gene* *297*, 151–158.

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.

Philipp, C., Edelmann, J., Bühler, A., Winkler, D., Stilgenbauer, S., and Küppers, R. (2011). Mutation analysis of the TNFAIP3 (A20) tumor suppressor gene in CLL. *Int. J. Cancer* *128*, 1747–1750.

Phillips, J.A., Mehta, K., Fernandez, C., and Raveché, E.S. (1992). The NZB Mouse as a Model for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res.* *52*, 437–443.

Phillips, R.J., Mestas, J., Gharaee-Kermani, M., Burdick, M.D., Sica, A., Belperio, J.A., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2005). Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* *280*, 22473–22481.

Plander, M., Seegers, S., Ugocsai, P., Diermeier-Daucher, S., Iványi, J., Schmitz, G., Hofstädter, F., Schwarz, S., Orsó, E., Knüchel, 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.

Porpaczy, E., Tauber, S., Bilban, M., Kostner, G., Gruber, M., Eder, S., Heintel, D., Le, T., Fleiss, K., Skrabs, C., et al. (2013). Lipoprotein lipase in chronic lymphocytic leukaemia – Strong biomarker with lack of functional significance. *Leukemia Research* *37*, 631–636.

Postel-Vinay, S., Véron, A.S., Tirode, F., Pierron, G., Reynaud, S., Kovar, H., Oberlin, O., Lapouble, E., Ballet, S., Lucchesi, C., et al. (2012). Common variants near TARDBP and EGR2 are associated with susceptibility to Ewing sarcoma. *Nat. Genet.* *44*, 323–327.

Poulain, L., Ziller, C., Muller, C.D., Erbacher, P., Bettinger, T., Rodier, J.-F., and Behr, J.-P. (2000). Ovarian carcinoma cells are effectively transfected by polyethylenimine (PEI) derivatives. *Cancer Gene Ther* *7*, 644–652.

Przybylski, S., Gasch, M., Marschner, A., Ebert, M., Ewe, A., Helmig, G., Hilger, N., Fricke, S., Rudzok, S., Aigner, A., et al. (2017). Influence of nanoparticle-mediated transfection on proliferation of primary immune cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE* *12*, e0176517.

Puente, X.S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G.R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Beà, S., González-Díaz, M., et al. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* *475*, 101–105.

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.

Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordóñez, G.R., Jares, P., Bassaganyas, L., Ramsay, A.J., Beà, S., Pinyol, M., Martínez-Trillos, A., et al. (2011). Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* *44*, 47–52.

Ramachandran, S., Krishnamurthy, S., Jacobi, A.M., Wohlford-Lenane, C., Behlke, M.A., Davidson, B.L., and McCray, P.B. (2013). Efficient delivery of RNA interference oligonucleotides to polarized airway epithelia in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *305*, L23–32.

Rao, D.D., Vorhies, J.S., Senzer, N., and Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *61*, 746–759.

Rawstron, A.C., Green, M.J., Kuzmicki, A., Kennedy, B., Fenton, J.A.L., Evans, P.A.S., O'Connor, S.J.M., 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.

Rawstron, A.C., Bennett, F.L., O'Connor, S.J.M., Kwok, M., Fenton, J.A.L., Plummer, M., de Tute, R., Owen, R.G., Richards, S.J., Jack, A.S., et al. (2008). Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *359*, 575–583.

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 γ chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. *Blood* *118*, 6824–6835.

Roccaro, A.M., Mishima, Y., Sacco, A., Moschetta, M., Tai, Y.-T., Shi, J., Zhang, Y., Reagan, M.R., Huynh, D., Kawano, Y., et al. (2015). CXCR4 Regulates Extra-Medullary Myeloma through Epithelial-Mesenchymal-Transition-like Transcriptional Activation. *Cell Rep.* *12*, 622–635.

Rodríguez-Frade, J.M., del Real, G., Serrano, A., Hernanz-Falcón, P., Soriano, S.F., Vila-Coro, A.J., de Ana, A.M., Lucas, P., Prieto, I., Martínez-A, C., et al. (2004). Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor. *EMBO J.* *23*, 66–76.

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.

Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Péronne, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 1890–1893.

Sakurai, Y., Hada, T., Kato, A., Hagino, Y., Mizumura, W., and Harashima, H. (2018). Effective Therapy Using a Liposomal siRNA that Targets the Tumor Vasculature in a Model Murine Breast Cancer with Lung Metastasis. *Molecular Therapy - Oncolytics* *11*, 102–108.

Salameh, J.W., Zhou, L., Ward, S.M., Santa Chalarca, C.F., Emrick, T., and Figueiredo, M.L. (2019). Polymer-mediated gene therapy: Recent advances and merging of delivery techniques. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology*.

Salcedo, R., Wasserman, K., Young, H.A., Grimm, M.C., Howard, O.M., Anver, M.R., Kleinman, H.K., Murphy, W.J., and Oppenheim, J.J. (1999). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am. J. Pathol.* *154*, 1125–1135.

Santarlaschi, V., Maggi, L., Mazzoni, A., Capone, M., Querci, V., Rossi, M.C., Beltrame, L., Cavalieri, D., De Palma, R., Liotta, F., et al. (2014). IL-4-induced gene 1 maintains high Tob1 expression that contributes to TCR unresponsiveness in human T helper 17 cells: HIGHLIGHTS. *Eur. J. Immunol.* *44*, 654–661.

Santarlaschi, V., Maggi, L., Capone, M., Querci, V., Beltrame, L., Cavalieri, D., D'Aiuto, E., Cimaz, R., Nebbioso, A., Liotta, F., et al. (2012). Rarity of Human T Helper 17 Cells Is due to Retinoic Acid Orphan Receptor-Dependent Mechanisms that Limit Their Expansion. *Immunity* *36*, 201–214.

Santolla, M.F., Lappano, R., Cirillo, F., Rigracciolo, D.C., Sebastiani, A., Abonante, S., Tassone, P., Tagliaferri, P., Di Martino, M.T., Maggiolini, M., et al. (2018). miR-221

stimulates breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) through selective interference with the A20/c-Rel/CTGF signaling. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **37**, 94.

Sapet, C., Laurent, N., de Chevigny, A., Le Gourrierec, L., Bertosio, E., Zelphati, O., and Béclin, C. (2011). High transfection efficiency of neural stem cells with magnetofection. *BioTechniques* **50**, 187–189.

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 CLL: Role of microRNA-16 in the NZB mouse model. *Br. J. Haematol.* **139**, 645–657.

Schallon, A., Synatschke, C.V., Jérôme, V., Müller, A.H.E., and Freitag, R. (2012). Nanoparticulate nonviral agent for the effective delivery of pDNA and siRNA to differentiated cells and primary human T lymphocytes. *Biomacromolecules* **13**, 3463–3474.

Schechter, A.D., Berman, A.B., and Taubman, M.B. (2003). Chemokine receptors in vascular smooth muscle. *Microcirc. N. Y. N* **10**, 265–272.

Schioppa, T., Uranchimeg, B., Sacconi, A., Biswas, S.K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Sacconi, S., Nebuloni, M., Vago, L., et al. (2003). Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J. Exp. Med.* **198**, 1391–1402.

Schleiss, C., Ilias, W., Tahar, O., Güler, Y., Miguët, 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.

Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41-52.

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

Seifert, M., Sellmann, L., Bloehdorn, J., Wein, F., Stilgenbauer, S., Dürig, J., and Küppers, R. (2012). Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **209**, 2183–2198.

- Seki, A., and Rutz, S. (2018). Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. *Journal of Experimental Medicine* *215*, 985–997.
- Seldin, M.F., Conroy, J., Steinberg, A.D., D'Hoosteleare, L.A., and Raveche, E.S. (1987). Clonal expansion of abnormal B cells in old NZB mice. *J. Exp. Med.* *166*, 1585–1590.
- Serçin, Ö., Reither, S., Roidos, P., Ballin, N., Palikyras, S., Baginska, A., Rein, K., Llamazares, M., Halavatyi, A., Winter, H., et al. (2019). A solid-phase transfection platform for arrayed CRISPR screens. *Mol Syst Biol* *15*.
- Shalek, A.K., Gaublomme, J.T., Wang, L., Yosef, N., Chevrier, N., Andersen, M.S., Robinson, J.T., Pochet, N., Neuberg, D., Gertner, R.S., et al. (2012). Nanowire-Mediated Delivery Enables Functional Interrogation of Primary Immune Cells: Application to the Analysis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Nano Lett.* *12*, 6498–6504.
- Shembade, N., Ma, A., and Harhaj, E.W. (2010). Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* *327*, 1135–1139.
- Shih, T., De, S., and Barnes, B.J. (2019). RNAi Transfection Optimized in Primary Naïve B Cells for the Targeted Analysis of Human Plasma Cell Differentiation. *Front. Immunol.* *10*, 1652.
- Sheng, W., Chen, C., Dong, M., Zhou, J., Liu, Q., Dong, Q., and Li, F. (2014). Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. *J. Cell. Physiol.* *229*, 887–897.
- Sheng, W., Chen, C., Dong, M., Wang, G., Zhou, J., Song, H., Li, Y., Zhang, J., and Ding, S. (2017). Calreticulin promotes EGF-induced EMT in pancreatic cancer cells via Integrin/EGFR-ERK/MAPK signaling pathway. *Cell Death Dis.* *8*, e3147.
- Shi, Y.F., Gao, Z.F., Liu, C.L., Li, M., Lin, D.M., Zhou, L.X., Lai, Y.M., Liu, X.L., and Huang, X. (2016). [TNFAIP3 deletion status in classical Hodgkin lymphoma and its relation to Epstein-Barr virus]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi Zhonghua Xueyexue Zazhi* *37*, 1060–1064.

Shukla, A., Rai, K., Shukla, V., Chaturvedi, N.K., Bociek, R.G., Pirruccello, S.J., Band, H., Lu, R., and Joshi, S.S. (2016). Sprouty 2: a novel attenuator of B-cell receptor and MAPK-Erk signaling in CLL. *Blood* *127*, 2310–2321.

Simon-Gabriel, C.P., Foerster, K., Saleem, S., Bleckmann, D., Benkisser-Petersen, M., Thornton, N., Umezawa, K., Decker, S., Burger, M., Veelken, H., et al. (2018). Microenvironmental stromal cells abrogate NF- κ B inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* *103*, 136–147.

Smith, N., Vidalain, P.-O., Nisole, S., and Herbeuval, J.-P. (2016). An efficient method for gene silencing in human primary plasmacytoid dendritic cells: silencing of the TLR7/IRF-7 pathway as a proof of concept. *Sci Rep* *6*, 29891.

So, E.-Y., Oh, J., Jang, J.-Y., Kim, J.-H., and Lee, C.-E. (2007). Ras/Erk pathway positively regulates Jak1/STAT6 activity and IL-4 gene expression in Jurkat T cells. *Mol. Immunol.* *44*, 3416–3426.

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.

Stevenson, F.K., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* *103*, 4389–4395.

Stewart, M.P., Sharei, A., Ding, X., Sahay, G., Langer, R., and Jensen, K.F. (2016). In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery. *Nature* *538*, 183–192.

Subia, B., Reinisalo, M., Dey, N., Tavakoli, S., Subrizi, A., Ganguli, M., and Ruponen, M. (2019). Nucleic acid delivery to differentiated retinal pigment epithelial cells using cell-penetrating peptide as a carrier. *Eur J Pharm Biopharm* *140*, 91–99.

Svaren, J., Sevetson, B.R., Apel, E.D., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., and Milbrandt, J. (1996). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 3545–3553.

- Swanberg, S.E., Nagarajan, R.P., Peddada, S., Yasui, D.H., and LaSalle, J.M. (2009). Reciprocal co-regulation of EGR2 and MECP2 is disrupted in Rett syndrome and autism. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 525–534.
- Symonds, A.L., Zheng, W., Miao, T., Wang, H., Wang, T., Kiome, R., Hou, X., Li, S., and Wang, P. (2020). Egr2 and 3 control inflammation, but maintain homeostasis, of PD-1^{high} memory phenotype CD4 T cells. *Life Sci. Alliance* *3*.
- Szöke, D., Györffy, A., Surowiak, P., Tulassay, Z., Dietel, M., and Györffy, B. (2007). Identification of consensus genes and key regulatory elements in 5-fluorouracil resistance in gastric and colon cancer. *Onkologie* *30*, 421–426.
- Tai, W., and Gao, X. (2017). Functional peptides for siRNA delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *110–111*, 157–168.
- Taichman, R.S., Cooper, C., Keller, E.T., Pienta, K.J., Taichman, N.S., and McCauley, L.K. (2002). Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* *62*, 1832–1837.
- 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. Baltim. Md 1950* *170*, 686–694.
- Tewari, M., Wolf, F.W., Seldin, M.F., O'Shea, K.S., Dixit, V.M., and Turka, L.A. (1995). Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 1699–1706.
- Tierney, E.G., Duffy, G.P., Cryan, S.-A., Curtin, C.M., and O'Brien, F.J. (2013). Non-viral gene-activated matrices: next generation constructs for bone repair. *Organogenesis* *9*, 22–28.
- 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.

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.

Tromp, J.M., Tonino, S.H., Elias, J.A., Jaspers, A., Luijks, D.M., Kater, A.P., van Lier, R. a. W., van Oers, M.H.J., 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.

Vallat, L., Kemper, C.A., Jung, N., Maumy-Bertrand, M., Bertrand, F., Meyer, N., Pocheville, A., Fisher, J.W., Gribben, J.G., and Bahram, S. (2013). Reverse-engineering the genetic circuitry of a cancer cell with predicted intervention in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *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.

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.

Villeneuve, L., Alberti, L., Steghens, J.-P., Lancelin, J.-M., and Mestas, J.-L. (2009). Assay of hydroxyl radicals generated by focused ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* *16*, 339–344.

Vitali, A. (2015). Proline-rich peptides: multifunctional bioactive molecules as new potential therapeutic drugs. *Curr. Protein Pept. Sci.* *16*, 147–162.

Voelkl, J., Alesutan, I., Pakladok, T., Viereck, R., Feger, M., Mia, S., Schönberger, T., Noegel, A.A., Gawaz, M., and Lang, F. (2014). Annexin A7 deficiency potentiates cardiac NFAT activity promoting hypertrophic signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *445*, 244–249.

- 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.
- Wang, J., Guan, E., Roderiquez, G., Calvert, V., Alvarez, R., and Norcross, M.A. (2001). Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. *J. Biol. Chem.* *276*, 49236–49243.
- 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.
- Wang, Y., Wan, M., Zhou, Q., Wang, H., Wang, Z., Zhong, X., Zhang, L., Tai, S., and Cui, Y. (2015). The Prognostic Role of SOCS3 and A20 in Human Cholangiocarcinoma. *PloS One* *10*, e0141165.
- Wang, T., Larcher, L.M., Ma, L., and Veedu, R.N. (2018). Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Molecules* *23*.
- Wang, T., Zhang, F.-S., Ye, H.-Y., An, L.-Z., Xiong, L.-L., Huang, X.-B., and Xu, Q.-Q. (2019). Targeting silencing androgen receptor gene by shRNA with low-intensity focused ultrasonic irradiation inhibits growth of prostate cancer xenografts in nude mice. *Int J Clin Exp Pathol* *12*, 1295–1304.
- Welter, J.F., Solchaga, L.A., and Stewart, M.C. (2004). High-efficiency nonviral transfection of primary chondrocytes. *Methods Mol. Med.* *100*, 129–146.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., et al. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* *430*, 694–699.
- White, T.K., Zhu, Q., and Tanzer, M.L. (1995). Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading. *J. Biol. Chem.* *270*, 15926–15929.

Wilson, R.C., and Doudna, J.A. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu. Rev. Biophys.* *42*, 217–239.

Wiesner, S.M., Decker, S.A., Larson, J.D., Ericson, K., Forster, C., Gallardo, J.L., Long, C., Demorest, Z.L., Zamora, E.A., Low, W.C., et al. (2009). De novo Induction of Genetically Engineered Brain Tumors in Mice Using Plasmid DNA. *Cancer Research* *69*, 431–439.

Won, M., Park, K.A., Byun, H.S., Sohn, K.-C., Kim, Y.-R., Jeon, J., Hong, J.H., Park, J., Seok, J.H., Kim, J.M., et al. (2010). Novel anti-apoptotic mechanism of A20 through targeting ASK1 to suppress TNF-induced JNK activation. *Cell Death Differ.* *17*, 1830–1841.

Xu, Y., Xu, Y., Zhu, Y., Sun, H., Juguilon, C., Li, F., Fan, D., Yin, L., and Zhang, Y. (2020). Macrophage miR-34a Is a Key Regulator of Cholesterol Efflux and Atherosclerosis. *Molecular Therapy* *28*, 202–216.

Yang, J., Hendricks, W., Liu, G., McCaffery, J.M., Kinzler, K.W., Huso, D.L., Vogelstein, B., and Zhou, S. (2013). A nanoparticle formulation that selectively transfects metastatic tumors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 14717–14722.

Yang, Y.-Q., Tian, T., Zhu, H.-Y., Liang, J.-H., Wu, W., Wu, J.-Z., Xia, Y., Wang, L., Fan, L., Li, J.-Y., et al. (2018). NDRG2 mRNA levels and miR-28-5p and miR-650 activity in chronic lymphocytic leukemia. *BMC Cancer* *18*, 1009.

Yao, X.J., Subbramanian, R.A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D., and Cohen, E.A. (1995). Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol.* *69*, 7032–7044.

Yasuda, T., Sanjo, H., Pagès, G., Kawano, Y., Karasuyama, H., Pouyssegur, J., Ogata, M., and Kurosaki, T. (2008). Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity* *28*, 499–508.

Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., and Anderson, D.G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 541–555.

- Yin, P., Navarro, A., Fang, F., Xie, A., Coon, J.S., Richardson, C., and Bulun, S.E. (2011). Early growth response-2 expression in uterine leiomyoma cells: regulation and function. *Fertil. Steril.* *96*, 439–444.
- Yoshida, T., and Georgopoulos, K. (2014). Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *Int. J. Hematol.* *100*, 220–229.
- Yoshida, N., Kitayama, D., Arima, M., Sakamoto, A., Inamine, A., Watanabe-Takano, H., Hatano, M., Koike, T., and Tokuhisa, T. (2011). CXCR4 Expression on Activated B Cells Is Downregulated by CD63 and IL-21. *J. Immunol.* *186*, 2800–2808.
- 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. *Int. Immunol.* *12*, 517–526.
- Yoshida, S., Nabzdyk, C.S., Pradhan, L., and LoGerfo, F.W. (2011). Thrombospondin-2 Gene Silencing in Human Aortic Smooth Muscle Cells Improves Cell Attachment. *Journal of the American College of Surgeons* *213*, 668–676.
- Young, E., Noerenberg, D., Mansouri, L., Ljungström, V., Frick, M., Sutton, L.-A., Blakemore, S.J., Galan-Sousa, J., Plevova, K., Baliakas, P., et al. (2017). EGR2 mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *31*, 1547–1554.
- Yu, D., Khan, O.F., Suvà, M.L., Dong, B., Panek, W.K., Xiao, T., Wu, M., Han, Y., Ahmed, A.U., Balyasnikova, I.V., et al. (2017). Multiplexed RNAi therapy against brain tumor-initiating cells via lipopolymeric nanoparticle infusion delays glioblastoma progression. *Proc Natl Acad Sci USA* *114*, E6147–E6156.
- Yu, M.K. (2006). Epigenetics and chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* *81*, 864–869.
- Yu, S.S., Lau, C.M., Barham, W.J., Onishko, H.M., Nelson, C.E., Li, H., Smith, C.A., Yull, F.E., Duvall, C.L., and Giorgio, T.D. (2013). Macrophage-specific RNA interference targeting via “click”, mannosylated polymeric micelles. *Mol. Pharm.* *10*, 975–987.

- Zaman, G., Sunters, A., Galea, G.L., Javaheri, B., Saxon, L.K., Moustafa, A., Armstrong, V.J., Price, J.S., and Lanyon, L.E. (2012). Loading-related regulation of transcription factor EGR2/Krox-20 in bone cells is ERK1/2 protein-mediated and prostaglandin, Wnt signaling pathway-, and insulin-like growth factor-I axis-dependent. *J. Biol. Chem.* *287*, 3946–3962.
- Zeelenberg, I.S., Ruuls-Van Stalle, L., and Roos, E. (2003). The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* *63*, 3833–3839.
- Zeitelhofer, M., Karra, D., Vessey, J.P., Jaskic, E., Macchi, P., Thomas, S., Riefler, J., Kiebler, M., and Dahm, R. (2009). High-efficiency transfection of short hairpin RNAs-encoding plasmids into primary hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* *87*, 289–300.
- Zeng, G., Aldridge, M.E., Tian, X., Seiler, D., Zhang, X., Jin, Y., Rao, J., Li, W., Chen, D., Langford, M.P., et al. (2006). Dendritic cell surface calreticulin is a receptor for NY-ESO-1: direct interactions between tumor-associated antigen and the innate immune system. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 3582–3589.
- Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H., and Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 37–50.
- Zhao, Y., Zheng, Z., Cohen, C.J., Gattinoni, L., Palmer, D.C., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2006). High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation. *Molecular Therapy* *13*, 151–159.
- Zhao, D., Zhuang, N., Ding, Y., Kang, Y., and Shi, L. (2016). MiR-221 activates the NF- κ B pathway by targeting A20. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *472*, 11–18.
- Zheng, Z., Venkatapathy, S., Rao, G., and Harrington, C.A. (2002). Expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia suggests deficient CD1-mediated immunity, polarized cytokine response, altered adhesion and increased intracellular protein transport and processing of leukemic cells. *Leukemia* *16*, 2429–2437.

Zoetewij, J.P., Golding, H., Mostowski, H., and Blauvelt, A. (1998). Cytokines regulate expression and function of the HIV coreceptor CXCR4 on human mature dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 3219–3223.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* *393*, 595–599.

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.

Modulation de l'expression de gènes induits par la stimulation du récepteur à l'antigène *ex vivo* dans des lymphocytes primaires de leucémie lymphoïde chronique

Résumé

Dans les leucémies et lymphomes développées à partir de lymphocytes B matures, la prolifération tumorale est induite par une stimulation antigénique chronique. La réponse transcriptionnelle en aval du récepteur à l'antigène pourrait permettre de développer de nouvelles thérapies dans ces hémopathies encore incurables. Une étude préliminaire a permis de caractériser des gènes clés de cette réponse transcriptionnelle après activation du récepteur à l'antigène.

L'objectif de ma thèse a consisté à moduler l'expression de certains de ces gènes clés dans ces lymphocytes de leucémie lymphoïde chronique difficilement transfectables.

Après validation du profil d'expression dynamique de gènes après activation du récepteur à l'antigène *ex vivo*, j'ai analysé l'efficacité de délivrance de petites molécules à l'aide de différentes méthodes de transfection. L'utilisation d'une méthode lipidique a permis de diminuer l'expression du gène CALR de 31% (min 18% - max 68%) dans ces lymphocytes tumoraux. Des analyses supplémentaires seront nécessaires pour évaluer l'effet de cette modulation d'expression sur la réponse proliférative de ces lymphocytes tumoraux.

leucémie lymphoïde chronique / lymphocyte B / récepteur à l'antigène / transcription / prolifération / transfection / modulation d'expression

Abstract

In leukemias and lymphomas developed from mature B-lymphocytes, tumor proliferation is induced by chronic antigenic stimulation. The downstream transcriptional response of the antigen receptor could allow the development of new therapies in these still incurable hematological diseases. A preliminary study has characterized key genes of this transcriptional response after activation of the antigen receptor.

The objective of my thesis was to modulate the expression of some of these key genes in these difficult-to-transfect chronic lymphocytic leukemia lymphocytes.

After validation of the dynamic gene expression profile after activation of the antigen receptor *ex vivo*, I analyzed the delivery efficiency of small molecules using different transfection methods. The use of a lipidic method allowed to decrease the expression of the CALR gene by 31% (min 18% - max 68%) in these tumor lymphocytes. Further analyses will be required to evaluate the effect of this expression modulation on the proliferative response of these tumor lymphocytes.

Chronic lymphocytic leukemia / B lymphocyte / B-cell receptor / transcription / proliferation / transfection / expression modulation