



**HAL**  
open science

# Expression et fonctionnalité des Toll-Like récepteurs par les cellules de leucémie lymphoïde chronique B

Cindy Grandjette

## ► To cite this version:

Cindy Grandjette. Expression et fonctionnalité des Toll-Like récepteurs par les cellules de leucémie lymphoïde chronique B. Médecine humaine et pathologie. UHP - Université Henri Poincaré, 2008. Français. NNT : 2008NAN10122 . tel-02044003

**HAL Id: tel-02044003**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02044003v1>**

Submitted on 21 Feb 2019

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

# **Expression et fonctionnalité des Toll-Like récepteurs par les cellules de leucémie lymphoïde chronique B**

Cindy GRANDJENETTE

Thèse soutenue publiquement le 6 Mars 2008  
Directeur de Thèse : Professeur Marie-Christine BENE (UHP Nancy I)

## **RESUME**

La leucémie lymphoïde chronique reste une pathologie incurable même si les nouveaux moyens thérapeutiques permettent d'obtenir des réponses de bonne qualité. Les déterminants idiotypiques des lymphocytes B représentent une cible idéale pour la génération de cellules T spécifiques dirigées contre le clone malin. Dans ce cadre, l'induction d'une réponse immunitaire efficace semble donc intéressante. L'objectif principal de cette étude était d'augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales de LLC-B. Pour cela, la possibilité d'une activation de ces cellules par des agonistes de Toll-like récepteurs (TLRs) a été explorée.

Tout d'abord, le profil d'expression protéique des TLRs a été recherché au niveau des lymphocytes B sains et pathologiques par cytométrie de flux. La mise en évidence d'une expression significative de TLR-7 et TLR-9 a ensuite permis d'analyser l'effet d'une stimulation par des ligands de ces TLRs par immunophénotypage, cytomorphologie, analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL et étude de la prolifération par marquage CFSE. Le profil cytokinique des suspensions cellulaires stimulées ou non a également été examiné par cytométrie de flux. Enfin, une analyse fonctionnelle a été réalisée dans un modèle de stimulation allogénique afin de mesurer la capacité de ces cellules stimulées à activer des lymphocytes T naïfs.

Les résultats obtenus montrent un profil d'expression des TLR-4, -7, -9 et -10 similaire pour les cellules B de LLC et les lymphocytes B sains avec toutefois une expression plus importante de TLR-9 dans les cellules tumorales. L'engagement de TLR-4 a pour conséquence une faible activation de HLA-DR sur les cellules B saines et tumorales. L'activation de TLR-7 via les plus fortes concentrations d'imiquimod R837 induit surtout une apoptose rapide et importante des cellules de LLC-B ainsi qu'une augmentation modérée de l'expression des marqueurs de costimulation et de présentation des cellules B saines et tumorales. La stimulation de TLR-9 via les ODN CpG entraîne une activation des cellules B saines et tumorales et protège les cellules tumorales de l'apoptose. Les profils cytokiniques des suspensions cellulaires ont montré que ces ligands de TLRs orientent les réponses cellulaires vers un profil pro-inflammatoire, éventuellement propice à la génération de réponses cellulaires, potentiellement anti-tumorales via la production d'IL-8 et de TNF. Enfin, il est apparu que les cellules amygdaliennes et tumorales stimulées avec les ODN CpG

n'étaient pas capables d'activer des lymphocytes T naïfs allogéniques, ce qui pourrait être lié à la faible production d'IL-2 ou à la production d'IL-10 par ces cellules.

En conclusion, TLR-7 et TLR-9 représentent des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement de la LLC-B. L'imiquimod R837 pourrait aider à la clairance tumorale dans les LLC-B. L'activation cellulaire induite par via les ODN CpG M362 pourrait par contre être utilisée pour augmenter le potentiel de cellules présentatrices d'antigènes des cellules B de LLC à condition de parvenir à contrecarrer l'environnement tolérogène et à différencier les cellules B en cellules activatrices de réponses Th1 et cytotoxiques.

**Mots clés** : Leucémie lymphoïde chronique, Toll-Like récepteurs, LPS, imiquimod R837, ODN CpG M362

**Publications** :

**Grandjenette C**, Kennel A, Faure GC, Béné MC, Feugier P. Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2007 Sep;92(9):1279-81.

**Grandjenette C**, Kennel A, Massin F, Faure GC, Béné MC, Montagne P. Measurement of immunoglobulins G, A, and M levels in B-lymphocytes culture. *J Immunoassay Immunochem*. 2005;26(4):303-11.

# Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I**

**en Biologie Cellulaire**

**par Cindy GRANDJENETTE**

## **Expression et fonctionnalité des Toll-Like récepteurs par les cellules de leucémie lymphoïde chronique B**

Soutenue publiquement le 6 Mars 2008

### **MEMBRES DU JURY :**

<b>Rapporteurs :</b>	Docteur Claude BOUCHEIX, DR1 Professeur Pierre YOUINOU	INSERM U602, Villejuif Université de Brest
<b>Examineurs :</b>	Professeur Marie-Christine BENE Professeur Gilbert FAURE Professeur Pierre FEUGIER Professeur Marc MAYNADIE	UHP Nancy I UHP Nancy I (Directeur de thèse) UHP Nancy I Université de Bourgogne

# Remerciements

## **A Monsieur le Professeur FAURE**

Professeur de la Faculté de Médecine de Nancy de l'UHP Nancy I

Recevez mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire, pour l'intérêt que vous avez toujours porté à ce travail et pour les moyens mis à ma disposition durant ces années passées au sein de votre équipe. Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

## **A Madame le Professeur BENE**

Professeur de la Faculté de Médecine de Nancy de l'UHP Nancy I

Votre expérience, vos grandes compétences et vos précieux conseils ont permis l'accomplissement de ce travail. Je vous remercie pour la précieuse relecture que vous avez faite de ce mémoire et pour vos commentaires constructifs. Je tiens à vous exprimer mon admiration pour votre enthousiasme et votre dynamisme sans faille. Soyez assurée de mon plus profond respect et de ma profonde gratitude.

## **A Monsieur le Docteur BOUCHEIX**

Directeur de l'Unité de Recherche U602 de Villejuif

Recevez mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur.

**A Monsieur le Professeur YOUINOU**

Professeur de la Faculté de Médecine de l'Université de Brest

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur.

**A Monsieur le Professeur FEUGIER**

Professeur de l'UHP Nancy I

Je suis particulièrement honorée de votre présence dans ce jury de thèse. Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour toutes nos discussions, pour vos commentaires et vos suggestions qui ont été fortement appréciés. Je vous remercie pour nous avoir fourni les prélèvements de patients indispensables à la réalisation de ce travail.

**A Monsieur le Professeur MAYNADIE**

Professeur de l'Université de Bourgogne

Je tiens à vous adresser mes plus vifs remerciements pour l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à mon jury de thèse.

Je remercie également tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est :

**A Madame le Docteur Anne KENNEL**

Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide scientifique et pratique, pour tes nombreux conseils, pour toutes les connaissances que tu m'as transmises, pour ton écoute et ta disponibilité tout au long de ma thèse. Ton soutien s'est avéré déterminant pour mener ce travail à terme. Sois assurée de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

**A Madame GRAISSE et Madame SIMONIN du Centre de Transfusion Sanguine de Brabois**

Pour leur gentillesse lors nos multiples échanges téléphoniques et pour m'avoir fourni les prélèvements dont j'ai eu besoin pour la réalisation de ce travail.

**A Monsieur le Professeur PERRIN et son service (service ORL, Hôpital d'Enfants de Brabois)**

Pour m'avoir fourni les amygdales indispensables à la réalisation de cette étude.

**A Monsieur le Docteur CIREE**

Pour sa collaboration sur les MLRs.

**A toute l'équipe du Laboratoire d'Immunologie,**

**Brigitte, Christelle, Christine, Manu, Myriam**, pour votre bonne humeur, votre disponibilité et votre assistance aussi bien matérielle que morale.

**Catherine**, pour ton aide technique (notamment lorsque j'étais débordée avec mes ficolls !), pour ton écoute, et ton soutien tout au long de cette thèse.

**Chantal**, pour votre disponibilité et votre aide en microscopie optique.

**Christian et Fabian**, pour tous les petits services que vous avez pu me rendre et pour le recueil des prélèvements (qui n'a pas été évident à la fin !).

**Christine**, pour m'avoir apporté ton aide technique en cytométrie de flux.

**Fred**, pour l'aide que tu m'as apportée pour ma "dernière" manip et pour l'impression de ce manuscrit.

**Ghislaine**, pour l'intérêt que tu as manifesté vis à vis de mon travail, ainsi que pour toutes nos conversations.

**Marcello**, pour les conseils que tu m'as prodigués, et ton aide technique pour la mise au point de la réalisation des MLRs.

**Marie Joseph**, pour votre gentillesse, votre écoute et pour m'avoir si souvent prêté votre ordinateur.



**Marie-Nathalie**, qui n'est plus là, mais que je tiens à remercier pour sa disponibilité, son humour et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée au début de ma thèse.

**Martine**, pour ton aide sur le plan technique et tes grandes qualités humaines qui m'ont été précieuses.

**Paul Montagne**, pour tous les problèmes informatiques que vous m'avez si gentiment aidé à résoudre (alors que j'étais désespérée !) et pour vos conseils pour mes études statistiques.

Merci à vous tous pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble depuis mon arrivée dans ce laboratoire !

### **A mes amis**

Un grand merci en particulier à Sabrina pour ton écoute dans les moments difficiles, surtout à la fin de cette thèse. Tu as toujours été là, et je t'en remercie sincèrement. J'espère bientôt te "retrouver" !

Un grand merci également à Eléonore, Johanne, Salhia et Sophie, pour votre amitié, pour tout ce que nous avons partagé et pour votre soutien sans faille en particulier au cours de ces derniers mois !

À tous les autres que je ne peux citer tant la liste est longue, mais que je n'oublie pas...

### **A ma famille**

Pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir permis de réaliser mes projets dans les meilleures conditions possibles et pour votre soutien qui a été essentiel tout au long de mes études et tout particulièrement au cours de ce travail. Merci pour votre patience et votre amour. Je vous en suis infiniment reconnaissante.

*A mes parents,*

# PREAMBULE

La leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) est la leucémie la plus fréquente dans les pays occidentaux. D'importants progrès thérapeutiques ont été réalisés dans le traitement de cette maladie depuis quelques années avec notamment l'apport des analogues des purines et l'utilisation d'anticorps monoclonaux humanisés à visée thérapeutique, mais la LLC-B reste toujours une maladie incurable dans l'immense majorité des cas.

L'existence d'un effet "graft-versus-leukemia" dans la LLC-B, après une greffe allogénique à conditionnement myéloablatif ou à conditionnement atténué, souligne la capacité du système immunitaire à guérir la LLC-B et donc l'intérêt potentiel de l'immunothérapie cellulaire dans le traitement de cette maladie. Ainsi, la vaccination antitumorale pourrait occuper une place de choix dans le traitement de la LLC-B d'autant plus que les déterminants idiotypiques des lymphocytes B représentent une cible idéale pour la génération de cellules T spécifiques dirigées contre le clone malin. Mais les nombreuses anomalies immunologiques décrites dans la LLC-B et responsables d'un environnement anergisant constituent un obstacle à surmonter pour le développement d'approches vaccinales satisfaisantes.

Il pourrait être intéressant de tirer profit des propriétés de cellules B capables de présenter elles-mêmes leur idiotype en cas d'activation. Dans ce contexte, les Toll-Like Récepteurs ou TLRs qui sont des récepteurs de l'immunité innée impliqués dans l'activation des cellules B normales pourraient constituer une approche originale dans le traitement de la LLC-B.

L'objectif à terme de cette étude est d'augmenter l'immunogénicité des cellules B tumorales en les transformant en cellules capables de présenter efficacement leur propre idiotype tumoral et d'induire des réponses de type TH1 et cytotoxiques. Ces possibilités ont été explorées via l'utilisation d'un activateur non spécifique, le phorbol 12-myristate 13-acétate, pour une stimulation chimique directe de la protéine kinase C et des ligands de Toll-Like récepteurs, correspondant à une approche plus naturelle et pharmacologiquement acceptable, mais dépendante de la présence de ces molécules sur les cellules de LLC-B.

Après une revue de la littérature des connaissances actuelles portant sur la LLC-B, les contreparties physiologiques potentielles des cellules qui la constituent, l'immunité antitumorale dans la LLC-B et les TLRs, les travaux réalisés dans le cadre de cette étude sont exposés.

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>10</b>
<b>SITUATION DU SUJET .....</b>	<b>11</b>
I- LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE B OU LLC-B.....	12
I.1 - Définition .....	12
I.2 - Epidémiologie et étiologie .....	12
I.3 - Classification .....	13
I.4 - Signes cliniques .....	14
I.5 - Evolution .....	15
I.5.1 - Complications hématologiques .....	15
I.5.2 - Complications infectieuses .....	16
I.5.3 - Cancers associés .....	16
I.6 - Biologie des cellules B tumorales .....	17
I.7 - Facteurs pronostiques .....	19
I.7.1 - Critères de diagnostic positif .....	19
I.7.2 - Immunophénotype des cellules B de la LLC-B.....	20
I.7.3 - Classifications de Rai et de Binet.....	21
I.8 - Nouveaux facteurs pronostiques .....	24
I.8.1 - Cytogénétique.....	24
I.8.2 - Hypermutations somatiques .....	25
I.8.3 - CD38 .....	27
I.8.4 - Zap 70.....	28
I.8.5 - Autres facteurs biologiques .....	29
I.9 - Traitements.....	31
I.9.1 - Indications thérapeutiques pour le stade A.....	31
I.9.2 - Indications thérapeutiques pour les stades B et C.....	32
I.9.3 - Traitement de première intention.....	33

I.9.4 -	<i>Greffes de cellules souches hématopoïétiques</i> .....	37
II -	CONTREPARTIE PHYSIOLOGIQUE DE LA LLC-B .....	39
III -	IMMUNOTHERAPIE ANTI-TUMORALE DE LA LLC-B .....	41
III.1 -	Potentiel antigénique des cellules de LLC-B .....	41
III.2 -	Utilisation des cellules B leucémiques comme vecteur de l'antigène tumoral	42
III.3 -	Rôle des lymphocytes T dans l'immunité anti-tumorale .....	45
III.3.1 -	<i>Génération de cellules T effectrices et des cellules T mémoires</i> .....	45
III.3.2 -	<i>Les lymphocytes auxiliaires ou helper</i> .....	47
III.3.3 -	<i>Rôle des lymphocytes T CD8+ dans l'immunité anti-tumorale</i> .....	49
III.4 -	TLRs et immunothérapie anti-tumorale .....	50
IV -	LES TOLL-LIKE RECEPTEURS .....	51
IV.1 -	Découverte .....	51
IV.2 -	Sélectivité des ligands .....	51
IV.2.1 -	<i>TLR-2, TLR-1/TLR-2 et TLR-6/TLR-2</i> .....	52
IV.2.2 -	<i>TLR-3</i> .....	53
IV.2.3 -	<i>TLR-4</i> .....	53
IV.2.4 -	<i>TLR-5</i> .....	54
IV.2.5 -	<i>TLR-7 et TLR-8</i> .....	54
IV.2.6 -	<i>TLR-9</i> .....	55
IV.2.7 -	<i>TLRs et ligands endogènes</i> .....	55
IV.3 -	Structure .....	56
IV.3.1 -	<i>Domaine extracellulaire</i> .....	57
IV.3.2 -	<i>Domaine intracellulaire ou domaine TIR</i> .....	57
IV.4 -	Signalisation des TLRs.....	58
IV.4.1 -	<i>Voie de signalisation MyD88 dépendante</i> .....	59
IV.4.2 -	<i>Voie de signalisation MyD88 indépendante</i> .....	65
IV.5 -	Expression des TLRs.....	68
IV.5.1 -	<i>Localisation cellulaire</i> .....	68
IV.5.2 -	<i>Expression cellulaire et tissulaire</i> .....	68
	<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>70</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>72</b>
I -	PATIENTS ET PRELEVEMENTS .....	73

I.1 -	Cellules tumorales issues des patients.....	73
I.2 -	Cellules saines utilisées comme témoins .....	73
I.2.1 -	Cellules issues du sang périphérique de volontaires sains.....	73
I.2.2 -	Cellules amygdaliennes.....	74
I.3 -	Les cellules répondantes.....	74
I.4 -	Isolement des cellules.....	75
I.4.1 -	Principe .....	75
I.4.2 -	Matériel.....	76
I.4.3 -	Réactifs.....	76
I.4.4 -	Méthode.....	76
II -	EXPLORATIONS PHENOTYPIQUES ET FONCTIONNELLES EN CYTOMETRIE DE FLUX .....	77
II.1 -	Cytométrie de flux.....	77
II.1.1 -	Principe .....	77
II.2 -	Immunophénotypage des LLC-B .....	80
II.2.1 -	Principe .....	80
II.2.2 -	Matériel.....	80
II.2.3 -	Réactifs.....	81
II.2.4 -	Méthode.....	83
II.3 -	Etude de l'expression des TLRs.....	88
II.3.1 -	Principe .....	88
II.3.2 -	Matériel.....	88
II.3.3 -	Réactifs.....	88
II.3.4 -	Méthodes .....	89
II.4 -	Stimulation des cellules B saines et pathologiques via des ligands de TLRs ..	92
II.4.1 -	Matériel.....	93
II.4.2 -	Réactifs.....	93
II.4.3 -	Méthode.....	94
II.5 -	Analyse immunophénotypique des cellules B saines et tumorales stimulées ..	94
II.5.1 -	Principe .....	94
II.5.2 -	Matériel.....	95
II.5.3 -	Réactifs.....	95
II.5.4 -	Méthode.....	97

II.6 -	Analyses morphologiques .....	97
II.6.1 -	<i>Principe</i> .....	97
II.6.2 -	<i>Matériel</i> .....	98
II.6.3 -	<i>Réactifs</i> .....	98
II.6.4 -	<i>Méthode</i> .....	98
II.7 -	Evaluation de la prolifération des cellules stimulées .....	98
II.7.1 -	<i>Principe</i> .....	98
II.7.2 -	<i>Matériel</i> .....	100
II.7.3 -	<i>Réactifs</i> .....	100
II.7.4 -	<i>Méthode</i> .....	100
II.8 -	Evaluation de l'apoptose .....	101
II.8.1 -	<i>Principe</i> .....	101
II.8.2 -	<i>Matériel</i> .....	103
II.8.3 -	<i>Réactifs</i> .....	103
II.8.4 -	<i>Méthode</i> .....	103
II.9 -	Evaluation de la sécrétion de cytokines par les différentes suspensions cellulaires stimulées ou non .....	106
II.9.1 -	<i>Principe</i> .....	106
II.9.2 -	<i>Matériel</i> .....	107
II.9.3 -	<i>Réactifs</i> .....	107
II.9.4 -	<i>Méthode</i> .....	107
II.10 -	Etude fonctionnelle : réaction mixte leucocytaire .....	109
II.10.1 -	<i>Principe</i> .....	109
II.10.2 -	<i>Matériel</i> .....	109
II.10.3 -	<i>Réactifs</i> .....	110
II.10.4 -	<i>Méthode</i> .....	110
III -	ANALYSES STATISTIQUES .....	113
<b>RESULTATS.....</b>		<b>114</b>
I -	ETUDE DE L'EXPRESSION DES TLRs .....	115
I.1.1 -	<i>Etude de l'expression des TLRs au niveau de lymphocytes B normaux.....</i>	115
I.1.2 -	<i>Etude de l'expression des TLRs au niveau des cellules B de LLC-B.....</i>	118
II -	EFFET DE LA STIMULATION DES CELLULES B SAINES ET TUMORALES	

VIA TLR-4.....	124
II.1 - Stimulation des cellules B amygdaliennes via TLR-4 .....	124
II.1.1 - Etude morphologique .....	125
II.1.2 - Etude immunophénotypique .....	127
II.2 - Stimulation des cellules B de LLC-B via TLR-4 .....	129
II.2.1 - Etude morphologique .....	129
II.2.2 - Etude immunophénotypique .....	131
III - EFFET DE LA STIMULATION DES CELLULES B SAINES ET TUMORALES VIA TLR-7 .....	133
III.1 - Stimulation des cellules B amygdaliennes via TLR-7 .....	133
III.1.1 - Etude morphologique .....	133
III.1.2 - Etude immunophénotypique .....	135
III.1.3 - Etude de l'apoptose .....	138
III.1.4 - Etude de la prolifération .....	139
III.2 - Stimulation des cellules B de LLC-B via TLR-7 .....	141
III.2.1 - Etude morphologique .....	142
III.2.2 - Etude immunophénotypique .....	143
III.2.3 - Etude de l'apoptose .....	146
III.2.4 - Etude de la prolifération .....	148
IV - EFFET DE LA STIMULATION DES CELLULES B SAINES ET TUMORALES VIA TLR-9 .....	151
IV.1 - Stimulation des cellules B amygdaliennes via TLR-9 .....	151
IV.1.1 - Etude morphologique .....	152
IV.1.2 - Etude immunophénotypique .....	153
IV.1.3 - Etude de l'apoptose .....	156
IV.1.4 - Etude de la prolifération .....	157
IV.2 - Stimulation des cellules B de LLC-B via TLR-9 .....	159
IV.2.1 - Etude morphologique .....	159
IV.2.2 - Etude immunophénotypique .....	161
IV.2.3 - Etude de l'apoptose .....	164
IV.2.4 - Etude de la prolifération .....	165
V - EVALUATION DE LA SECRETION DE CYTOKINES .....	167



V.1 -	Dosage des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales palatines	169
V.2 -	Dosage des cytokines dans les surnageants de culture de cellules B de LLC	172
V.3 -	Comparaison des sécrétions de cytokines obtenues dans les surnageants de culture de cellules B saines et tumorales.....	175
VI -	ETUDE FONCTIONNELLE : REACTION MIXTE LEUCOCYTAIRE .....	179
VI.1 -	Etude de la prolifération de lymphocytes T naïfs allogéniques en culture mixte avec les cellules B amygdaliennes .....	179
VI.2 -	Etude de la prolifération de lymphocytes T naïfs allogéniques en culture mixte avec les cellules B tumorales .....	183
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>186</b>
	<b>CONCLUSIONS-PERSPECTIVES .....</b>	<b>215</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>219</b>
	<b>PUBLICATIONS .....</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

β2m.....	β2 microglobuline
ADCC.....	Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity
AMPc .....	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 .....	Activator Protein-1
ARNm .....	ARN messenger
ASK1 .....	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATF .....	Activation Transcription Factor
ATM.....	Ataxia Telangiectasia Mutated
BCR.....	B-Cell Receptor
CAP .....	Cyclophosphamide/Adriamycine/Cisplatine
CDC.....	Complement Dependent Cytotoxicity
CFDA-SE .....	carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester)
CFSE .....	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CHOP .....	Cyclophosphamide/Adriamycine/Vincristine/ Prednisone
CMH.....	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA .....	Cellule Présentatrice d' Antigène
CpG .....	Deoxyribo-Cytidine-Phosphate-Guanosine
CREB .....	Cyclic AMP-Response Element-Binding Protein
CTL .....	Cytotoxic T Lymphocyte
CVP .....	Cyclophosphamide/Vincristine/Prednisone
DAG.....	diacylglycérol
DD .....	Death Domain
DLI .....	Donor Lymphocyte Infusion
DNA-PK.....	DNA-dependent protein kinase
ECD.....	Phycoerythrin-texas red
Ecsit.....	Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathways
EDTA .....	Ethyl Diamine Tétra Acétate
ELISA.....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK.....	Extracellular signal-Regulated Kinase
ES .....	Erreur Standard

FasL.....	Fas ligand
FC .....	Fludarabine/Cyclophosphamide
FCCam .....	Fludarabine/Cyclophosphamide/alemtuzumab
FCR .....	Fludarabine/Cyclophosphamide/Rituximab
FISH .....	Fluorescence In Situ Hybridization
FITC .....	Fluorescein Isothiocyanate
FLT-3 .....	Fms-Like Tyrosine kinase 3
FS .....	Forward Scatter
GPI .....	glycosylphosphatidylinositol
GSK-3.....	Glycogen Synthase Kinase-3
GVHD .....	Graft Versus Host Disease
GVL.....	Graft Versus Leukemia
GVT.....	Graft Versus Tumor
HLA.....	Human Leukocyte Antigen
HMGB1 .....	High mobility group box 1 protein
HSP.....	Heat Shock Protein
HSV .....	Herpes Simplex Virus
IκB .....	Inhibitor-κB
IFN .....	Interféron
Ig .....	Immunoglobuline
IGFBP-1 .....	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1
IgSF .....	Immunoglobulin Superfamily
IgVH.....	Immunoglobulin Variable Heavy chain
IKK.....	Inhibitor-κB Kinase
IKK-i .....	Inducible IκB Kinase
IL .....	Interleukine
IL-1R .....	Interleukin-1 Receptor
IP3 .....	Inositol triphosphate
IRAK .....	IL-1 Receptor-Associated Kinase
IRF .....	Interferon Regulatory Factor
ISGF .....	IFN-Stimulated Gene Factor
ISRE .....	IFN-Stimulated Response Elements
IwCLL .....	International Working Group on CLL
JNK.....	c-Jun N-terminal Kinase
LBP.....	Lipopolysaccharide Binding Protein
LFA .....	Lymphocyte Function Associated antigen
LLC .....	Leucémie Lymphoïde Chronique
LNH.....	Lymphome Non-Hodgkinien

LPS .....	Lipopolysaccharide
LRR .....	Leucine Rich Repeats
Mal .....	MyD88-adapter-like
MALP-2 .....	Macrophage-Activating Lipopeptide-2
MAP Kinase ou MAPK.....	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK ou MEK.....	MAPK Kinase
MAPKKK ou MEKK.....	MAPK Kinase Kinase
MFI.....	Moyenne d'Intensité de Fluorescence
mi-ARN .....	micro-ARN
mTOR.....	mammalian Target Of Rapamycin
MyD88 .....	Myeloïd Differentiation factor 88
NAK .....	NF-κB-Activating Kinase
NCI/WG .....	National Cancer Institute/Working Group
NEMO .....	NF-κB Essential Modulator
NF-κB.....	Nuclear Factor-κB
ODN .....	Oligodéoxynucléotide
OMS .....	Organisation Mondiale de la Santé
PAMPs .....	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC.....	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
PC-5/7.....	Phycoerythrine Cyanin-5/7
PE .....	Phycoérythrine
PI3K .....	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
PIP2 .....	Phosphatidyl Inositol biphosphate
PIP3 .....	Phosphatidyl Inositol triphosphate
PKB/C .....	Protéine Kinase B/C
PKC .....	Protein Kinase C
PLC.....	Phospholipase C
PMA .....	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
Poly I:C .....	Polyriboinosinic:Polyribocytidylic Acid
PRR .....	Pathogen Recognition Receptor
RANK.....	Receptor Activator of NF-κB
REAL .....	Revised European-American Lymphoma classification
RHIM .....	Rip Homotypic Interaction Motif
RKIP.....	RAF Kinase Inhibitor Protein
SARM.....	Sterile α and HEAT–Armadillo motifs
SCF.....	Stem Cell Factor

SP-A .....	Protéine du Surfactant Pulmonaire A
SS .....	Side Scatter
STAT .....	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF.....	Sérum de Veau Fœtal
TAB.....	TAK1-Binding protein
TAK.....	TGF- $\beta$ -Activated Kinase
TBK1 .....	TANK-binding kinase 1
TCR .....	T-Cell Receptor
TGF- $\beta$ .....	Transforming Growth Factor- $\beta$
TI .....	Thymo-Indépendant
TICAM.....	TIR-Containing Adaptor Molecule
TIR .....	Toll/IL-1R/R
TIRAP .....	TIR domain-containing Adapter Protein
TK .....	Tyrosine Kinase
TLR .....	Toll-Like Récepteur
TNF .....	Tumor Necrosis Factor
TPA .....	12-O-tétradécanoylphorbol-13-ester
Tpl2 .....	Tumor progression locus kinase 2
TR1 .....	T regulatory cell 1
TRAF.....	TNF-Receptor Associated Factor
TRAIL .....	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRIF .....	TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-beta
TUNEL.....	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP-digoxigenin Nick End Labelling
Ubc13 .....	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
Uev1A .....	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Variant 1
XIAP.....	Xlinked Inhibitor of Apoptosis Protein

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	: Frottis sanguin caractéristique d'une LLC-B.....	20
Figure 2	: Schématisation du développement des lymphocytes B .....	26
Figure 3	: Représentation schématique d'une synapse immunologique entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène.....	44
Figure 4	: Schématisation de la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T mémoires et lymphocytes T effecteurs.....	46
Figure 5	: Schématisation de l'orientation de la réponse immunitaire adaptative vers un profil Th1 ou Th2 .....	48
Figure 6	: Structure des TLRs.....	57
Figure 7	: Schématisation des voies MyD88 dépendantes aboutissant à l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPKs.....	60
Figure 8	: Schématisation des voies de signalisation des MAPKs .....	62
Figure 9	: Schématisation des voies de signalisation impliquant IRF-7 .....	64
Figure 10	: Schématisation des voies de signalisation impliquant TLR-3 et TLR-4 et aboutissant à l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPKs.....	65
Figure 11	: Schématisation de la production d'interféron de type I via IRF-3 et IRF-7 .....	66
Figure 12	: Séparation des lymphocytes d'une suspension cellulaire par gradient de Ficoll-Hypaque.....	76
Figure 13	: Représentation schématique du système de la fluorescence du cytomètre de flux .....	78
Figure 14	: Principe de détection du "Forward Scatter" (FS) et du "Side Scatter" (SS).....	79
Figure 15	: Exemple d'histogrammes biparamétriques utilisés pour l'immunophénotypage des lymphocytes B tumoraux par double marquage CD19/CD5 .....	84
Figure 16	: Exemple d'histogrammes monoparamétrique et biparamétriques utilisés pour l'immunophénotypage des lymphocytes T par quadruple marquage.....	86
Figure 17	: Exemple d'histogrammes biparamétrique et monoparamétrique utilisés pour l'immunophénotypage des cellules de LLC-B par simple marquage direct et indirect. ....	87
Figure 18	: Exemple d'histogrammes biparamétriques et monoparamétrique utilisés pour l'étude du profil d'expression des différents TLRs au niveau des lymphocytes B CD19+ sains et tumoraux. ....	91
Figure 19	: Exemple d'histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l'étude du profil d'expression des TLRs au niveau des cellules B CD19+CD5- et CD19+	

CD5+ .....	92
Figure 20 : Représentation schématique des différentes étapes du marquage des cellules avec le CFSA-DE.....	99
Figure 21 : Exemples d’histogrammes biparamétrique et monoparamétrique utilisés pour l’étude de la prolifération après marquage par le CFSE des suspensions cellulaires stimulées ou non .....	101
Figure 22 : Représentation schématique du principe de la méthode TUNEL .....	102
Figure 23 : Exemples d’histogrammes biparamétrique et monoparamétrique utilisés pour l’étude de l’apoptose des suspensions cellulaires de LLC-B et amygdaliennes stimulées ou non .....	104
Figure 24 : Exemples d’histogrammes biparamétrique et monoparamétrique générés pour évaluer l’apoptose des cellules B saines et pathologiques .....	105
Figure 25 : Exemples d’histogrammes biparamétrique et monoparamétrique générés pour évaluer l’apoptose des cellules T .....	105
Figure 26 : Représentation schématique du principe de la technique d’analyse d’interleukines par la technologie FlowCytomix (Bender MedSystems). .....	106
Figure 27 : Exemple d’histogramme biparamétrique utilisé pour discriminer des deux populations de billes utilisées pour le dosage des cytokines dans les surnageants de culture des suspensions cellulaires stimulées ou non .....	108
Figure 28 : Exemple de profil de distribution des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture .....	108
Figure 29 : Exemples d’histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l’étude de la prolifération de cellules T allogéniques dans une réaction mixte lymphocytaire.....	112
Figure 30 : Profil d’expression des TLRs en cytométrie de flux au niveau des cellules B CD19+ du sang périphérique de sujets témoins sains .....	116
Figure 31 : Profil d’expression des TLRs au niveau des cellules B CD19+ du sang périphérique de sujets témoins .....	117
Figure 32 : Profil d’expression des TLRs au niveau des cellules B CD19+ d’amygdales palatines .....	118
Figure 33 : Profil d’expression des TLRs au niveau des cellules B CD19+ de patients atteints de LLC-B .....	119
Figure 34 : Exemple d’histogrammes biparamétriques utilisés pour l’étude du profil d’expression des TLR-7, -9 et -10 au niveau des cellules B CD19+CD5- et CD19+ CD5+ dans des échantillons de sujets contrôles et de patients atteints de LLC-B .....	121
Figure 35 : Expression de TLR-7, TLR-9 et TLR-10 au niveau des cellules B CD19+ CD5- de sujets sains et de patients atteints de LLC-B .....	122

Figure 36	: Expression de TLR-7, TLR-9 et TLR-10 au niveau des cellules B CD19+ CD5+ de sujets sains et de patients atteints de LLC-B .....	123
Figure 37	: Morphologie des cellules B amygdaliennes après stimulation ou non avec du PMA ou du LPS .....	126
Figure 38	: Expression des molécules de présentation et costimulation sur des cellules B amygdaliennes stimulées ou non par du PMA ou du LPS .....	128
Figure 39	: Morphologie des cellules tumorales de LLC-B après stimulation ou non avec du PMA ou du LPS .....	130
Figure 40	: Expression des molécules de présentation et costimulation sur des cellules B de LLC stimulées ou non par du PMA ou du LPS.....	132
Figure 41	: Morphologie des cellules B amygdaliennes après stimulation ou non via TLR-7 .....	134
Figure 42	: Expression des molécules de présentation et costimulation au niveau des cellules B amygdaliennes stimulées ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837.....	137
Figure 43	: Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les cellules d'amygdales palatines stimulées ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837.....	139
Figure 44	: Etude de la prolifération des cellules B amygdaliennes stimulées ou non par du PMA ou avec l'imiquimod R837 .....	140
Figure 45	: Etude du nombre absolu de cellules amygdaliennes présentes dans les puits de culture après stimulation via TLR-7.....	141
Figure 46	: Morphologie des cellules tumorales de LLC après stimulation ou non via TLR-7 .....	143
Figure 47	: Expression des molécules de présentation et costimulation au niveau des cellules B de LLC-B stimulées avec l'imiquimod R837.....	145
Figure 48	: Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les cellules B de LLC-B stimulées ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837.....	147
Figure 49	: Comparaison de l'apoptose évaluée par la méthode TUNEL au niveau des lymphocytes B et des lymphocytes T.....	148
Figure 50	: Etude de la prolifération des cellules B tumorales stimulées ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837 .....	149
Figure 51	: Etude du nombre absolu de cellules tumorales présentes dans les puits de culture après stimulation ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837 .....	150
Figure 52	: Morphologie des cellules amygdaliennes après stimulation via TLR-9 .....	152
Figure 53	: Expression des molécules de présentation et costimulation au niveau des cellules amygdaliennes stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG.....	155
Figure 54	: Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les cellules B d'amygdales palatines stimulées ou non avec du PMA ou les ODN CpG M362.....	157



Figure 55	: Etude de la prolifération des cellules B d'amygdales palatines stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG M362 .....	158
Figure 56	: Morphologie des cellules amygdaliennes après stimulation via TLR-9 .....	160
Figure 57	: Expression des molécules de présentation et costimulation sur des cellules B de LLC-B stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG et GpC M362 .....	163
Figure 58	: Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les cellules B tumorales stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG et GpC M362.....	164
Figure 59	: Etude de la prolifération des cellules B de LLC-B stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG M362.....	165
Figure 60	: Analyse du nombre absolu de cellules présentes dans les puits après stimulation des cellules B tumorales via TLR-9 .....	166
Figure 61	: Exemple de gamme standard de dilution obtenue pour l'interleukine-2 .....	168
Figure 62	: Exemple de profil de distribution des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture .....	169
Figure 63	: Expression des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales palatines .....	171
Figure 64	: Expression des cytokines dans les surnageants de culture de LLC-B .....	174
Figure 65	: Concentrations relatives des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales et de LLC stimulés avec du PMA.....	176
Figure 66	: Concentrations relatives des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales et de LLC stimulés avec les ODN CpG M362 .....	178
Figure 67	: Concentrations relatives des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales et de LLC stimulés avec l'imiquimod R837.....	177
Figure 68	: Exemple de profils obtenus par cytométrie de flux pour l'étude de la prolifération de cellules T allogéniques en co-culture avec des lymphocytes B amygdaliens stimulés ou non.....	180
Figure 69	: Prolifération allogénique des lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs en réponse aux cellules B de LLC-B stimulées ou non.....	182
Figure 70	: Prolifération allogénique des lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs en réponse aux cellules B amygdaliennes stimulées ou non .....	184
Figure 71	: Mécanismes induits par le PMA et aboutissant à la survie cellulaire .....	190
Figure 72	: Représentation schématique des mécanismes à l'origine de l'activité pro-apoptotique de l'imiquimod .....	195
Figure 73	: Représentation schématique des effets induits par les différents types d'ODN CpG sur les cellules du système immunitaire humain .....	199
Figure 74	: Représentation schématique de l'implication de la voie PI3K ou DNA-PK / Akt dans la survie cellulaire .....	202

Figure 75 : Représentation schématique des différentes réponses activées après stimulation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par différents types d'ODN CpG ..... 205

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Classification anatomopathologique des lymphomes B selon l’OMS (d’après Harris, 2000) .....	14
<b>Tableau 2</b>	Comparaison des critères de diagnostic de la LLC-B selon NCI/WG et IwCLL (d’après Cheson, 1996) .....	19
<b>Tableau 3</b>	Système de scoring de Matutes (d’après Matutes, 1994).....	21
<b>Tableau 4</b>	Classification de Rai (d’après Rai, 1975).....	22
<b>Tableau 5</b>	Classification de Binet (d’après Binet, 1981) .....	23
<b>Tableau 6</b>	Les ligands endogènes des TLRs (adapté de Tsan, 2004).....	56
<b>Tableau 7</b>	Liste des anticorps monoclonaux utilisés pour l’immunophénotypage des patients atteints de LLC-B.....	82
<b>Tableau 8</b>	Anticorps monoclonaux utilisés pour l’immunophénotypage des suspensions cellulaires stimulées .....	96
<b>Tableau 9</b>	Expression des TLRs au niveau des cellules B normales du sang périphérique et d’amygdales palatines et au niveau de cellules B de LLC. ....	120
<b>Tableau 10</b>	Exemple de courbe étalon obtenue pour l’interleukine-2 .....	168

# **SITUATION DU SUJET**

# **I - LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE B OU LLC-B**

## **I.1 - Définition**

La LLC-B est une hémopathie lymphoïde chronique définie par l'accumulation lente et progressive, dans la moelle osseuse, le sang périphérique, la rate, les ganglions et le foie, de petits lymphocytes B néoplasiques d'aspect mature et d'origine monoclonale.

## **I.2 - Epidémiologie et étiologie**

La LLC-B est la plus fréquente des leucémies dans les pays occidentaux. Elle représente en effet 22 à 30% de toutes les leucémies de l'adulte (Redaelli, 2004).

Dans les pays occidentaux, 95% des LLC sont des LLC-B alors qu'en Asie, les LLC-T prédominent (Rozman, 1995). En Europe, les hommes sont quasiment deux fois plus touchés que les femmes (Oscier, 2004) mais cette différence s'estompe avec l'âge en passant à un ratio de 1:1 chez les patients âgés de plus de 75 ans (Hernandez, 1995). La LLC-B est essentiellement une maladie du sujet âgé et l'âge médian des patients diagnostiqués est de 72 ans (Ries, 2007). Elle est très rare avant 40 ans mais son incidence augmente rapidement avec l'âge (Montserrat, 1995). Entre 2000 et 2004, l'incidence annuelle de la LLC-B était d'environ 3.7/100 000 habitants aux Etats-Unis (Ries, 2007). Son incidence est à la hausse depuis les 20 dernières années en raison d'une pratique plus fréquente d'examen sanguins et de l'amélioration des tests diagnostiques. Ainsi, la proportion de patients diagnostiqués à un stade précoce de la maladie est passée de 30% à 60% (Kalil, 1999). Toutefois, la majorité des patients étant asymptomatiques, l'incidence réelle de la LLC-B ne peut pas être déterminée de façon précise.

La cause de survenue d'une LLC-B est inconnue (Rozman, 1995), mais des facteurs de susceptibilité génétique ont été incriminés en raison de l'incidence élevée de LLC-B familiales (Montserrat, 1995 ; Yuille, 2000).

La fréquence de la LLC-B est variable selon les régions : elle est plus faible en Asie avec un taux de 2.5% au Japon et en Chine alors qu'elle est de 38% au Danemark (Dighiero, 1991). Ces différences de fréquence seraient dues à des facteurs génétiques plutôt qu'à des facteurs environnementaux. En effet, une étude a montré qu'un Japonais résidant à Hawaï n'avait pas plus de risque d'être atteint de LLC-B qu'un Japonais résidant au Japon (Yanagihara, 1989). Les pesticides, les radiations ionisantes, les carcinogènes, le régime alimentaire, les agents alkylants, l'hépatite C et le virus Epstein Barr ont tous été suspectés comme pouvant être en relation avec la survenue d'une LLC-B mais aucune corrélation n'a été réellement mise en évidence (Redaelli, 2004).

### **I.3 - Classification**

La classification de l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) (Harris, 2000) place la LLC-B dans le groupe des lymphomes non-hodgkiniens (LNH) en raison du fait qu'elle se développe, comme la majorité de ces derniers, à partir de lymphocytes B matures. Ce système de classification résulte d'un projet collaboratif entre l'Association Européenne d'Hématologie et la Société Américaine d'Hémathologie et correspond à une mise à jour de la classification REAL (Revised European American Lymphoma) (Harris, 1994) par l'OMS. Il s'agit de la première classification consensuelle à l'échelle mondiale. Cette classification divise les hémopathies lymphoïdes selon qu'elles doivent leur origine aux lymphocytes B, T ou NK (Natural Killer). Elle tend à être plus physiopathologique, cherchant à identifier la contrepartie normale de chaque type tumoral. Ainsi, elle organise ces lymphomes selon le stade de différenciation de l'équivalent ou contrepartie normale des cellules tumorales : lymphocytes précurseurs (thymiques ou lymphoblastiques) ou périphériques (matures ou post-thymiques) (tableau 1).

**Tableau 1** Classification anatomopathologique des lymphomes B selon l’OMS (d’après Harris, 2000)

---

## Lymphomes B

---

### Cellules B précurseurs

Lymphome/leucémie B lymphoblastique

### Proliférations B matures (périphériques)

Leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B)/lymphome lymphocytaire

Leucémie prolymphocytaire

Lymphome lymphoplasmocytaire

Lymphome splénique de la zone marginale (+/- cellules villeuses)

Leucémie à tricholeucocytes

Myélome/plasmocytome

Lymphome extraganglionnaire de la zone marginale de type MALT

Lymphome de la zone marginale ganglionnaire (+/- monocytoïde)

Lymphome folliculaire

Lymphome à cellules du manteau

Lymphomes diffus à grandes cellules B

- lymphome à grandes cellules médiastinales
- lymphome à grandes cellules intravasculaires
- lymphome des séreuses

Lymphome de Burkitt/leucémie de Burkitt

---

Cette classification intègre, au sein de chaque catégorie, l’ensemble des données morphologiques, phénotypiques, génétiques et cliniques acquises ces dernières décennies, et présente donc l’avantage de fournir une liste actualisée des entités anatomo-cliniques de lymphomes, fréquentes ou rares, actuellement reconnues.

## I.4 - Signes cliniques

Il est à noter que dans 25% des cas, les patients sont asymptomatiques au moment du

diagnostic. La maladie, totalement latente, est alors découverte par la pratique d'un hémogramme systématique (Abbott, 2006). Quand ils sont présents, les symptômes les plus souvent rencontrés sont peu spécifiques. Les patients peuvent ainsi présenter une asthénie, une pesanteur abdominale liée à un syndrome tumoral ou un syndrome anémique. De plus, à l'examen, 87% des patients peuvent présenter des adénopathies, 54% une splénomégalie et, dans 14% des cas, une hépatomégalie (Abbott, 2006).

## **I.5 - Evolution**

L'évolution de la LLC-B est variable, souvent indolente pendant de longues années, en particulier dans les stades précoces de la maladie.

### **I.5.1 - Complications hématologiques**

#### *∞ Cytopénies*

Une anémie et/ou une thrombocytopénie peuvent être observées à un stade avancé chez 15% des patients (Kalil, 1999). Ces cytopénies sont le plus souvent d'origine auto-immune mais elles peuvent également être la conséquence d'une baisse de production de la moelle hématopoïétique due à un envahissement médullaire ou encore à une hémodilution dans le cas d'hypersplénisme (Dighiero, 1991). La survenue de telles complications auto-immunes aggrave le pronostic car elle impose souvent une prise en charge thérapeutique (corticoïdes, splénectomie) majorant le risque infectieux.

#### *∞ Transformation en lymphomes*

Une évolution des formes plus agressives, en particulier le développement d'un lymphome (syndrome de Richter) ou la transformation en leucémie prolymphocytaire sont décrits chez 15% des patients (Kalil, 1999).

Les patients développant une transformation prolymphocytaire présentent des cytopénies et une splénomégalie. L'examen cytologique retrouve de plus des prolymphocytes à côté des lymphocytes typiques de la LLC-B (O'Brien, 1995). Ces prolymphocytes correspondent à de grands lymphocytes matures avec un cytoplasme modérément basophile et volumineux, un nucléole central bien visible et leur nombre augmente progressivement : au



delà de 55%, on parle de leucémie lymphoïde à prolymphocytes.

Le syndrome de Richter survient dans 3 à 10% des cas au stade terminal de la LLC-B. Il se caractérise par une aggravation des signes généraux et le développement rapide d'une grosse masse tumorale dont la biopsie révèle le caractère lymphomateux (Dighiero, 1991). Il s'agit le plus souvent d'un lymphome dit "agressif" (B diffus à grandes cellules) et beaucoup plus rarement d'une maladie de Hodgkin.

### I.5.2 - Complications infectieuses

Des infections surviennent dans 50% des cas, particulièrement dans les stades avancés de la maladie. Souvent sévères, elles constituent la cause la plus fréquente de morbidité et de mortalité des LLC-B. Elles sont favorisées par le déficit de l'immunité cellulaire, la présence d'une hypogammaglobulinémie et les neutropénies provoquées par l'évolution de la maladie ou l'administration de certains traitements tels que les immunosuppresseurs ou les corticoïdes. Ces infections sont essentiellement bactériennes et affectent l'appareil respiratoire, la peau et l'appareil urinaire. Les septicémies sont assez fréquentes et d'autres organes peuvent être touchés. Ces infections peuvent également être virales : les plus fréquentes sont dues aux virus herpès *Herpes simplex* ou virus varicelle zona. Les infections mycobactériennes ou fongiques sont moins fréquentes (Binet, 1997).

### I.5.3 - Cancers associés

Le risque d'apparition d'un cancer chez les sujets porteurs de LLC-B est plus important que chez des sujets témoins du même âge et du même sexe, avec une incidence de 6 à 15%. Les cancers de la peau sont les plus fréquents mais d'autres tumeurs peuvent survenir, en particulier le cancer du poumon et du côlon. Le groupe coopérateur français a rapporté, chez les patients à des stades précoces traités par un agent alkylant au long cours, une augmentation significative des cancers épithéliaux par rapport à des patients non traités (Binet, 1997).

## I.6 - Biologie des cellules B tumorales

La LLC-B est une maladie se traduisant par l'accumulation de petits lymphocytes B matures. Les études réalisées n'ont pas montré de taux important de prolifération de ces cellules qui sont, dans plus de 99% des cas, bloquées en phase Go/G1 du cycle cellulaire (Caligaris-Cappio, 2002).

Des travaux ont toutefois récemment montré que la LLC-B n'était pas une maladie statique résultant uniquement de l'accumulation de lymphocytes avec une durée de vie prolongée mais correspondait plutôt à un processus dynamique composé également de cellules qui prolifèrent puis meurent, assurant ainsi le renouvellement du clone (Messmer, 2005).

L'accumulation des cellules B malignes proviendrait d'une augmentation de leur durée de vie, liée à une altération de la mort cellulaire programmée de ces cellules tumorales (Dighiero, 2005). Les mécanismes de ce défaut d'apoptose ne sont pas encore complètement élucidés. Dans 90% des LLC-B, la protéine anti-apoptotique bcl-2 est surexprimée, sans que cela ne résulte d'une translocation chromosomique t(14;18) comme dans le cas des lymphomes folliculaires (Kalil, 1999). Cette surexpression est due à une hypométhylation du promoteur du gène bcl-2 entraînant son inactivation (Hanada, 1993) observée chez une partie des patients (Robertson, 1996 ; Pepper, 1997). Son rôle dans l'inhibition de l'apoptose n'est toutefois pas complètement élucidé puisque aucune corrélation n'a été observée entre l'apoptose observée *in vitro* et les taux d'expression de bcl-2 (Dighiero, 2005).

Récemment, des études ont montré le rôle des micro-ARNs dans l'inhibition de l'apoptose de la LLC-B. Les micro-ARNs (mi-ARNs) sont des petits ARNs fonctionnels simple brin non codants qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes à un niveau post-transcriptionnel en interagissant avec leur ARN messager (ARNm) cible (Valencia-Sanchez, 2006).

Ainsi, il a été montré que les miARN-15a et miARN-16-1, situés au niveau du chromosome 13q14, sont délétés ou sous-régulés dans 65% des LLC-B (Calin, 2002). L'expression de ces deux mi-ARNs serait inversement corrélée à l'expression de bcl-2 par une régulation négative de bcl-2 à un niveau post-transcriptionnel. Ils agiraient donc comme des gènes suppresseurs dont les mutations engendreraient par conséquent une surexpression de bcl-2. De plus, cette répression de bcl-2 par les mi-ARNs induirait l'apoptose dans un

modèle de lignée cellulaire (Cimmino, 2005). Toutefois, ces résultats sont controversés. Il a été rapporté que les miARN-15a et miARN-16-1 ne seraient sous-régulés que dans 11% des LLC-B (Fulci, 2007). De plus, une étude récente a également montré que ces deux mi-ARNs ne se comporteraient pas comme des gènes suppresseurs de tumeurs et ne réguleraient pas l'expression de bcl-2 que ce soit à un niveau transcriptionnel ou traductionnel (Linsley, 2007).

Il a également été rapporté que l'expression des miARN-29b et miARN-181b, sous-régulés dans les formes agressives de LLC-B, réguleraient Tcl-1, leur expression étant inversement corrélée à celle de Tcl-1 (Pekarsky, 2006). Ce dernier est un oncogène activateur de la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt, qui joue un rôle primordial dans la survie cellulaire et qui est surexprimé dans les formes agressives de LLC-B (Pekarsky, 2000 ; Laine, 2000).

D'autres travaux se sont focalisés sur l'implication de cette voie PI3K/Akt (Datta, 1999) dans le défaut d'apoptose des cellules tumorales de LLC-B. Ainsi, il a été montré que la protéine PI3K est constitutivement activée dans les cellules B tumorales de LLC-B et qu'une inhibition spécifique de cette kinase augmente l'apoptose de ces cellules (Ringshausen, 2002). De plus, il a récemment été proposé que Akt pourrait être activée indépendamment de la PI3K, via la protéine kinase C PKC $\beta$  et ainsi contribuer à la survie des cellules B de la LLC. Par ailleurs, ces auteurs ont également rapporté que le mitogène PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) inhibe l'apoptose des lymphocytes B de LLC, *ex vivo*, via la PKC $\beta$  (Barragan, 2006).

La dérégulation des gènes du cycle cellulaire pourrait également contribuer à l'accumulation des cellules malignes en phase G0/G1. Des taux importants de la protéine p27Kip1, un inhibiteur de kinases dépendantes du cycle cellulaire, ont été rapportés chez la majorité des patients. Si l'on considère le rôle clé que joue cette protéine dans la progression du cycle cellulaire, sa surexpression dans les cellules B de LLC-B pourrait être responsable de leur accumulation en phase G0/G1 (Vrhovac, 1998).

De plus, les cytokines produites et sécrétées directement par les cellules B de LLC, telles que le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) et l'interleukine-8 (IL-8), ainsi que l'IL-2, qui est produite par les lymphocytes T et "absorbée" par les cellules B tumorales via des récepteurs spécifiques, affectent la survie et la prolifération de ces cellules B de façon autocrine et paracrine (Kalil, 1999).

## I.7 - Facteurs pronostiques

### I.7.1 - Critères de diagnostic positif

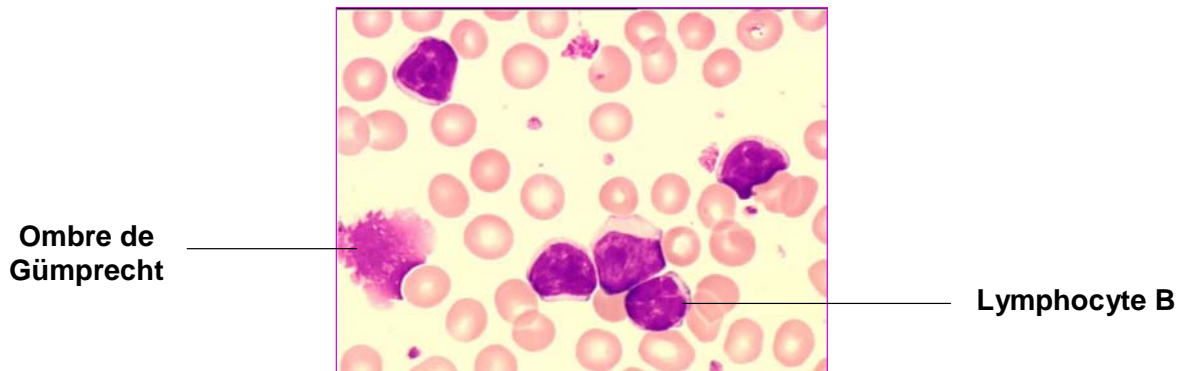
Le "National Cancer Institute/Working Group" (NCI/WG) et l'"International Working Group on CLL" (IwCLL) ont élaboré des critères de diagnostic pour la LLC-B ainsi que des critères de réponse aux traitements (Cheson, 1996) (tableau 2).

**Tableau 2** Comparaison des critères de diagnostic de la LLC-B selon NCI/WG et IwCLL (d'après Cheson, 1996)

	NCI/WG	IwCLL
<b>Lymphocytose (g/l)</b>	> 5	a) > ou égal à 10 et phénotype de type B ou infiltration médullaire b) <10 et phénotype de type B + infiltration médullaire
<b>Cellules atypiques</b>	< 55%	Non établi
<b>Durée de la lymphocytose</b>	> ou égal à 2 mois	Non établi
<b>Présence de lymphocytes dans la moelle osseuse</b>	> ou égal à 30%	> 30%
<b>Classification</b>	Rai (combiné avec Binet)	IwCLL
<b>Traitements</b>	Masse tumorale volumineuse, maladie en progression	Stade A : lymphocytose > à 50 G/l Temps de doublement < 12 mois Profil diffus de la moelle Stade B et C : tous les patients

Le diagnostic de LLC-B repose sur l'analyse cytologique et immunophénotypique des cellules lymphoïdes circulantes. Une lymphocytose de plus de 5 G/L composée majoritairement de petits lymphocytes monomorphes, présentant un noyau arrondi, un cytoplasme très restreint, une chromatine dense parfois mottée, un nucléole absent ou de petite taille, associés à la présence de "noyaux nus" ou "ombres de Gümprecht" traduisant la

fragilité des lymphocytes tumoraux après étalement sur lame, sont caractéristiques de la LLC-B (figure 1).



**Figure 1** : Frottis sanguin caractéristique d'une LLC-B

L'étude de la moelle osseuse par aspiration ou biopsie doit montrer, lorsqu'elle est réalisée, une infiltration de plus de 30% de la moelle (Cheson, 1996).

### I.7.2 - Immunophénotype des cellules B de la LLC-B

L'analyse immunophénotypique est fondamentale pour un diagnostic positif. Les cellules B de la LLC-B présentent un immunophénotype caractéristique défini par l'expression de CD19 associé à un ou plusieurs autres marqueurs de la lignée B : CD20, CD21, CD23, CD24 et CD79a. L'expression de CD23 est un élément diagnostique important, permettant de différencier les LLC d'autres syndromes lymphoprolifératifs B.

Ces cellules B co-expriment CD5, initialement décrit comme un marqueur spécifique des cellules T, mais qui est également exprimé par environ 10 à 25% des lymphocytes B normaux du sang (Kipps, 1989). Cependant, il est à noter que 5% des LLC-B sont CD5 négatives (Cartron, 1998).

De plus, l'immunophénotypage de la LLC-B se démarque par la faible expression des immunoglobulines membranaires ou de surface (SmIg). Il s'agit le plus souvent d'IgM, parfois d'IgD, souvent des deux isotypes associés comme dans les lymphocytes B naïfs. Les isotypes gamma ou alpha (IgG ou IgA) sont exceptionnels. Par ailleurs, en raison de la

clonalité des lymphocytes, une seule chaîne légère est exprimée (kappa ou lambda) (Montserrat, 1995).

Enfin, ces cellules expriment faiblement ou pas du tout CD79b (McCarron, 2000) et CD22 et l'épitope particulier de CD20 reconnu par l'anticorps FMC7 (Matutes, 1994) est en général négatif alors qu'il est positif dans les leucémies à tricholeucocytes, prolymphocytaires ou dans certains lymphomes (Matutes, 1994 ; Rothe, 1996).

Ces caractéristiques immunophénotypiques permettent d'établir le score proposé par Estella Matutes et qui porte son nom (Matutes, 1994) (0 à 5 points). En fonction du score, on peut orienter le diagnostic vers une leucémie lymphoïde chronique (score égal à 4 ou 5), ou vers un autre syndrome lymphoprolifératif (score faible) (tableau 3).

**Tableau 3** Système de scoring de Matutes (d'après Matutes, 1994)

Marqueur	Score de Matutes	
	1 point	0 point
Intensité Ig de surface	faible	modérée ou élevée
CD5	positif	négatif
CD23	positif	négatif
FMC7	négatif	positif
CD22/CD79b	faible/négatif	modéré/fort

Le score varie de 0 à 5.

Un score élevé (supérieur ou égal à 4) est en faveur d'une LLC-B.

### I.7.3 - Classifications de Rai et de Binet

Le taux de survie des patients atteints de LLC-B est fortement variable. Pour certains

patients, la maladie n'évolue jamais, et ils décèdent de causes qui n'ont aucun lien avec la maladie alors que d'autres peuvent mourir rapidement des complications liées à la maladie dans les mois qui suivent le diagnostic, en dépit d'un traitement thérapeutique approprié (Kalil, 1999).

Au cours des trois dernières décennies, le principal progrès dans le traitement de la LLC-B a été de mieux définir le pronostic individuel de chaque patient et de bien identifier les malades nécessitant un traitement d'emblée. Deux classifications anatomo-cliniques sont couramment utilisées afin de déterminer les principaux critères de décision thérapeutique dans la LLC-B. Il s'agit de la classification de Rai (Rai, 1975) et de celle de Binet (Binet, 1981).

La classification de Binet est plutôt utilisée en Europe alors que celle de Rai est préférée aux Etats-Unis. Les paramètres pris en compte sont le syndrome tumoral superficiel, l'anémie et la thrombopénie.

La classification originale de Rai permet la stratification pronostique des patients en 5 stades (stades 0 à IV) mais a été par la suite modifiée en une classification en 3 catégories de risque (risque faible, risque intermédiaire et haut risque) avec des médianes de survie très différentes (tableau 4) (Rai, 1987).

**Tableau 4** Classification de Rai (d'après Rai, 1975)

		<b>Description</b>	<b>Survie moyenne (en années)</b>
<b>Stade 0</b>	Risque faible	Lymphocytose sanguine et médullaire	>15
<b>Stade I</b>	Risque intermédiaire	Lymphocytose et adénopathies	9
<b>Stade II</b>	Risque intermédiaire	Lymphocytose et splénomégalie et/ou hépatomégalie	7
<b>Stade III</b>	Risque élevé	Lymphocytose et anémie (Hémoglobine < 11g/dL)	5
<b>Stade IV</b>	Risque élevé	Lymphocytose et thrombocytopénie (Plaquettes < 10 <sup>9</sup> /L)	5

Ainsi, les stades 0 (médiane de survie supérieure à 10 ans) et I (médiane de survie supérieure à 8 ans) sont d'évolution lente compatible avec une vie normale, le stade II (médiane de survie de 6 ans) correspond à un pronostic intermédiaire et les stades III (médiane de survie de 2 ans) et IV (médiane de survie de moins de 2 ans) sont de mauvais pronostic.

La classification de Binet (tableau 5), quant à elle, distingue trois groupes de patients avec des pronostics différents : les patients à pronostic favorable (stade A) correspondant à 63% des patients ont une survie médiane supérieure à 10 ans, et ceux à pronostic intermédiaire (stade B), représentant 28% des patients, une médiane de survie de 6 ans. Les patients à risque défavorable (stade C) ont un pronostic sombre, avec une survie médiane de 60 mois et correspondent à 9% des patients.

**Tableau 5** Classification de Binet (d'après Binet, 1981)

	Nombre d'aires ganglionnaires atteintes*	Formule sanguine	Survie moyenne (en années)
<b>Stade A</b>	< 3 aires	Hémoglobine > 100 g/L Plaquettes > 100 x 10 <sup>9</sup> /L	>10
<b>Stade B</b>	> ou égal à 3 aires	Hémoglobine > 100 g/L Plaquettes > 100 x 10 <sup>9</sup> /L	7
<b>Stade C</b>	Indifférent	Hémoglobine < 100 g/L et/ou Plaquettes < 100 x 10 <sup>9</sup> /L	5

\* maximum = 5 aires [ganglionnaire cervical, axillaire ou inguinale (que l'atteinte soit unilatérale ou bilatérale), rate ou foie]

Cependant, ni la classification de Rai, ni celle de Binet, ne permettent d'identifier, parmi les malades de bon pronostic, ceux pour lesquels la maladie restera indolente et ceux dont la maladie va progresser rapidement et qui pourraient bénéficier d'un traitement précoce (Shanafelt, 2004). Ces modèles pronostiques anatomo-cliniques classiquement utilisés en pratique courante pour évaluer le profil évolutif de patients porteurs de LLC-B s'avèrent donc



aujourd'hui insuffisants, d'autant plus que 80% des patients sont diagnostiqués aux stades précoces de la maladie (Byrd, 2004). Il est par conséquent fondamental de disposer, dès le diagnostic, de critères qui permettent d'évaluer le risque individuel de progression afin de pouvoir proposer une stratégie thérapeutique dont les modalités découlent de l'évaluation de ce pronostic. L'hétérogénéité de la population des patients au stade A rend cette recherche d'autant plus nécessaire et devrait pouvoir déboucher sur l'identification des patients dont le pronostic est plus défavorable et qui pourraient bénéficier d'un traitement précoce.

## **I.8 - Nouveaux facteurs pronostiques**

### **I.8.1 - Cytogénétique**

Les analyses cytogénétiques conventionnelles de la LLC-B sont limitées par la faible activité mitotique des cellules leucémiques *in vitro* empêchant l'obtention d'un nombre de cellules en métaphase suffisant pour réaliser la technique des bandes. Cette méthode permet de détecter des anomalies génétiques dans environ 40 à 50% des cas (Juliussen, 1990). Le développement des techniques d'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH) a amélioré cette détection. Des anomalies chromosomiques récurrentes ont ainsi pu être détectées dans 82% des cas de LLC-B par FISH sur noyaux en interphase (Döhner, 2000).

Plus récemment; il a été proposé de stimuler les cellules de LLC-B avec des oligodéoxynucléotides (ODN) contenant des dinucléotides CpG non méthylés combinés avec de l'IL-2 pour augmenter le nombre de mitoses et l'analyse cytogénétique conventionnelle (Dicker, 2006) en raison de travaux antérieurs qui ont montré que cette association induit la prolifération des cellules B de LLC-B (Decker, 2000a et 2000b ; Decker, 2002).

Döhner et al. (2000) ont identifié, sur la base des anomalies cytogénétiques, 5 groupes pronostiques indépendants, avec dans un ordre péjoratif croissant :

- la délétion de 13q14 : il s'agit de l'anomalie la plus fréquente ; elle concerne 55% des patients. Elle est associée aux formes plutôt indolentes et est de bon pronostic (médiane de survie de 133 mois).
- l'absence d'anomalie cytogénétique détectée chez 18% des patients (médiane de survie de 114 mois).

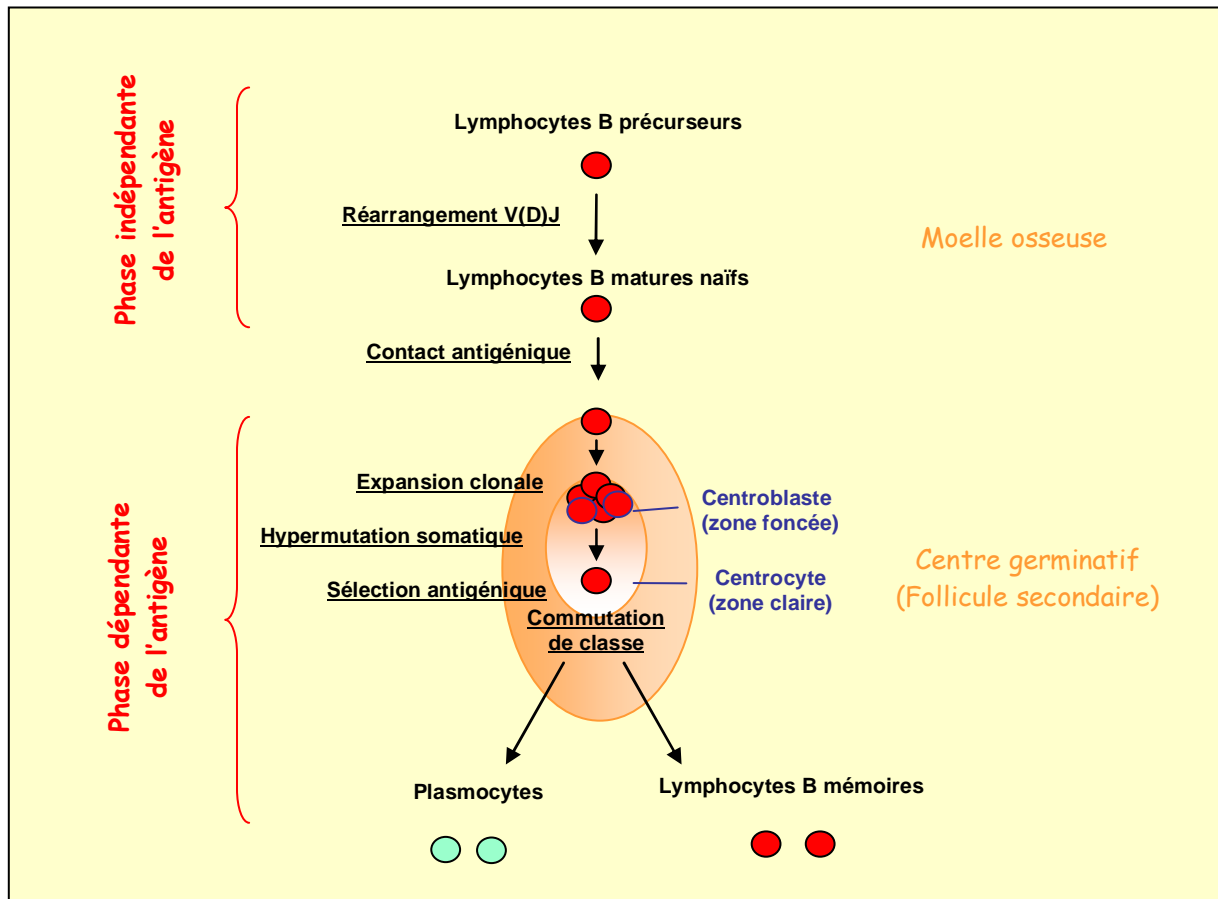
- la trisomie 12 est retrouvée chez 16% des patients (médiane de survie de 111 mois), et dans la moitié des LLC atypiques.
- la délétion 11q22-23 incluant le gène ATM (ataxia telangiectasia mutated) qui correspond à un oncogène et qui concerne 18% des patients (médiane de survie de 79 mois), est de mauvais pronostic et est associée à des formes tumorales qui nécessitent rapidement un traitement.
- la délétion 17p impliquant le gène codant pour la protéine p53 concerne toujours des formes graves, et est retrouvée chez 7% des patients (médiane de survie de 32 mois). Cette délétion semble être prédictive d'un état réfractaire aux agents alkylants (Morabito, 1997) et/ou aux analogues des purines (Döhner, 1995). Un traitement spécifique tels que des corticoïdes à fortes doses, des anticorps anti-CD52 ou une éventuelle allogreffe est d'ailleurs actuellement proposé à ces patients.

Ces anomalies peuvent être acquises au cours de l'évolution de la maladie caractérisant le caractère pronostique très péjoratif à court terme (Shanafelt, 2006).

Récemment, il a été rapporté la présence d'une insertion de 6 à 18 nucléotides au niveau du promoteur de Mcl-1 chez 30% des malades, insertion non observée chez les témoins. Cette anomalie pourrait être associée à une augmentation de Mcl-1, tant au niveau des ARNm que de la protéine (Moshynska, 2004).

## I.8.2 - Hypermutations somatiques

Les mutations somatiques des régions variables des gènes des immunoglobulines résultent d'un processus d'affinement et de maturation de leur spécificité vis-à-vis de l'antigène. Ce mécanisme correspond à l'introduction au hasard de mutations ponctuelles dans les régions variables des gènes. Ces mutations somatiques apparaissent au stade de centroblaste et ont lieu uniquement au sein du centre germinatif. En outre, ce processus complète le remaniement VDJ des gènes des immunoglobulines enclenché lors des étapes de sélection au sein du centre germinatif (figure 2).



**Figure 2** : Schématisation du développement des lymphocytes B (adapté de Sagaers, 2003)

Deux sous-catégories présentant des différences de survie ont ainsi été identifiées au sein de la LLC-B selon la présence ou non d'hypermutations somatiques dans la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (Hamblin, 1999 ; Damle, 1999). Ainsi, les patients présentant des hypermutations somatiques au niveau des gènes IgVH ont un pronostic favorable, avec une médiane de survie de 25 ans au sein des stades A, alors qu'en l'absence de mutations somatiques, les patients ont un pronostic défavorable, avec une survie médiane des stades A de 8 ans, résultat confirmé par plusieurs analyses multivariées (Oscier, 2002 ; Kröber, 2002 ; Maloum, 2000).

Ces résultats suggèrent que la LLC-B est une maladie hétérogène dont deux types peuvent être identifiés par la biologie et les facteurs de pronostic associés. Dans les LLC-B de bon pronostic, la population lymphocytaire B exprimerait des gènes mutés codant pour les immunoglobulines et correspondrait à la prolifération d'une cellule B ayant eu un contact préalable avec l'antigène dans le centre germinatif. Elle serait donc d'origine post-germinale.

Au contraire, dans les LLC-B de mauvais pronostic, la transformation surviendrait dans une cellule B naïve, n'ayant jamais rencontré l'antigène et ne présentant pas de mutation au niveau des gènes codant pour les immunoglobulines c'est à dire d'origine pré-germinale (Hamblin, 1999 ; Damle, 1999 ; Maloum, 2000).

Toutefois, cette séparation de la LLC-B en deux entités distinctes va à l'encontre de données qui plaident en faveur d'une maladie unique : la morphologie et l'immunophénotype du lymphocyte B malin ne sont pas différents, que les gènes des immunoglobulines soient ou non mutés, les altérations de l'expression du récepteur B pour l'antigène (ou BCR pour B cell receptor), la surexpression de bcl-2 et de p27Kip1 sont communes aux deux formes. Des études récentes du profil des gènes exprimés par les lymphocytes B LLC-B en microarray soutiennent l'idée que tous les cas de LLC-B auraient une origine commune ou suivraient un processus commun de transformation maligne (Dighiero, 2002).

La valeur pronostique du statut mutationnel apparaît être un élément puissant, fiable et stable dans le temps chez un même sujet. Cependant, sa détermination fait appel à une technique longue, difficile et coûteuse, difficilement accessible à des laboratoires de routine hospitalière. La nécessité d'identifier un ou des marqueurs substituts s'est donc rapidement imposée.

### I.8.3 - CD38

Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type II, dotée d'une activité enzymatique qualifiée d'NAD glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase ou encore ADP-ribose cyclique hydrolase, impliquée donc dans le métabolisme de l'ADP.

La molécule CD38 est exprimée sur les lymphocytes T, B et NK ([http://www.sciencegateway.org/resources/prow/guide/4279266\\_g.htm](http://www.sciencegateway.org/resources/prow/guide/4279266_g.htm)). Sa présence a également été rapportée sur les monocytes, au niveau desquels elle peut s'associer avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II et jouer le rôle de co-récepteur dans l'activation des cellules T induites par les superantigènes (Zilber, 2000).

Les cellules lymphoïdes B expriment cet antigène de membrane à plusieurs stades non contigus de leur différenciation. Ainsi, cette glycoprotéine transmembranaire est fortement exprimée en particulier au niveau des précurseurs médullaires, des cellules du centre germinatif et des plasmocytes. Elle est en revanche absente de la membrane des lymphocytes

matures. Son rôle est incomplètement élucidé et paradoxal : dans la moelle, il bloque la prolifération médullaire des précurseurs lymphoïdes, alors qu'il les maintient en survie dans le centre germinatif (Deaglio, 2003).

Initialement, une corrélation a été observée entre l'expression de CD38, étudiée en cytométrie de flux, et le caractère non muté de la LLC-B (Damle, 1999). Les patients sans hypermutations somatiques tendraient à exprimer CD38 alors que ceux qui présentent des hypermutations n'exprimeraient que partiellement CD38, sur moins de 30% des lymphocytes malins. Cependant, il existe une discordance dans environ un tiers des cas. Plusieurs études multivariées ont en effet montré que l'expression de CD38 n'est pas systématiquement corrélée au degré de mutation IgVH (Hamblin, 2000 ; Hamblin, 2002 ; Kröber, 2002 ; Zucchetto, 2005 ; Degan, 2004). D'autre part, le seuil de positivité et la valeur pronostique indépendante de ce facteur restent controversés. Enfin, l'expression de CD38 varie avec le temps chez un même patient et notamment après traitement (Hamblin, 2002 ; Kröber, 2002). L'ensemble de ces arguments empêche de retenir CD38 comme marqueur de substitution des IgVH. Néanmoins, en analyse univariée, CD38 montre une valeur pronostique puisque sa positivité définit une catégorie de patients de pronostic défavorable (Ibrahim, 2001 ; Hamblin, 2002 ; Lin, 2002).

#### I.8.4 - Zap 70

Beaucoup plus récemment, l'étude du profil d'expression génique de la LLC-B a permis de montrer que la protéine Zap 70 (Zap pour Zeta-chain (TCR) Associated Protein) était exprimée dans certaines cellules de LLC-B (Rosenwald, 2001) et pourrait être un autre paramètre de substitution à la recherche du statut mutationnel IgVH.

Zap 70, qui est une tyrosine kinase de la famille Syk, intervient dans la signalisation des lymphocytes T après stimulation du récepteur des cellules T (Kane, 2000). Cette kinase est exprimée, à l'état normal, dans les cellules T et NK (Chan, 1992). Son expression a également récemment été détectée, chez la souris, à des taux plus faibles que ceux observés dans les lymphocytes T normaux, au niveau des cellules B spléniques ainsi qu'au niveau des cellules B immatures et plus particulièrement aux stades pro-B (progéniteurs B) et pré-B (précurseurs B) de la lymphopoïèse B (Schweighoffer, 2003).

La protéine Zap 70 peut être phosphorylée et activée, après stimulation du BCR des

cellules de LLC. Une fois activée, elle peut coopérer avec Syk, une tyrosine kinase intervenant à l'état normal, au niveau du signal de transduction du BCR, favorisant ainsi la prolifération des cellules B tumorales (Chen, 2002). Les mécanismes à l'origine de l'expression anormale de Zap 70 dans les cellules B de LLC-B ne sont pas complètement élucidés.

Des travaux ont par ailleurs montré que l'expression de Zap 70 est clairement reliée au caractère muté ou non d'IgVH dans les LLC-B. La signification pronostique de l'expression de Zap70 a été démontrée dans plusieurs études, avec une évolution plus péjorative pour les LLC-B Zap 70+ (Wiestner, 2003 ; Crespo, 2003 ; Orchard, 2004). Il a également été rapporté que la valeur pronostique de l'expression de Zap 70 apparaît supérieure à celle du statut mutationnel IgVH (Rassenti, 2004).

Ainsi, la détermination de l'expression de Zap 70 par PCR (polymerase chain reaction) ou cytométrie de flux pourrait remédier aux difficultés de l'analyse du gène IgVH. Toutefois, l'analyse en PCR doit être réalisée sur des lymphocytes B de LLC soigneusement purifiés, afin d'éliminer des signaux issus des cellules T ou NK. Par ailleurs, la détection par cytométrie de flux, qui permet de se dispenser de cette séparation nécessite néanmoins une technique de marquage intracellulaire, et a été réalisée avec des anticorps différents dans les équipes ayant publié sur cette recherche. Le développement de nouveaux anticorps, plus discriminants, et l'évolution des stratégies d'expression des résultats laissent espérer prochainement une standardisation aboutissant à une meilleure reproductibilité inter-laboratoires.

### I.8.5 - Autres facteurs biologiques

On assiste à l'émergence de nouveaux facteurs pronostiques biologiques, dont l'intérêt demande pour certains à être confirmé et qui doivent faire l'objet d'études multivariées.

Les marqueurs de prolifération que sont les taux sériques de thymidine kinase (TK) et de  $\beta 2$  microglobuline ( $\beta_2m$ ), le temps de doublement de la lymphocytose ou encore le raccourcissement des télomères, reflet du nombre total de divisions, constituent des paramètres biologiques prometteurs comme facteurs prédictifs de l'évolution de la maladie.

### ∞ *Thymine kinase*

La thymidine kinase est une enzyme cellulaire impliquée dans la réparation de l'ADN lors de sa synthèse. Cette enzyme intracellulaire contrôle la phosphorylation de la déoxythymidine en déoxythymidine monophosphate, ensuite incorporée sous forme triphosphate dans l'ADN. L'activité de la TK sérique des patients atteints de LLC-B est probablement liée au nombre de cellules tumorales en division, reflétant ainsi la masse tumorale et le taux de prolifération des cellules B malignes (Montillo, 2005). Un taux sérique de TK élevé est effectivement associé à une survie diminuée et constitue un facteur prédictif de progression dans les stades A. En effet, dans ces formes indolentes, l'augmentation de la thymidine kinase précède de plusieurs mois la progression de la maladie (Hallek, 1999).

### ∞ *Bêta 2 microglobuline*

La  $\beta_2m$  est une protéine extracellulaire de la superfamille des immunoglobulines, associée de façon non-covalente aux chaînes alpha transmembranaires des molécules du CMH de classe I exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées. Elle peut également être détectée sous forme soluble dans le sérum. Un taux sérique élevé de  $\beta_2m$  est associé à une survie diminuée (Keating, 1998). L'augmentation du taux sérique de la  $\beta_2m$  est un indicateur pronostique assez parallèle à celui de la thymidine kinase mais semble indépendant de cette dernière. De plus, l'augmentation du taux sérique de la  $\beta_2m$  est un indicateur pronostique qui semble indépendant des autres paramètres (Hallek, 1996). Toutefois, des résultats discordants ont été rapportés (Molica, 1999).

### ∞ *Le doublement de la lymphocytose*

Montserrat et al. (1986) ont rapporté une médiane de survie de 118 mois pour les patients ayant un faible temps de doublement de la lymphocytose alors que pour les patients avec un taux de doublement rapide, la médiane de survie était de 61 mois. En outre, un temps de doublement inférieur à 6 mois, quel que soit le taux des lymphocytes sanguins, est considéré comme un critère de maladie "active" justifiant la mise en route d'un traitement (Cheson, 1996 ; Oscier, 2004).

Parmi les autres paramètres pronostiques utiles, il faut mentionner le CD23 sérique.

## ∞ *CD23 sérique*

L'antigène CD23 est une glycoprotéine transmembranaire de type II avec une région C-terminale extracellulaire de type C-lectine. Il s'agit du récepteur de faible affinité pour la partie constante des IgE, également connu sous le nom de FcεRII. Deux formes d'épissage alternatif de CD23, FcεRIIa/CD23A et FcεRIIb/CD23B ont été décrites. CD23A est exprimé sur les lymphocytes B matures et la forme B est exprimée sur les monocytes/macrophages, les plaquettes, les cellules dendritiques folliculaires, les éosinophiles, certaines cellules T et une sous-population de cellules épithéliales thymiques (Lees, 1998).

La forme soluble de CD23 résulte du clivage de cet antigène membranaire et son taux sérique est une variable pronostique corrélée à la survie des cellules de LLC-B : les LLC CD23- qui s'accompagnent d'un taux important de CD23 soluble sont caractérisées par un pronostic péjoratif. De plus, chez les patients de stade A, une ascension rapide des taux de CD23 sérique prédit la progression de la maladie (Sarfati, 1996).

Tous ces marqueurs biologiques permettent d'anticiper l'évolution de la LLC-B au diagnostic et très vraisemblablement, dans un avenir proche, de stratifier les traitements en fonction de ces marqueurs (Montillo, 2005). Ceci devrait permettre de ne pas sur-traiter des patients ayant un bon pronostic, en particulier les stades A "paisibles", mais également de ne pas sous-traiter d'autres stades A qui vont évoluer rapidement. Pour les LLC-B plus agressives, les nouveaux facteurs pronostiques permettront de définir des sous-populations de patients devant être traités lourdement (intensification thérapeutique) (Shanafelt, 2004) et d'autres qui pourront bénéficier d'une chimiothérapie conventionnelle. Cependant et selon les recommandations de l'IwCLL, ces facteurs pronostiques "modernes" ne doivent pas être pris en compte en dehors de protocoles prospectifs visant à démontrer leur pertinence.

## **I.9 - Traitements**

### **I.9.1 - Indications thérapeutiques pour le stade A**

Pour les patients au stade A de Binet, l'évolution de la maladie est en général lente et la médiane de survie est identique à celle de la population générale de même âge. Aussi, il existe



actuellement un consensus pour ne pas traiter ces malades. La comparaison entre l'administration de chlorambucil et une abstention thérapeutique dans les stades A ne montre aucune différence de survie (Dighiero, 1998 ; French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia, 1990 ; Shustik, 1988 ; CLL Trialists' Collaborative Group, 1999). Cette attitude s'applique autant aux sujets les plus jeunes qu'aux personnes plus âgées, sous réserve d'une surveillance clinique (adénopathies et splénomégalie) et biologique (numération formule sanguine) régulière. Le NCI/WG a publié des recommandations pour l'initiation du traitement (Cheson, 1996). La mise en route d'un traitement spécifique peut être envisagée en cas :

- de progression de la maladie vers un stade B ou C,
- d'apparition de symptômes cliniques (perte de poids, fièvre...),
- d'augmentation importante (supérieure à 30 ou 40 g/L) et/ou rapide (doublement du nombre de lymphocytes dans le sang en moins de 6 mois) de la lymphocytose,
- du développement de pathologies auto-immunes (anémie hémolytique auto-immune ou purpura thrombopénique),
- d'infections récurrentes.

Actuellement, les essais thérapeutiques visent à mieux caractériser les patients stade A évolutifs en fonction des nouveaux critères pronostiques (statut mutationnel, génétique,...) et à évaluer alors la mise en route rapide d'une immunochimiothérapie.

## I.9.2 - Indications thérapeutiques pour les stades B et C

Pour les malades de stade B ou C, un traitement est généralement proposé d'emblée. Il n'existe cependant pas encore de consensus sur les modalités optimales de traitement et le choix dépend de la stratégie à long terme et de l'âge du malade.

Actuellement, chez les sujets jeunes ou pouvant tout du moins supporter un traitement relativement lourd, l'objectif thérapeutique est l'obtention d'une rémission la plus complète possible (définie avec les nouveaux outils d'évaluation comme la cytométrie de flux 4 ou 6 couleurs). En effet, comme cela a été démontré dans les pathologies lymphomateuses, plusieurs éléments tels que des études rétrospectives ou des analyses de sous groupes laissent présager que l'obtention d'une rémission complète se traduit par une augmentation de la survie. En 2005, l'association fludarabine, cyclophosphamide et anticorps monoclonal anti-

CD20 constitue le traitement de première ligne permettant d'obtenir le meilleur taux de rémission complète (Keating, 2005).

Pour les sujets plus âgés et/ou ne pouvant supporter un tel traitement, le contrôle des symptômes sans entraîner de toxicité trop importante semble être un objectif raisonnable (Abbott, 2004).

### I.9.3 - Traitement de première intention

#### ∞ *Monochimiothérapie*

Les agents alkylants tels que le chlorambucil et le cyclophosphamide agissent en établissant des liaisons covalentes avec l'ADN. Ceci aboutit, par la formation de ponts entre les chaînes d'ADN qui ne peuvent donc plus être séparées, à l'inhibition de la réplication et de la transcription des régions d'ADN concernées et par conséquent à la mort cellulaire par apoptose.

Le chlorambucil est l'agent alkylant le plus largement utilisé en monothérapie, en traitement de première ligne. Le taux de réponse varie de 60 à 70% mais les rémissions complètes sont rares (Flinn, 1996), la rémission complète étant définie par la disparition des signes cliniques et en particulier des signes généraux et la normalisation de l'hémogramme.

Les corticoïdes comme la prednisone sont fréquemment utilisés en association à la chimiothérapie mais leur activité anti-tumorale n'a jamais été démontrée dans la LLC-B et un traitement combinant chlorambucil et prednisone ne semble pas améliorer la survie par rapport à un traitement avec du chlorambucil seul (Flinn, 1996).

Le cyclophosphamide est également utilisé mais essentiellement en association avec les analogues des purines tels que la fludarabine.

#### ∞ *Les analogues de purines*

Les analogues de purines font partie d'une grande classe de médicaments anticancéreux appelés métabolites qui, contrairement aux agents alkylants, agissent de manière spécifique sur les cellules qui prolifèrent. Les analogues de purines interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques pendant la phase S du cycle cellulaire.

La fludarabine correspond à l'analogue de purines le plus utilisé comme traitement de

seconde ligne. Il s'agit d'un analogue de l'adénine qui inhibe l'adénosine désaminase.

L'apport des analogues des purines a modifié la prise en charge de la LLC-B. Initialement indiqué comme traitement de seconde ligne ou en cas de résistance aux alkylants (Johnson, 1996 ; Rai, 2000 ; Leporrier, 2001), la fludarabine est désormais, en association avec le cyclophosphamide, le traitement de référence en première ligne.

Toutefois, dans certains cas, la fludarabine induit un déficit immunitaire T prolongé avec une lymphopénie CD4 exposant ainsi les malades à des infections opportunistes ainsi que des anémies hémolytiques auto-immunes.

### ∞ Polychimiothérapie

Plusieurs associations de chimiothérapies de type "lymphome" constituées d'alkylants, de corticoïdes et d'anthracyclines ont été évaluées dans la LLC-B lors d'essais thérapeutiques. Plusieurs molécules peuvent être associées au cyclophosphamide :

- la vincristine qui est un poison du fuseau cellulaire : il s'agit d'un anti-mitotique capable de bloquer ainsi la dynamique du fuseau mitotique le long duquel migrent les chromosomes et d'arrêter les cellules en métaphase.
- la doxorubicine et l'adriamycine qui sont des anthracyclines : il s'agit de molécules s'intercalant dans la double hélice d'ADN entre 2 bases adjacentes au niveau du complexe formé entre l'ADN et la topoisomérase II, une enzyme provoquant des cassures doubles brins provisoires au niveau de l'ADN. Ceci aboutit à la stabilisation des coupures double-brins, au blocage des fonctions de l'enzyme et à la mort cellulaire.
- le cisplatine est un autre agent alkylant : c'est une molécule plane capable de se glisser entre deux paires de bases d'ADN. La double hélice d'ADN est alors déformée, la transcription et la réplication bloquées.

On parle alors de polychimiothérapie de type CVP (Cyclophosphamide / Vincristine / Prednisone) ou CHOP (Cyclophosphamide / Adriamycine (doxorubicine/hydroxydoxorubicine) / Vincristine (Oncovin) / Prednisone), qui est un traitement de première ligne de référence, ou CAP (Cyclophosphamide / Adriamycine / Prednisone). Toutefois, aucune de ces polychimiothérapies n'a montré sa supériorité au chlorambucil (French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia, 1990 ; CLL Trialists' Collaborative Group, 1999).

Par contre, Eichhorst et al (2006) ont rapporté l'avantage de l'association fludarabine et

cyclophosphamide par rapport à la fludarabine utilisée seule en terme de réponse complète et globale.

### ∞ *Les anticorps monoclonaux*

#### • **Anticorps anti-CD20**

La molécule CD20 est une phosphoprotéine non-glycosylée qui fonctionne en tant que canal calcique en formant des homo-oligomères et qui pourrait également être mise en jeu dans la formation d'autres canaux ioniques (Lees, 1998). La molécule CD20 est un marqueur spécifique des lymphocytes B. Elle est en effet exprimée du stade pré-B jusqu'au stade de lymphocyte B mature et activé. Elle n'est cependant pas exprimée à la surface des cellules souches hématopoïétiques, des cellules pro-B ni des plasmocytes. De plus, CD20 est présente sur les cellules de la plupart des lymphomes B non-hodgkiniens (Kalil, 1999). Ce marqueur constitue une cible thérapeutique idéale dans les lymphomes de type B car la reconstitution du répertoire B n'est pas perturbée si on injecte l'anticorps anti-CD20.

L'anticorps monoclonal anti-CD20 humanisé (rituximab, Mabthera®) est un anticorps monoclonal chimérique spécifique du CD20 humain. Cet anticorps est formé des régions variables d'un anticorps murin anti-CD20 fusionné avec des fragments constants d'une chaîne lourde humaine IgG-1 associés à une chaîne légère  $\kappa$ . La portion Fc de l'IgG humaine a été sélectionnée pour sa capacité à fixer le complément et entraîner une cytotoxicité de type CDC (Complement Dependent Cytotoxicity) en sus de sa reconnaissance par les récepteurs Fc-gamma dans le cadre de l'ADCC (Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity).

Cet anticorps est très efficace dans le traitement des lymphomes folliculaires, mais semble moins efficace dans le traitement des LLC-B. En effet, lorsqu'il est utilisé en monothérapie, cet anticorps monoclonal ne permet d'obtenir que des taux de réponse modérés avec des rémissions de courte durée chez des patients en rechute (Nguyen, 1999) ce qui pourrait être expliqué par une expression moins importante de CD20 sur les LLC-B par rapport aux lymphomes folliculaires non-hodgkiniens (Kalil, 1999). L'utilisation du rituximab a toutefois permis d'obtenir des taux de réponse plus importants pour les patients non traités par rapport aux patients ayant rechuté, bien que le taux de réponses complètes reste faible (Liu, 2004). Par ailleurs, il a été mis en évidence que son utilisation à des doses plus fortes augmente le taux de réponse avec toutefois un coût financier important (Keating, 2002). Il faut également noter que d'autres anticorps monoclonaux dirigés contre CD20 font actuellement l'objet d'un développement industriel majeur.

- **Anticorps anti-CD52**

La molécule CD52 est une très petite protéine constituée de 12 acides aminés, accrochée à la surface cellulaire par une liaison GPI (glycosylphosphatidylinositol), et assez fortement glycosylée. Les anticorps anti-CD52 sont extrêmement efficaces pour induire une lyse cellulaire médiée par le complément. Ce marqueur est présent à la surface de nombreuses cellules hématopoïétiques, notamment les lymphocytes B et T périphériques, normaux et malins (Salisbury, 1994) ainsi qu'à la surface des cellules NK, des monocytes, des macrophages et des éosinophiles (Lundin, 2004). Cependant, ses effets toxiques sur le développement des progéniteurs médullaires in vitro sont inexistantes (Gilleece, 1993). Cet anticorps constitue donc une arme idéale pour le traitement des LLC-B puisque les lymphocytes provenant de sujets atteints de LLC-B expriment constamment et fortement CD52.

L'alemtuzumab (Mabcampath®) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'antigène CD52. Il s'agit d'un anticorps chimérique généré par la fusion des régions variables d'un anticorps monoclonal de rat d'isotype IgG2a avec une immunoglobuline humaine de type IgG1κ (Hale, 2001). Il a été suggéré que l'alemtuzumab provoque une lyse des lymphocytes par ADCC, CDC et par activation du complément (Xia, 1993 ; Wing, 1996). Il a une efficacité majeure sur la composante hyperlymphocytaire périphérique, modérée au niveau de la moelle osseuse et de la rate, plus aléatoire sur les adénopathies (Bowen, 1997, Österborg, 1997).

Son usage est pour l'instant réservé aux patients réfractaires à la fludarabine et ayant reçu des alkylants (Moreton, 2003). Des taux de rémission moléculaire complète de l'ordre de 38% ont été obtenus avec l'alemtuzumab chez des patients réfractaires à la fludarabine (O'Brien, 2003 ; Lozanski, 2004).

En raison de la présence de CD52 au niveau des lymphocytes normaux, des lymphocytopenies durables concernant surtout les lymphocytes T CD4 sont observées chez tous les patients traités avec l'alemtuzumab ce qui augmente par conséquent les risques d'infection (Keating, 2002 ; Lundin, 2004).

- **Immunochimiothérapie**

Des essais thérapeutiques de phase III actuellement en cours, notamment en Europe, visent à évaluer l'association de ces anticorps monoclonaux à la Fludarabine et au

Cyclophosphamide (FC) comme traitement de première ligne. Ainsi, l'association Fludarabine / Cyclophosphamide et Rituximab (FCR) a déjà été rapportée par l'équipe du MD Anderson (Keating, 2005) comme la plus efficace en phase II.

#### I.9.4 - Greffes de cellules souches hématopoïétiques

Malgré l'avènement des analogues de purines ou des anticorps monoclonaux, le traitement de la LLC-B ne permet pas encore de guérison. Dans une population de patients répondant à des critères de sélection précis et admissibles à des protocoles de recherche, un traitement curatif peut être envisageable par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques ou autologues. Les autogreffes et allogreffes de cellules souches hématopoïétiques nécessitent au préalable une chimiothérapie très intensive dite de conditionnement et une irradiation corporelle totale. Elle a pour but d'assurer une immunosuppression suffisante du receveur afin d'éradiquer la maladie et d'empêcher le rejet du greffon.

La chimiothérapie laisse en effet persister des cellules leucémiques résiduelles, pouvant être des cellules chimiorésistantes, ou des cellules résidant dans des sanctuaires inaccessibles. Par ailleurs, la réémergence de la prolifération leucémique réduit sensiblement les chances de survie du patient. La greffe permet en partie de pallier à ces inconvénients, qui sont à l'origine de rechutes, après un traitement par chimiothérapie.

##### *∞ Les autogreffes de cellules souches hématopoïétiques*

Pour les malades pour lesquels une allogreffe est trop risquée ou impossible faute de donneurs, l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques médullaires ou périphériques est une alternative. Ces cellules sont prélevées chez le patient alors qu'il est en rémission complète et avant qu'il ne reçoive un traitement de chimiothérapie intensif.

L'autogreffe élimine le risque de réactions immunitaires, mais comporte un risque de contamination du prélèvement par des cellules tumorales. La sélection des cellules saines de la moelle autologue est obtenue par un traitement chimique visant à détruire les cellules malignes ou par une sélection positive des cellules souches au moyen d'anticorps monoclonaux.

Le statut de la maladie lors de la greffe et le nombre de lignes de traitement antérieurement reçues sont les deux facteurs principaux qui ont un impact sur la réponse obtenue après la greffe chez les patients atteints de LLC. Des rémissions moléculaires peuvent être obtenues chez certains patients après une greffe autologue et le taux de mortalité est moins important que pour la greffe allogénique. Toutefois, un taux de récurrence à 4 ans de 50% sans plateau dans la courbe de survie est observé (Byrd, 2004). Ces données suggèrent que la greffe autologue n'a pas d'effet curatif de la LLC-B, rendant ce traitement moins attrayant.

### ∞ *Les greffes allogéniques*

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques consiste à prélever des cellules souches d'un donneur compatible avec le patient. Ces cellules saines colonisent très rapidement la moelle du patient. Cependant, une réaction du greffon contre l'hôte (GVH) peut survenir lorsque les lymphocytes du donneur s'attaquent aux autres organes du patient.

Ces cellules souches peuvent être obtenues à partir de moelle osseuse, ou de sang périphérique, après mobilisation grâce à l'injection de facteurs de croissance hématopoïétiques, ou encore à partir de sang placentaire (ou sang de cordon).

Son efficacité est liée à la fois au conditionnement myéloablatif et à la réaction du greffon contre la tumeur (GVT ou graft-versus-tumour, GVL ou graft-versus leukemia). En permettant l'instauration d'une réponse immunitaire cytotoxique et d'une alloréactivité anti-leucémique, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques rend possible la perspective d'une guérison.

La possibilité d'éradication de la maladie est à mettre en balance avec un taux de rechute et un taux de morbidité/mortalité importants dans cette indication, notamment pour ce dernier en raison de la toxicité liée aux traitements, à l'incidence et à la sévérité de la GVHD ou aux infections (Gribben, 2007). Les résultats obtenus après conditionnement myéloablatif, reposant principalement sur des analyses de registre ou des données unicentriques, mettent en évidence une mortalité due à la transplantation de 17% à 44% à 5 ans et une survie sans progression de 30% à 71% à 5 ans. Après conditionnement dit atténué, les études portant sur des patients ayant reçu en moyenne 4 lignes de chimiothérapie avant la greffe montrent une mortalité liée à la transplantation plus faible (de 7% à 20% à 5 ans) et une survie sans progression de 44 à 75% à 5 ans (Michallet, 2003). Ces résultats mettent en avant la possibilité de guérir la LLC-B par transplantation allogénique et soulignent également que le contrôle de la maladie à long terme grâce à l'allogreffe est étroitement dépendant de la

présence ou de l'absence d'une GVHD chronique extensive dont l'incidence a augmenté avec les nouvelles techniques de greffe que sont les conditionnements à intensité réduite et l'utilisation de cellules souches hématopoïétiques sanguines (Michallet, 2003).

Afin de réduire la toxicité de ce type de technique et de potentialiser l'effet allogénique (GVL) dans cette maladie, les stratégies d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques après conditionnement à intensité réduite ou mini-allogreffes ont progressivement émergé, d'abord dans d'autres pathologies (Slavin, 2001 ; Carella, 2000 ; Childs, 1999 ; Badros, 2001). L'objectif est de favoriser l'émergence de l'effet GVL en réduisant les toxicités thérapeutiques. Plusieurs études pilotes ont démontré la faisabilité, la tolérance et l'efficacité de ce type de conditionnement (Khouri, 2001 ; McSweeney, 2001 ; Branson, 2002). Le développement récent de conditionnements immunosuppresseurs peu myéloablatifs laisse espérer une diminution de la toxicité de la procédure de greffe allogénique et l'extension de son indication à des malades plus âgés (Khouri, 1998). Elles sont actuellement en cours d'évaluation clinique mais les premières séries homogènes et importantes de patients rapportées dans la littérature suggèrent que les syndromes lymphoprolifératifs (parmi lesquels la LLC-B) chimiosensibles seraient une des meilleures indications (Khouri, 1998 ; Robinson, 2002 ; Morris, 2004).

Il est toutefois à noter que les allogreffes de cellules souches hématopoïétiques doivent être réalisées dans le cadre de protocoles d'études. En 2007 et 2008, seule une forme au pronostic très péjorative (délétion 17p) justifie d'envisager une allogreffe à conditionnement atténué comme traitement de première ligne.

## **II - CONTREPARTIE PHYSIOLOGIQUE DE LA LLC-B**

L'origine cellulaire de la LLC-B n'est pas claire et différentes hypothèses ont été proposées au cours des dernières années (Ghia, 2006). En raison de l'expression du marqueur CD5 au niveau des cellules tumorales de LLC-B, il a été suggéré que la contrepartie normale de ces cellules pourrait être les cellules B1 de la zone du manteau folliculaire (Dighiero, 2005).



La classification actuelle des lymphocytes B distingue des lymphocytes B1 et des lymphocytes B2. Cette classification a d'abord été élaborée à partir de l'étude exhaustive de modèles murins, puis a été appliquée par extension chez l'homme (Sagaert, 2003 ; Youinou, 1999). Les lymphocytes B2 correspondent aux lymphocytes B conventionnels et sont impliqués dans les réponses spécifiques aux antigènes nécessitant une coopération et l'aide des lymphocytes T-helper. Les cellules B1 jouent un rôle beaucoup plus précoce et plus rapide, dans l'immunité naturelle indépendante des lymphocytes T (Fagarasan, 2000). Ces cellules B1, désignées également comme cellules B "innées" (McHeyzer-Williams, 2003), sont subdivisées en deux sous-populations : les cellules B1-a qui expriment le marqueur CD5 et les cellules B-1b, exprimant uniquement l'ARNm codant pour la protéine CD5 (Sagaert, 2003).

Les cellules B1 de la zone du manteau folliculaire expriment CD23, sont négatives pour le marqueur CD38, coexpriment les immunoglobulines de type IgM et IgD et sont caractérisées par l'absence d'hypermutations somatiques dans la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (ou IgVH) (Dighiero, 2005).

Les cellules des LLC-B partagent avec ces cellules la coexpression de CD5 et de CD23. Cependant, il est apparu que dans 50 à 70% des cas, les patients présentent des hypermutations somatiques au niveau des gènes IgVH (Oscier, 1997 ; Fais, 1998). De plus, l'expression de CD38 prédomine parmi les patients ne présentant pas d'hypermutations somatiques (Damle, 1999).

Récemment, il a été suggéré que les cellules B de la zone marginale pourraient constituer la contrepartie normale des cellules leucémiques de la LLC-B (Chiorazzi, 2003; Chiorazzi, 2005). Au niveau fonctionnel, les cellules B humaines de la zone marginale pourraient être considérées comme les analogues murins des cellules B de la zone marginale et des cellules B1-a (Pillai, 2005). Elles sont, comme les cellules B1, impliquées dans les réponses innées et capables de rapidement répondre aux microorganismes parvenant dans le filtre sanguin que constitue la rate. Ces cellules jouent également un rôle important dans l'initiation des réponses T-dépendantes par leur capacité à produire immédiatement des IgM. Ces anticorps, en s'associant avec l'antigène, forment des complexes immuns qui sont transportés sur les cellules dendritiques folliculaires et interviennent ensuite dans la maturation des réponses adaptatives. Ces complexes immuns participent également à l'élimination des microorganismes et donc à la résolution de l'infection (Ferguson, 2004).

Ces cellules de la zone marginale peuvent présenter un statut hypermuté ou non des gènes IgVH comme les cellules de LLC-B. Bien qu'elles ne présentent pas spontanément d'expression de CD5, cette molécule pourrait apparaître en relation avec le profil d'activation des cellules de LLC-B (Chiorazzi, 2005).

### **III - IMMUNOTHERAPIE ANTI-TUMORALE DE LA LLC-B**

Les données concernant les allogreffes à conditionnement atténué suggèrent que les caractéristiques immunologiques spécifiques aux cellules clonales des LLC pourraient être mises à profit pour des approches encore plus orientées vers une mise en jeu de réponses immunitaires anti-tumorales.

#### **III.1 - Potentiel antigénique des cellules de LLC-B**

L'influence de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD ou graft versus host disease) sur l'incidence de la rechute après greffe a été largement démontrée dans les leucémies (Maraninchi, 1987). Le rôle des lymphocytes T dans le cadre du contrôle tumoral a été mis en évidence lors de l'utilisation thérapeutique d'anticorps monoclonaux anti-récepteur de l'IL-2 qui ont conduit à une augmentation du taux de rechute des patients ayant reçu une allogreffe et une diminution significative de leur survie (Blaise, 1993). De plus, la déplétion lymphocytaire au cours des allogreffes est corrélée à un risque de rechute accru ce qui souligne l'importance du rôle joué par les lymphocytes dans l'effet GVL. Ceci a été confirmé lors de l'utilisation d'injections de lymphocytes du donneur (DLI ou donor lymphocyte infusion) à des patients en rechute après allogreffe, permettant d'obtenir un traitement efficace et un retour en rémission complète (Kolb, 1995). Cette observation laisse supposer l'existence d'une réponse immune médiée par les lymphocytes du donneur contre les cellules leucémiques, capable de rompre l'état de tolérance sans expression parallèle de GVHD (Maraninchi, 1987).

Plusieurs études ont montré que les patients atteints de LLC-B étaient sensibles à des

injections de lymphocytes du donneur (Morris, 2004 ; Barge, 2003 ; Khouri, 2003). Toutefois, Morris et al. (2004) ont rapporté 44% de rechutes à 3 ans en dépit de ce traitement post allogreffe (Morris, 2004). Une étude plus récente de Delgado et al. (2006) a montré que 27% des patients atteints de LLC-B qui ont reçu une allogreffe après une transplantation autologue ayant échoué rechutaient après 2 ans. Pour ces patients, des doses plus importantes de DLI ont été nécessaires pour obtenir un contrôle de la maladie avec pour conséquence une augmentation considérable de la toxicité due à la maladie du greffon contre l'hôte.

Cette immunothérapie cellulaire est utilisée dans le cadre du traitement des rechutes après allogreffe ainsi que des allogreffes après conditionnement à intensité réduite. La place des DLI est toutefois encore mal définie dans le cas de la LLC-B, au regard de ces résultats décevants.

L'existence d'un effet GVT dans la LLC-B suite à l'injection ou non de lymphocytes du donneur après à une greffe allogénique ou à conditionnement atténué souligne la capacité du système immunitaire à reconnaître les cellules de LLC-B et donc l'intérêt de stratégies d'immunothérapie cellulaire dans le traitement de cette maladie (Khouri, 1998 ; Michallet, 2001).

Dans ce contexte, des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que des cellules dendritiques, des monocytes ou des cellules B activés ouvrent de nouveaux espoirs dans l'immunothérapie anti-tumorale, compte tenu du rôle majeur qu'elles peuvent jouer dans la présentation d'épitopes tumoraux et l'induction de réponses immunitaires spécifiques. La vaccination anti-tumorale constitue donc une approche thérapeutique attractive dans le cadre de la LLC-B.

### **III.2 - Utilisation des cellules B leucémiques comme vecteur de l'antigène tumoral**

Par définition, les proliférations lymphocytaires B sont constituées de cellules clonales présentant le même récepteur pour l'antigène constitué d'une immunoglobuline de surface exprimant les mêmes domaines variables sur toutes les cellules. Il est possible de générer *in vitro* des cellules T cytotoxiques dirigées spécifiquement contre le clone tumoral B. Ainsi, des réponses T autologues dirigées contre les cellules tumorales ont pu être générées *in vitro* en employant des peptides modifiés correspondant à la région variable de l'immunoglobuline

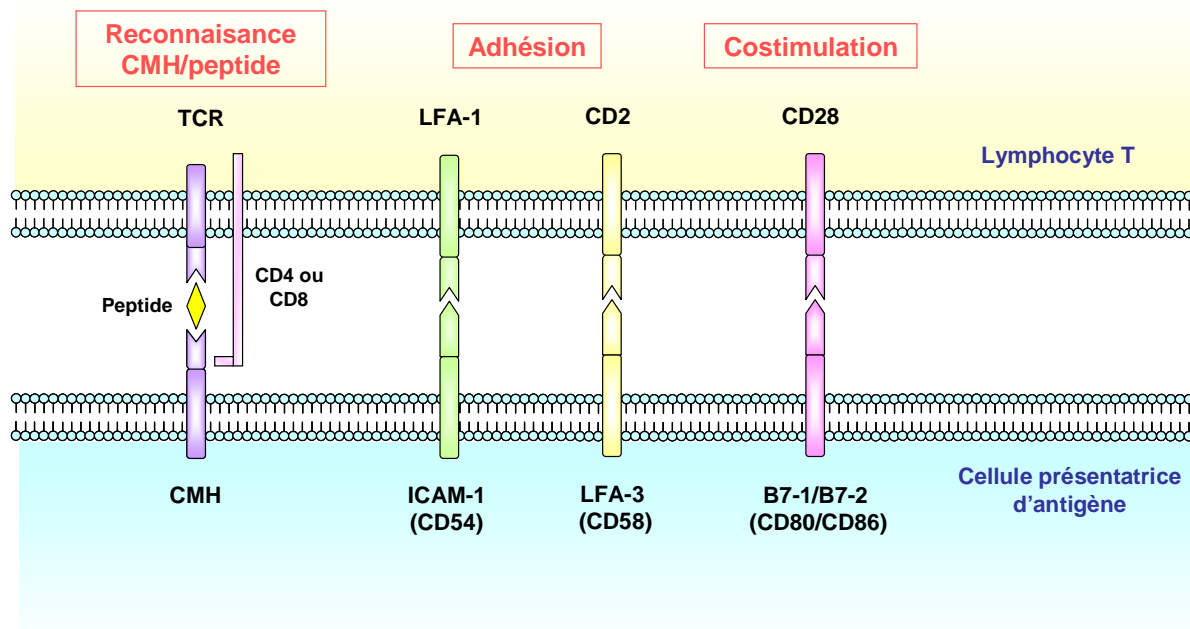
tumorale ou en utilisant l'idiotype tumoral comme antigène cible (Trojan, 2000 ; Harig, 2001 ; Vuillier, 2003) même si les réponses cytotoxiques observées *in vitro* demeuraient faibles et ne concernaient dans ces études qu'un nombre limité de patients. Par ailleurs, des réponses cliniques avec une régression tumorale ont été obtenues chez des patients porteurs de lymphome B ayant reçu un vaccin contenant l'idiotype autologue (Ruffini, 2002). Les déterminants idiotypiques des LLC-B représentent donc une cible intéressante et totalement spécifique pour la génération de réponses immunitaires anti-tumorales.

Il est par ailleurs établi que les cellules B matures expriment spontanément et sont capables d'augmenter l'expression membranaire des molécules du CMH de classe II et donc sont capables de capturer, apprêter et présenter l'antigène aux lymphocytes T. Ces cellules B sont également capables, après une stimulation adéquate, d'exprimer les molécules de costimulation et peuvent être utilisées pour générer et amplifier une réponse T anti-tumorale spécifique (Schultze, 1997).

Ces observations permettent d'envisager la possibilité d'utiliser les cellules B de la LLC-B comme vecteur de leur propre antigène tumoral afin d'induire une réaction du système immunitaire qui aboutirait à la destruction des cellules tumorales. Le développement de l'immunothérapie de la LLC-B demeure cependant difficile, d'une part en raison des anomalies immunologiques importantes présentes dans cette maladie, et d'autre part parce que les cellules de la LLC-B expriment faiblement l'idiotype tumoral qui constitue la cible du traitement (Dighiero, 1980).

Un certain nombre d'obstacles reste cependant à surmonter avant d'atteindre un tel objectif. Ainsi, *ex vivo*, les cellules de LLC-B sont incapables de stimuler spontanément des cellules T allogéniques (Ranheim, 1993 ; Yellin, 1994 ; Ranheim, 1995 ; Van den Hove, 1997) ce qui indique qu'en dépit de la reconnaissance par les cellules T de molécules CMH allotypiques, les signaux de costimulation nécessaires à leur prolifération font défaut sur les cellules B de LLC. En effet, ces cellules présentent une faible expression, voire une absence d'expression, de molécules d'adhésion et de costimulation (Buhmann, 1999 ; Ranheim, 1993 ; Ranheim, 1995). Or la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le récepteur pour l'antigène des cellules T (TCR ou T-Cell Receptor) n'est pas suffisante pour conduire à l'activation fonctionnelle des lymphocytes. La mise en place d'une réponse efficace nécessite l'intervention des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 ou CD54 et LFA-3 (lymphocyte function associated antigen-3) ou CD58 qui interagissent respectivement avec LFA-1 et la molécule CD2 sur le lymphocyte T ainsi que des molécules de costimulation CD80 et CD86

(respectivement appelées B7-1 et B7-2) qui interagissent avec CD28 (Grakoui, 1999) (figure 3).



**Figure 3** : Représentation schématique d'une synapse immunologique entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène

En sus de ces anomalies de la synapse immunologique, les cellules de la LLC-B sécrètent des facteurs immunosuppresseurs tels que le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-  $\beta$ ) ou l'IL-10, ainsi que de l'IL-4 peu efficace pour la stimulation de réponses cellulaires de type TH1 (Lotz, 1994 ; Kay, 2001 ; Fayad, 2001). Les cellules non leucémiques du sang périphérique des patients atteints de LLC-B sont donc dans un environnement permissif favorisant la persistance des cellules tumorales, réalisant un état chronique de tolérance *in vivo* avec pour conséquence l'induction d'un état anergique pour les cellules T de la LLC-B (Rossi, 1996).

Indépendamment des réponses T-cytotoxiques espérées, des déficits fonctionnels ont également été rapportés dans la population NK des patients atteints de LLC-B (Foa, 1986).

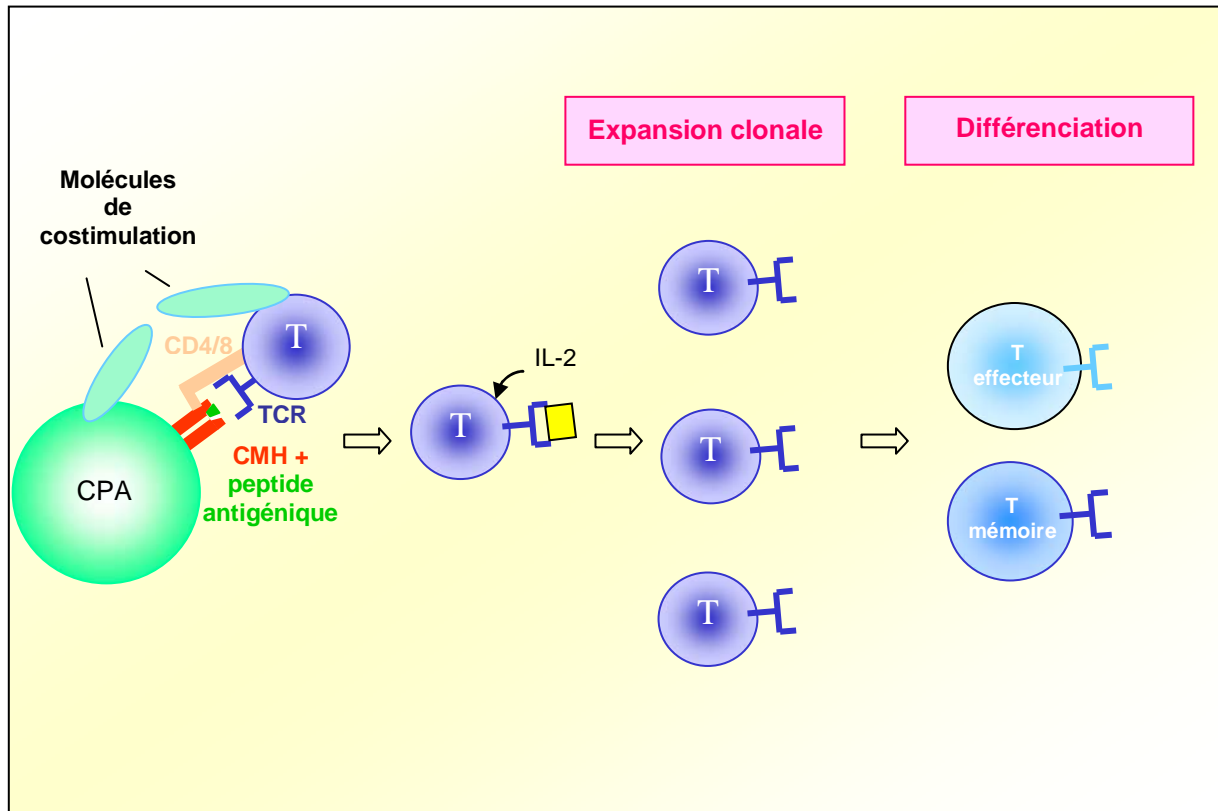
Enfin, les lourds traitements immunosuppresseurs utilisés dans les chimiothérapies de première ligne, notamment les analogues des purines, accentuent ces phénomènes chez les patients traités en induisant une immunodépression majeure.

Ainsi, la différenciation des cellules B tumorales en cellules présentatrices d'antigènes efficaces, capables de présenter leur propre antigène tumoral aux cellules T autologues mais également d'induire une réponse immunitaire, via les lymphocytes T CD4+ et CD8+, aboutissant à l'élimination des cellules tumorales, constitue une approche attractive dans la LLC-B à condition de parvenir à contrecarrer l'environnement immunosuppresseur induit par les cellules tumorales.

### **III.3 - Rôle des lymphocytes T dans l'immunité anti-tumorale**

#### III.3.1 - Génération de cellules T effectrices et des cellules T mémoires

Dans toutes les réponses immunitaires adaptatives, la présentation du complexe CMH/antigène à des lymphocytes T naïfs, en association avec des signaux de costimulation, conduit à l'activation des lymphocytes spécifiques de cet antigène. Les lymphocytes activés produisent de l'IL-2 conduisant à l'activation et à la prolifération du lymphocyte T et donc à la formation d'un clone de cellules T. Les cellules de ce clone, qui possèdent donc le même récepteur pour l'antigène, se différencient en deux populations : les cellules T effectrices et les cellules T mémoires (Goldsby, 2000) (figure 4).



**Figure 4** : Schématisation de la différenciation des lymphocytes T naifs en lymphocytes T mémoires et lymphocytes T effecteurs

Les lymphocytes T effecteurs gagnent le site de l'agression ou de la tumeur, pour éliminer l'antigène impliqué et vont y exercer les diverses fonctions spécialisées des lymphocytes T (cytotoxicité, production de cytokines, aide aux cellules B...). Ces cellules sont dérivées de cellules naïves rencontrant leur antigène pour la première fois ou de cellules mémoires réactivées par la présence de l'antigène. Les cellules T mémoires sont caractérisées par une durée de vie longue. Elles permettent une réponse immune beaucoup plus rapide et forte en cas de deuxième rencontre du même antigène. Ces lymphocytes qui reviennent au repos après avoir répondu à l'antigène peuvent survivre longtemps après la disparition des cellules T effectrices (parfois plusieurs années) en attente d'une réintroduction du même antigène. Les lymphocytes mémoires "patrouillent" en permanence entre les organes lymphoïdes secondaires et les tissus périphériques non lymphoïdes pendant le reste de la vie de l'individu, à la recherche d'éventuelles cellules présentatrices d'antigènes présentant les mêmes peptides que ceux qui les ont initialement stimulés et pourront alors s'activer rapidement (Goldsby, 2000).

Comme les cellules T naïves, les cellules T mémoires sont généralement des cellules au repos en phase G0 du cycle cellulaire mais le degré d'activation nécessaire pour l'engagement de la réponse immune est très inférieur pour les cellules mémoires. Ainsi, alors que les lymphocytes T CD4+ naïfs ne sont activés que par les cellules dendritiques, les cellules B sont capables d'activer les cellules T CD4+ mémoires. Ceci pourrait être dû aux taux élevés de molécules d'adhésion exprimés à la surface de ces dernières (Goldsby, 2000).

Parmi les lymphocytes T, on distingue deux sous-populations importantes : les lymphocytes T qui expriment le marqueur CD4 également appelés lymphocytes T auxiliaires ou helper et ceux qui expriment CD8 ou lymphocytes T cytotoxiques (CTLs ou Cytotoxic T Lymphocytes). Ces cellules diffèrent de façon fondamentale dans leurs modalités de reconnaissance de l'antigène et dans les fonctions régulatrices ou effectrices qu'elles exercent.

### III.3.2 - Les lymphocytes auxiliaires ou helper

Les lymphocytes T CD4+ effecteurs sont les acteurs principaux des coopérations cellulaires, indispensables au développement de l'ensemble des réponses immunitaires. Ils exercent leur fonction T auxiliaire en fournissant les signaux de coopération cellulaire (par contact direct et par l'intermédiaire de cytokines) aux autres acteurs des réponses immunitaires.

#### ∞ *Immunité cellulaire et immunité humorale*

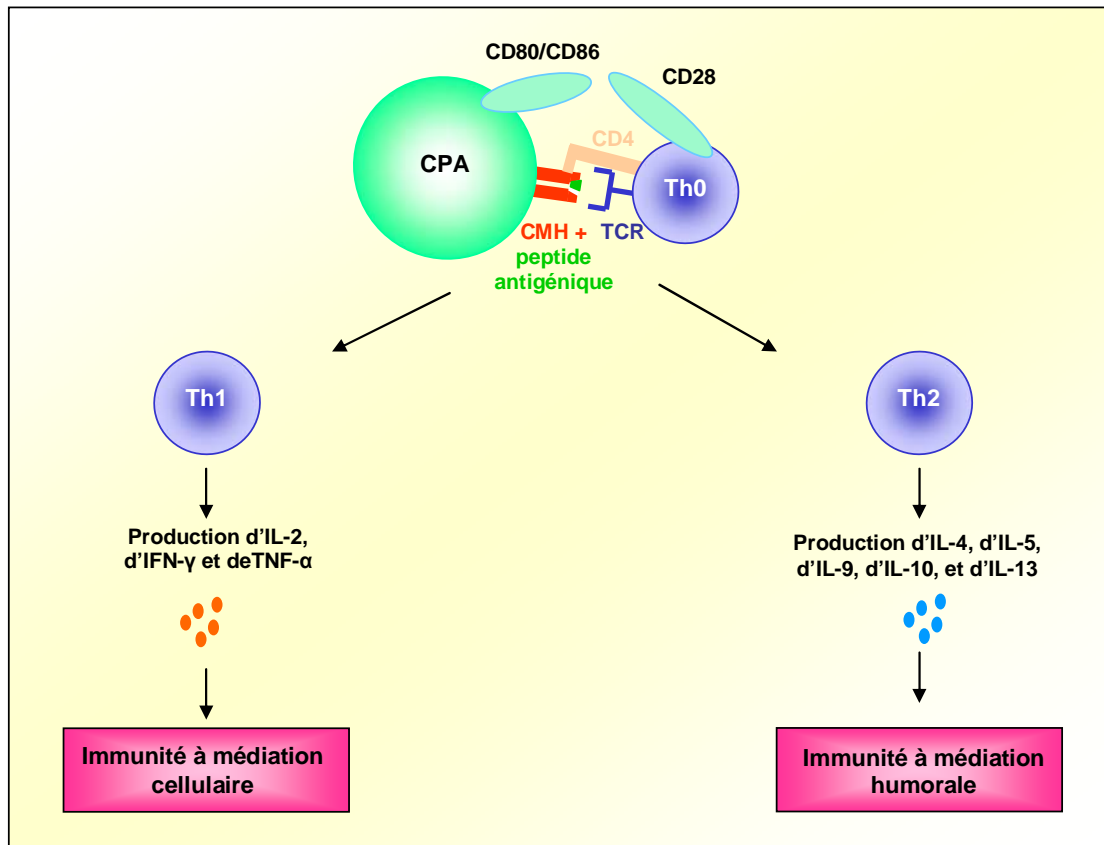
Les lymphocytes T CD4 effecteurs peuvent être subdivisés en deux sous-populations de cellules T caractérisées par des profils de production cytokinique différents. Les lymphocytes T CD4 de type Th1 (pour T helper type 1) sécrètent de l'IL-2, de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  et les Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-9, de l'IL-10, et de l'IL-13 (Mosmann, 1989).

Les lymphocytes T de type Th1 conduisent à une immunité de type cellulaire, avec en particulier l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. Par contre, les lymphocytes de type Th2 induisent une immunité de type humoral, sont capables d'activer les lymphocytes B et leur permettent de se différencier en plasmocytes.

Ces deux types de profils cytokiniques lymphocytaires dérivent d'une population



cellulaire appelée Th0 capable de produire l'ensemble des cytokines et provenant elle-même de lymphocytes T naïfs producteurs d'IL-2 et d'IL-4. Il existe aussi des lymphocytes T CD4 appelés suppresseurs ou régulateurs qui produisent des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 (Read, 2001) (figure 5).



**Figure 5** : Schématisation de l'orientation de la réponse immunitaire adaptative vers un profil Th1 ou Th2

Ces deux sous-populations de lymphocytes T, Th1 et Th2, possèdent la capacité de s'auto-amplifier. Ainsi, l'IL-2, produite par les Th1, stimule la prolifération des Th1 et l'IL-4 produite par les Th2, stimule la prolifération des Th2. L'IL-12 peut également promouvoir la différenciation Th1. Il existe à l'inverse une inhibition réciproque des deux sous-populations : l'IFN-γ inhibe la génération des lymphocytes T Th2, tandis que l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la génération des Th1.

Plus récemment, ont été décrites des cellules T de type Th17 sécrétant la cytokine pro-inflammatoire IL-17. L'activation des lymphocytes T précurseurs en présence de TGF-β et

d'IL-6 conduit à la différenciation de ces cellules Th17. L'IL-23 joue un rôle important dans le maintien de leur fonction effectrice (Stockinger, 2007). Par ailleurs, l'IL-21, produite par les cellules TH17 elles-mêmes, est capable d'initier une voie alternative permettant l'activation de cette population, en combinaison avec le TGF- $\beta$ , et d'amplifier la réponse TH17 (Korn, 2007).

### *∞ Rôle des lymphocytes T CD4+ dans l'immunité spécifique anti-tumorale*

Les propriétés décrites ci-dessous concernent plutôt les cellules CD4+ Th1 qui participent principalement à l'immunité cellulaire.

Les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle clé dans la maintenance de la prolifération et des fonctions des effecteurs T CD8+ via la sécrétion l'IL-2. Cette interleukine participe à la différenciation et à la survie des CTLs, elle contribue à leur protection contre l'apoptose et l'anergie, au maintien de leur capacité cytotoxique et au support de leur production de cytokines (Fearon, 1990 ; Rosenberg, 1998). En outre, des travaux ont récemment suggéré que ces cellules CD4+ étaient en mesure d'activer directement les CTLs grâce aux molécules de costimulation (Giuntoli, 2002). D'autres études ont démontré que les lymphocytes T CD4+ étaient capables de moduler l'environnement tumoral pour favoriser l'infiltration des T CD8+ (Marzo, 2000) et de réactiver des CTLs mémoires (Gao, 2002). Les T CD4+ peuvent aussi éradiquer les cellules tumorales au travers du recrutement et de l'activation des autres cellules effectrices comme les macrophages et les éosinophiles (Hung, 1998 ; Mattes, 2003).

### III.3.3 - Rôle des lymphocytes T CD8+ dans l'immunité anti-tumorale

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont aussi appelés cytotoxiques en raison de leur fonction cytolytique. Ils se différencient en effecteurs, dotés d'une fonction cytotoxique.

Ils peuvent induire une cytotoxicité directe via la voie perforine/granzymes. Cette voie conduit au déversement de substances cytotoxiques contenues dans des granules de sécrétion : ces substances incluent la perforine, qui peut se polymériser pour former des pores traversant la membrane des cellules cibles, et les granzymes (dont les mieux caractérisés sont les granzymes A et B) pouvant pénétrer dans la cellule cible par ces pores et qui induisent

l'apoptose de la cellule cible en activant les caspases (Janeway, 2001).

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sont également capables de déclencher l'apoptose des cellules cibles au travers de la voie Fas/Fas ligand ou via la voie TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Fas, également connu sous le nom de CD95 ou Apo-1, et TRAIL sont des récepteurs de la famille du récepteur du TNF situés sur la membrane de la cellule cible. Leurs ligands respectifs sont induits dans la membrane de la cellule T cytotoxique. L'interaction entre ces récepteurs et leur ligand provoque l'activation des caspases et donc l'apoptose des cellules cibles.

La lyse cellulaire peut également être produite par la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et le TNF- $\beta$  qui permettent de tuer les cellules cibles (Janeway, 2001).

Certaines sous-populations T CD4<sup>+</sup> peuvent également exercer ces fonctions et être capables d'induire une cytotoxicité directe via la voie perforine/granzymes (Echchakir, 2000). Ces CD4<sup>+</sup> particuliers pourraient aussi conduire à l'apoptose des cellules cibles via la voie TRAIL (Thomas, 1998).

### **III.4 - TLRs et immunothérapie anti-tumorale**

Les TLRs sont des récepteurs de l'immunité innée, appartenant à la famille des PRRs (Pattern-Recognition Receptors) qui interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes, appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). L'engagement de ces récepteurs active dans les cellules qui les expriment, plusieurs cascades de signalisation qui aboutissent à la mise en place des effecteurs de l'immunité innée. En plus de fournir une première ligne de défense contre les pathogènes, l'immunité innée joue un rôle instructif vis à vis de l'immunité acquise. Il a en outre été montré que ces récepteurs sont capables d'induire la production de cytokines, d'augmenter l'expression des molécules de costimulation et qu'ils jouent un rôle primordial dans l'orientation des réponses immunitaires vers un profil Th1. Par ailleurs, des études ont montré le rôle que peuvent jouer les ligands de ces récepteurs en tant qu'adjuvants dans l'immunothérapie anti-tumorale (van Duin, 2006). Dans ce contexte, les TLRs pourraient par conséquent constituer une approche thérapeutique intéressante dans le traitement de la LLC-B, en particulier si ces cellules en expriment et sont sensibles à leurs agonistes.

## **IV - LES TOLL-LIKE RECEPTEURS**

### **IV.1 - Découverte**

Découverte chez *Drosophila melanogaster*, la protéine Toll, initialement caractérisée par son implication dans l'orientation de la polarité dorso-ventrale au stade embryonnaire (Hashimoto, 1988), a ensuite été identifiée comme un récepteur pouvant initier une réponse immunitaire vis à vis d'un pathogène (Lemaître, 1996). Une des caractéristiques de la réponse immunitaire de la drosophile est la synthèse d'un cocktail de puissants peptides antimicrobiens en réponse à l'infection. L'analyse génétique de la régulation de l'expression des gènes codant pour ces peptides a mené à l'identification de la voie Toll. Cette voie est activée en réponse à des infections par des bactéries à Gram positif ou des champignons, qui contrôle notamment l'expression d'un peptide antifongique, la drosomycine (Hoffmann, 2003).

La mise en évidence du rôle de Toll dans la réponse antifongique de la drosophile a incité la recherche de récepteurs homologues chez les mammifères. Une famille de récepteurs apparentés à Toll, les Toll-like récepteurs, a ainsi été identifiée chez ces derniers (Medzhitov, 1997b ; Rock, 1998). On en connaît actuellement 13 membres (TLR-1 à -13) dont 10 sont formellement identifiés chez l'homme (TLR-1 à -10) (Takeuchi, 1999 ; Rock, 1998 ; Du, 2000 ; Chaudhary, 1998 ; Chuang, 2001).

Il est très rapidement apparu que les TLRs pouvaient fonctionner comme des PRRs. En effet, des souris C3H/HeJ qui ne répondent pas au lipopolysaccharide (LPS) présentent une mutation dans le gène codant pour le récepteur TLR-4 (Poltorak, 1998). Des expériences complémentaires basées sur la génération de souris "knock-out" pour le gène de TLR-4 ont confirmé que TLR-4 était un composant essentiel du complexe récepteur au LPS (Hoshino, 1999).

### **IV.2 - Sélectivité des ligands**

La génération de souris "knock-out" pour chacun des gènes codant pour les différents

membres de la famille des TLRs a, par la suite, permis la caractérisation des ligands de chacun de ces PRRs. Par ailleurs, les homologies de séquences et l'organisation génomique des gènes Toll, ont permis d'identifier 5 sous-classes de TLRs qui reconnaissent des ligands de structures similaires : TLR-1, -2, -6 (et -10), TLR-4, TLR-5, TLR-3 et TLR-7, -8 et -9 (Kaisho, 2004).

Le ligand de TLR-10 est le seul à n'avoir pas encore été identifié. En effet, l'absence d'expression de ce TLR chez la souris a entravé l'identification de ligands naturels ou synthétiques de ce PRR (Hasan, 2005). Toutefois, en raison des homologies qu'il présente avec TLR-1 et TLR-6, il a été envisagé que son ligand pourrait être d'origine bactérienne (Akira, 2003).

#### IV.2.1 - TLR-2, TLR-1/TLR-2 et TLR-6/TLR-2

TLR-2 reconnaît un grand nombre de ligands, tels que le peptidoglycane et les acides lipotéichoïques des bactéries à Gram positif (Yoshimura, 1999 ; Underhill, 1999 ; Lehner 2001), les lipopeptides/lipoprotéines bactériens (Takeuchi, 2001 ; Yoshimura, 1999) le lipoarabinomannane des mycobactéries (Means, 1999) et le zymosan, un composant de la paroi des levures (Underhill, 1999 ; Schwandner, 1999 ; Lien, 1999). Il est par ailleurs impliqué dans la réponse cellulaire du glycoinositolphospholipide du parasite *Trypanosoma cruzi* (Aderem, 2000), de la moduline phénol-soluble de *Staphylococcus epidermitis* (Hajjar, 2001), des porines constituant la membrane externe des *Neisseria* (Massari, 2002) et de *Haemophilus influenzae* (Galdiero, 2004). Ce PRR peut également être activé par le LPS issu de non-entérobactéries telles que *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivalis* et *Helicobacter pylori* (Hirschfeld, 2001 ; Werts, 2001 ; Smith, 2003) différent du LPS typique des bactéries à Gram négatif reconnu par TLR-4. Enfin, TLR-2 reconnaît des structures virales comme le virus de l'herpès (Herpes simplex 1 ou HSV-1), les protéines de l'enveloppe du cytomégalovirus (Compton, 2003 ; Kurt-Jones, 2004) et la protéine de l'hémagglutinine de la souche sauvage du virus de la rougeole (Bieback, 2002).

TLR-2 est capable de former des hétérodimères, ce qui permet d'augmenter considérablement le spectre des molécules reconnues tout en conservant une grande sélectivité (Ozinsky, 2000). Ainsi, ce PRR a la capacité de se dimériser avec TLR-1 et TLR-6 (Takeuchi, 2001; Wyllie, 2000). L'hétérodimère TLR-1/TLR-2 reconnaît les lipopeptides

triacylés Pam3CSK4 (Takeuchi, 2002) ainsi que les lipoprotéines OspA de la membrane externe de *Borrelia burgdorferi* (Alexopoulou, 2002) et des facteurs solubles de *Neisseria meningitidis* (Wyllie, 2000) alors que l'hétérodimère TLR-2/TLR-6 répond aux lipoprotéines de mycobactéries tel que MALP-2 (macrophage activating lipopeptide-2) (Takeuchi, 2001).

TLR-10 qui appartiendrait à la même famille que TLR-1, TLR-2 et TLR-6 pourrait également former des hétérodimères avec TLR-2 (Hasan, 2005).

### IV.2.2 - TLR-3

TLR-3 est impliqué dans la réponse à l'ARN double-brin (dsRNA) généré pendant le cycle de réplication des virus à ARN au cours d'une infection. Les dsRNA peuvent se lier à et activer la protéine kinase PKR dont la signalisation en aval inhibe la réplication virale et favorise la production de cytokines pro-inflammatoires (Alexopoulou, 2001). Le Poly (I:C), (ou Polyriboinosinic:Polyribocytidylic Acid), un analogue synthétique de dsRNA est souvent utilisé comme agent de maturation de TLR-3 (Alexopoulou, 2001 ; Cella, 1999).

### IV.2.3 - TLR-4

Hormis le LPS des bactéries Gram-négatives, TLR-4 peut également être activé par la protéine F du virus syncytial respiratoire (Kurt-Jones, 2000), par le bêta rétrovirus de la tumeur mammaire de la souris de type B 66 (Rassa, 2002) ou encore par le virus de la leucémie murine de Moloney (Abujamra, 2006). La stimulation de TLR-4 peut également être médiée par la protéine de choc thermique HSP60 de *Chlamydia pneumoniae* (Costa, 2002) et par une sérine contenant des lipides appelée Flavolipin de *Flavobacterium meningosepticum* (Gomi, 2002).

TLR-4 peut s'associer à des protéines auxiliaires pour permettre une reconnaissance et une signalisation optimales. Ainsi, son association avec la protéine sécrétée MD-2 et le co-récepteur CD14 permet de reconnaître le complexe formé par le LPS et la protéine circulante LBP (LPS-binding protein) (Ulevitch, 1999).

## IV.2.4 - TLR-5

TLR-5 a été identifié comme récepteur à la flagelline, un constituant du flagelle bactérien, et l'activation de la signalisation par TLR-5 entraîne la production de TNF- $\alpha$  (Hayashi, 2001).

## IV.2.5 - TLR-7 et TLR-8

TLR-7 et TLR-8 sont impliqués dans la réponse à l'ARN simple brin d'origine virale ou non (Diebold, 2004 ; Heil, 2004). Le TLR7 murin et le TLR-8 humain reconnaissent les virus à ARN simple-brin comme l'*influenza* (Diebold, 2004 ; Lund, 2004), le virus Coxsackie B (Triantafilou, 2005) et le virus de Sendai (Melchjorsen, 2005). De plus, des duplex de siRNA synthétiques contenant un motif interne 5'-UGUGU-3' sont capables de stimuler les mTLR7 et hTLR8 (Judge, 2005).

TLR-7 et TLR-8 sont également impliqués dans la réponse à des composants synthétiques de la famille des imidazoquinolines (Hemmi, 2002) comme l'imiquimod (R837 et S-26308) et le resiquimod (R-848 et S-28463). Ainsi, les TLR-7 murin et humain sont capables de reconnaître l'imiquimod R837 et le resiquimod R848. Par contre, le TLR-8 humain n'est activé que par le resiquimod R848 (Jurk, 2002). Ces imidazoquinolines sont des composés de faible poids moléculaire qui ont un fort potentiel antiviral et des propriétés anti-tumorales dans des modèles animaux (Miller, 1999).

L'usage de l'imiquimod est actuellement approuvé dans le traitement des verrues génitales et périanales externes, dues à une infection au papillomavirus, chez l'adulte (von Krogh, 2001 ; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2002). Des études ont également suggéré que l'imiquimod était efficace dans le traitement de molluscum contagiosum (Liota, 2000), de kératoses actiniques (Salashe, 2002 ; Stockfleth, 2002) ou encore de carcinomes baso-cellulaires (Geisse, 2002 ; Schumack, 2002). L'efficacité de cette molécule est en cours d'évaluation dans d'autres infections virales cutanées.

Par ailleurs, les analogues de guanosine comme la loxoribine (7-allyl-8-oxoguanosine) et la broprimine (2-amin-5-bromo-6-phenyl-4(3)-pyrimidinone) sont également capables d'activer TLR-7. Ils peuvent tous deux conduire à la production d'IFN- $\alpha$  ou de cytokines

(Akira, 2003).

#### IV.2.6 - TLR-9

TLR-9 reconnaît les motifs CpG (deoxyribo-cytidine-phosphate-guanosine) non méthylés de l'ADN bactérien (Hemmi, 2000 ; Medzhitov, 1998) et des oligonucléotides synthétiques contenant des dinucléotides CpG non méthylés. De plus, il a récemment été mis en évidence que des virus à ADN, tels que les virus de l'herpès HSV-1 et HSV-2, ainsi que le cytomégalovirus murin, contenant des génomes riches en motifs CpG, sont capables d'activer la sécrétion de cytokines et d'interféron de type I après stimulation de TLR-9 (Hochrein, 2004 ; Lund, 2003 ; Krug, 2004 ; Tabet, 2004). Quelques études précliniques ont été réalisées chez l'homme. Ces premières données montrent que leur utilisation est bien tolérée, ce qui est confirmé par d'autres résultats thérapeutiques encourageants dans les maladies allergiques, le cancer ou comme adjuvant vaccinal (Klinman, 2004).

#### IV.2.7 - TLRs et ligands endogènes

Certaines études suggèrent que ces récepteurs pourraient également reconnaître des molécules endogènes telles que des protéines de choc thermique, des peptides antimicrobiens ou des fragments de molécules de la matrice extracellulaire, tels que les protéoglycanes, l'acide hyaluronique ou la fibronectine. Ces différents ligands endogènes sont récapitulés dans le tableau 7.



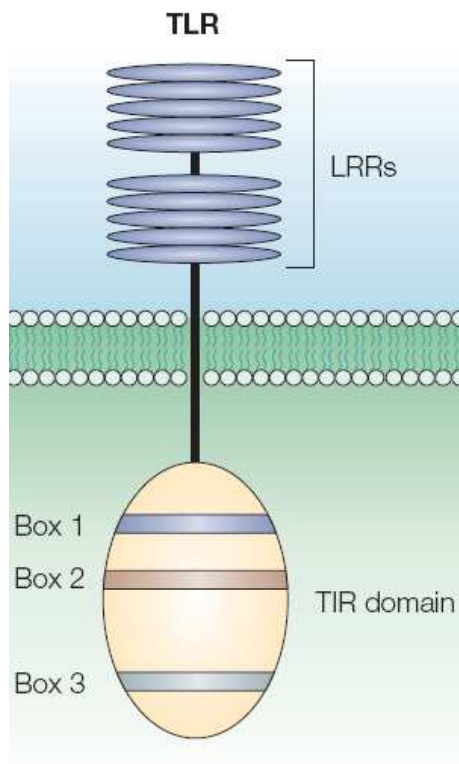
**Tableau 6** Les ligands endogènes des TLRs (adapté de Tsan, 2004)

TLRs	Ligands endogènes (origine)	Références
TLR-2	Protéines de choc thermique HSP60 HSP70 Gp96	Vabulas 2001 Asea 2002, Vabulas 2002a Vabulas 2002b
	HMGB1 (High mobility group box 1 protein)	Park 2004
TLR-4	Protéines de choc thermique Heat Shock Protein 60 (HSP60)	Ohashi 2000, Vabulas 2001
	HSP70 Gp96	Asea 2002, Dybdah 2002, Vabulas 2002a Vabulas 2002b
	Fibronectine de type III	Okamura 2001
	Oligosaccharides d'acide hyaluronique	Termeer 2002
	Fragments polysaccharidique d'héparane sulfate	Johnson 2002
	Fibrinogène	Smiley 2001
	$\beta$ -défensine 2	Biragyn 2002
SP-A (protéine du surfactant pulmonaire A)	Guillot 2002	

Cependant, des auteurs ont évoqué la possibilité que ces ligands soient contaminés par du LPS ou d'autres PAMPs, ce qui pourrait expliquer les activations observées (Akira, 2003). Ces réserves mises à part, ces études suggèrent que les TLRs pourraient être activés de façon coopérative par des molécules du non-soi et des molécules formées à la suite d'une dégradation tissulaire : une telle synergie pourrait expliquer comment le système inné établit une distinction entre les germes commensaux et les agents infectieux, qui contiennent les mêmes PAMPs (Matzinger, 2002 ; Medzhitov, 2002).

### IV.3 - Structure

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires de type I. Ils sont composés d'un domaine N-terminal extracellulaire, récepteur du signal de danger, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal intracellulaire qui permet la transduction du signal (figure 6).



**Figure 6** : Structure des TLRs (d'après Akira, 2004)

### IV.3.1 - Domaine extracellulaire

L'ectodomaine est composé de répétitions riches en leucines de 24 à 29 acides aminés, appelées Leucin-Rich Repeats ou LRR, séparées du domaine transmembranaire, du côté carboxy-terminal, par un motif riche en cystéines appelé motif C-flank. Ce domaine extracellulaire est impliqué dans la reconnaissance du signal de danger et joue un rôle clef dans l'initiation de signalisation des TLRs (Akira, 2003). La distribution et le nombre de motifs répétés riches en leucine ainsi que l'organisation et le nombre d'insertions entre ces LRR est propre à chacun des TLRs ce qui leur confère leur spécificité dans la reconnaissance des pathogènes (Bell, 2003 ; Choe, 2005).

### IV.3.2 - Domaine intracellulaire ou domaine TIR

Le domaine intracellulaire, partagé par les membres de la famille du récepteur de l'Interleukine-1 (IL-1R) et également présent dans de nombreux gènes de résistance (R) des plantes, est appelé domaine TIR (Toll/IL-1R/R) (Imler, 2001).

Trois régions très conservées appelées boîte 1, boîte 2 et boîte 3 ont été caractérisées dans ce domaine TIR après alignement de séquences des 31 membres de la famille IL-1R/TLR (Luo, 2000). Ces régions sont impliquées dans la transduction du signal d'activation. La boîte 1 pourrait être impliquée dans l'oligomérisation du récepteur avec un autre récepteur (Xu, 2000).

La boîte 2 est quant à elle impliquée dans l'oligomérisation avec les molécules adaptatrices contenant un domaine TIR qui interviennent dans la signalisation des TLRs (Xu, 2000). Elle interagirait avec une molécule adaptatrice qui permet la transduction du signal grâce à sa structure en boucle (Xu, 2000 ; Li, 2005).

La boîte 3 contient des acides aminés essentiels pour la signalisation et pourrait être impliquée dans la localisation du récepteur probablement par des interactions avec des éléments du cytosquelette (Slack, 2000) et dans l'oligomérisation avec les domaines TIR des molécules adaptatrices (Xu, 2000) mais sa fonction n'est pas complètement élucidée (O'Neill, 2003).

Le domaine TIR comporte environ 150 à 200 acides aminés (Khan, 2004). Le nombre d'acides aminés conservés entre les boîtes est généralement de 20 à 30% et varie en fonction du récepteur (Akira, 2004). Ce motif TIR est fortement impliqué dans les mécanismes d'inflammation et de défense de l'hôte et toute modification de sa séquence en acides aminés est susceptible de modifier la réponse de l'hôte aux infections.

## **IV.4 - Signalisation des TLRs**

La stimulation des différents TLRs par leurs ligands respectifs induit une voie de transduction qui conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B), des MAP kinases ou MAPKs (mitogen-activated protein kinases) et des facteurs IRF (interferon regulatory factors) qui engendrent l'expression d'interféron de type I et de gènes induits par l'interféron. Ceux-ci régulent la transcription de nombreux gènes codant de protéines impliquées dans l'immunité et l'inflammation.

Le domaine TIR joue un rôle essentiel dans la signalisation par les TLRs. En effet, une mutation ponctuelle dans les séquences codant ce domaine du récepteur TLR-4 (remplacement de la proline en position 712 par une histidine) abolit la réponse au LPS (Poltorak, 1998). Les TLRs interagissent, par l'intermédiaire de ce domaine, avec une molécule adaptatrice contenant elle-même un domaine TIR. Cinq molécules adaptatrices ont été identifiées (O'Neill, 2003) :

- MyD88,
- TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) également appelé MAL (MyD88 adaptor-like),
- TRIF (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-beta) ou TICAM-1 (TIR-containing adaptor molecule 1),
- TRAM (TRIF-related adaptor molecule) ou TICAM-2 (TIR-containing adaptor molecule 2) ou TIRP (TIR-containing protein),
- SARM (sterile  $\alpha$  and HEAT-Armadillo motifs) dont le rôle dans la signalisation des TLRs n'est toutefois pas cependant claire (O'Neill, 2003).

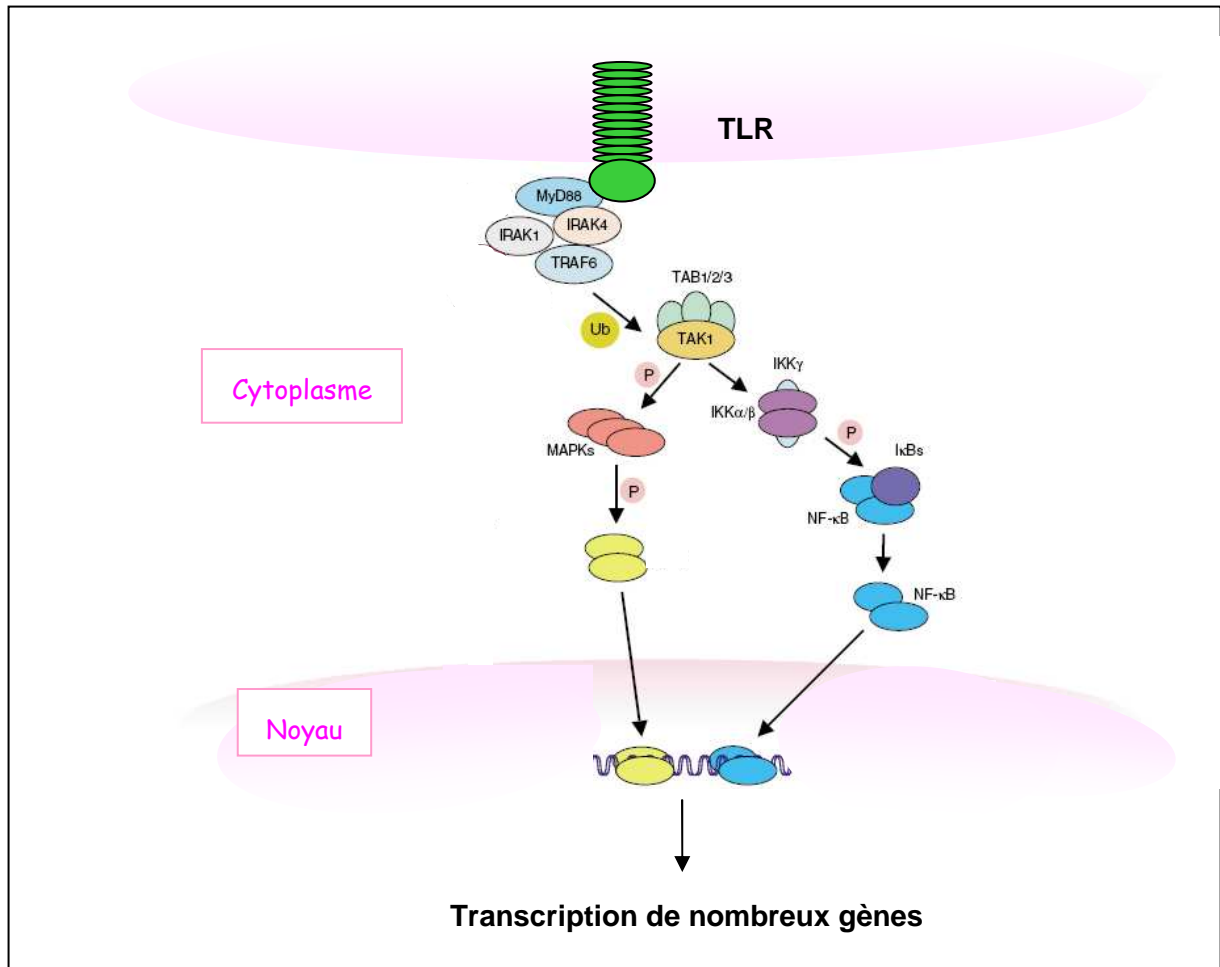
L'existence de voies de signalisation différentes médiées par des molécules adaptatrices spécifiques pour chacun des TLRs peut ainsi expliquer les réponses biologiques distinctes obtenues après activation via leurs ligands respectifs.

MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) est la molécule adaptatrice la mieux caractérisée. Deux voies de signalisation distinctes faisant intervenir ou non MyD88 ont été identifiées : elles sont respectivement appelées voie MyD88 dépendante et voie MyD88 indépendante.

#### IV.4.1 - Voie de signalisation MyD88 dépendante

La voie de signalisation MyD88 dépendante engendre l'activation des facteurs de transcription NF $\kappa$ B, IRF et des MAP kinases (MAPKs).

∞ Voies conduisant à l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPKs (figure 7)



**Figure 7** : Schématisation des voies MyD88 dépendantes aboutissant à l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPKs (adapté de Kawai, 2006)

MyD88 joue un rôle critique dans la signalisation de tous les TLRs à l'exception de TLR3 (Alexopoulou, 2001).

Le facteur MyD88 contient un domaine de mort (DD pour death domain) du côté N-terminal qui lui permet d'interagir avec les sérine/thréonine kinases à domaine DD de la famille IRAK (IL-1R-associated kinase) et donc de jouer le rôle d'adaptateur entre les TLRs et ces kinases. La première étape de l'activation de la voie en aval de MyD88 correspond au recrutement de IRAK-4 puis à l'association avec IRAK-1. L'association IRAK/MyD88 entraîne l'hyperphosphorylation d'IRAK-1 par elle-même mais également par la kinase IRAK-4 (Li, 2002).

Tollip, une molécule adaptatrice identifiée à l'origine dans la signalisation impliquant IL-1 (Burns, 2000), joue un rôle crucial à cette étape de la voie de signalisation MyD88

dépendante. En effet, cette molécule est capable d'interagir avec le domaine TIR de TLR-2 et TLR-4 : en formant un complexe avec IRAK-1, elle bloque sa phosphorylation et empêche ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B. Après stimulation du TLR engagé, IRAK-1 phosphoryle Tollip ce qui engendre la dissociation du complexe Tollip/MyD88/IRAK ainsi que la dégradation de l'inhibiteur Tollip. Tollip correspond donc à une molécule adaptatrice régulant de façon négative les voies de signalisation médiées par les TLRs permettant ainsi de limiter la production de médiateurs pro-inflammatoires au cours d'une inflammation et d'une infection (Zhang, 2002).

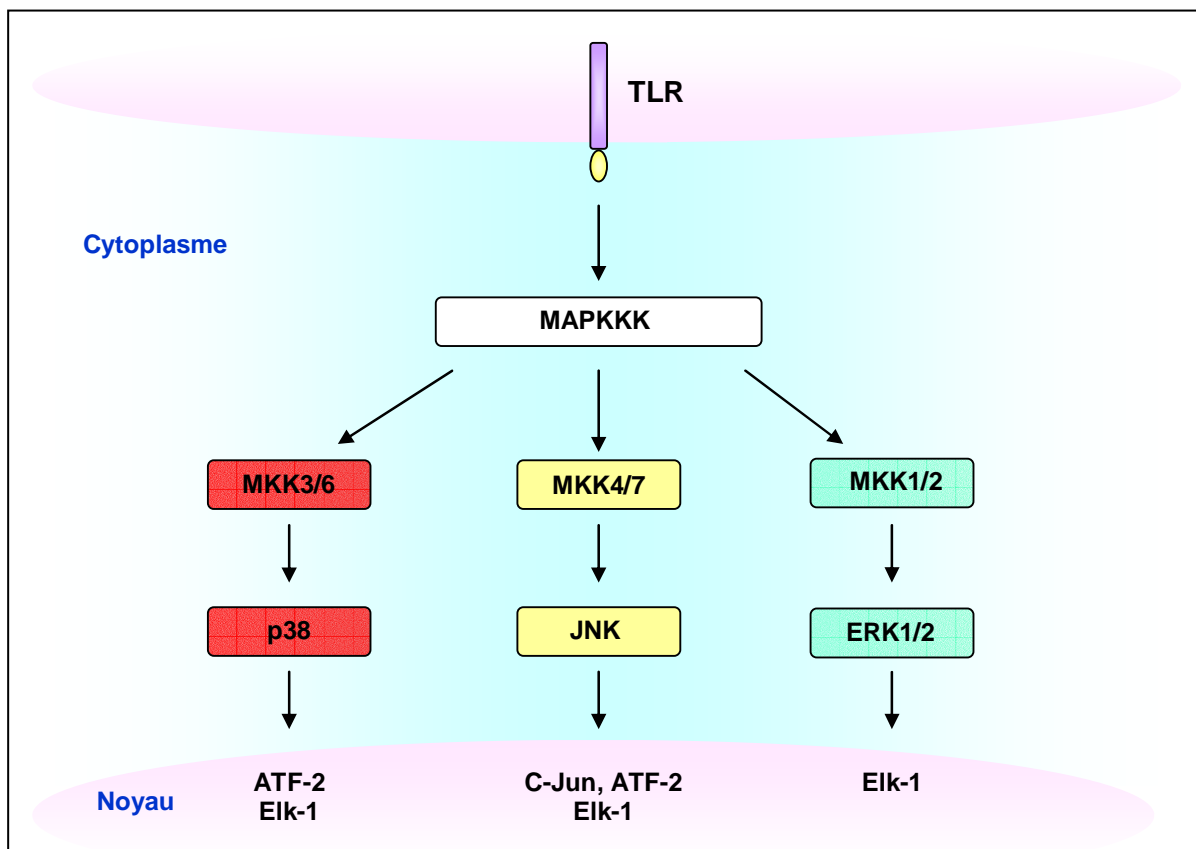
Une fois phosphorylé, IRAK-1 se dissocie du complexe récepteur puis interagit avec la protéine TRAF-6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) (Suzuki, 2002). TRAF-6 active alors un hétérodimère constitué de 2 protéines d'ubiquitination appelées Uev1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1) et Ubc13 (ubiquitin-conjugating enzyme 13) (Deng, 2000 ; Wang., 2001) qui engendrent la polyubiquitination de TRAF-6 et lui permettent ainsi de s'associer au complexe formé par TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase), TAB1 (TAK1-binding protein 1), TAB2 et TAB3 (Shibuya, 1996 ; Takaesu, 2000 ; Besse, 2007). TAB1, 2 et 3 constituent des protéines adaptatrices. TAB1 augmente l'activité kinase de TAK1 (Shibuya, 1996), alors que TAB2 et TAB3, qui sont 2 homologues, permettent la dimérisation TAK1/TRAF-6 (Takaesu, 2000 ; Ishitani, 2003).

Le complexe TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 ainsi activé entraîne la phosphorylation de la kinase de I $\kappa$ B (Inhibitor- $\kappa$ B) connue sous le nom de IKK. Le complexe IKK qui est constitué de IKKa, (ou IKK1), IKKb (ou IKK2) et IKKg (ou NEMO pour NF- $\kappa$ B essential modulator) phosphoryle alors I $\kappa$ B, l'inhibiteur cytoplasmique de NF- $\kappa$ B, ce qui provoque sa dégradation et par conséquent la translocation nucléaire des sous-unités p50/p65 du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Muzio, 2000).

TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 peut également agir comme une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK ou MEKKK) (Yamaguchi, 1995) et phosphoryler des protéines MAP kinases kinases (MKK ou MEKK). Ainsi, TAK1 peut activer MKK3 et MKK6 qui phosphorylent à leur tour la MAPK p38, mais également MKK4 et MKK7 qui activent JNK (c-Jun N-terminal kinases) (Kyriakis, 2001). Les MAPKs ERK-1 (extracellular signal-regulated kinase-1) et ERK-2 sont également activées en réponse aux TLRs. Cette activation passe par la phosphorylation de MKK1 et MKK2 (Shapiro, 1998).

Les membres de la famille AP-1 (Activator Protein-1) représentent la cible principale

des MAPKs. Il s'agit d'homodimères ou d'hétérodimères composés de membres de la famille des facteurs de transcription à domaine bZIP. Cette famille regroupe c-jun, junB, junD, c-Fos et ATF1/2 (Activation Transcription Factor 1/2), qui s'associent grâce à leur domaine bZIP (leucine à glissière) pour former un complexe jun-jun, jun-fos, ou jun-ATF (jun-activating transcription factor). Les MAPKs peuvent également activer d'autres facteurs de transcription tels que Elk-1 qui fait partie de la famille des protéines Ets et qui est capable d'induire c-Fos, ou encore c-myc. Ainsi, JNK active c-Jun, ATF-2 et Elk-1. La protéine p38 active, quant à elle, ATF-2 et Elk-1 et le facteur ERK est responsable de l'activation d'Elk-1 (Ferrer, 2003). Les différentes voies de signalisation faisant intervenir les MAPKs sont représentées sur la figure 8.



**Figure 8** : Schématisation des voies de signalisation des MAPKs

D'autres membres de la famille des MAPKKKs sont impliqués dans la voie de signalisation des TLRs aboutissant à l'activation des MAPKs. Ainsi, Tpl2 (Tumor progression locus kinase 2) intervient via une voie dépendante de ERK dans l'induction du

TNF- $\alpha$  par le LPS (Dumitru, 2000) et ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) active les kinases JNK et p38 (Matsuzawa, 2005). Un autre membre de la famille des MAPKKs est capable d'engendrer la stimulation de NF- $\kappa$ B via TRAF-2 : il s'agit de NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) (Malinin, 1997).

Par ailleurs, Ecsit (Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathways), qui correspond à un autre adaptateur, intervient dans l'activation de MKK1, aboutissant ainsi à la phosphorylation de JNK, p38 mais aussi IKK (Kopp, 1999).

Une autre molécule cytoplasmique à domaine TIR est impliquée dans la signalisation MyD88 dépendante. Il s'agit du cofacteur TIRAP/MAL. Il possède un domaine TIR du côté carboxy-terminal mais aucun domaine DD du côté N-terminal contrairement à MyD88. Il joue le rôle de cofacteur de MyD88 en aval de TLR-2 et TLR-4 (Hornig, 2002 ; Yamamoto, 2002).

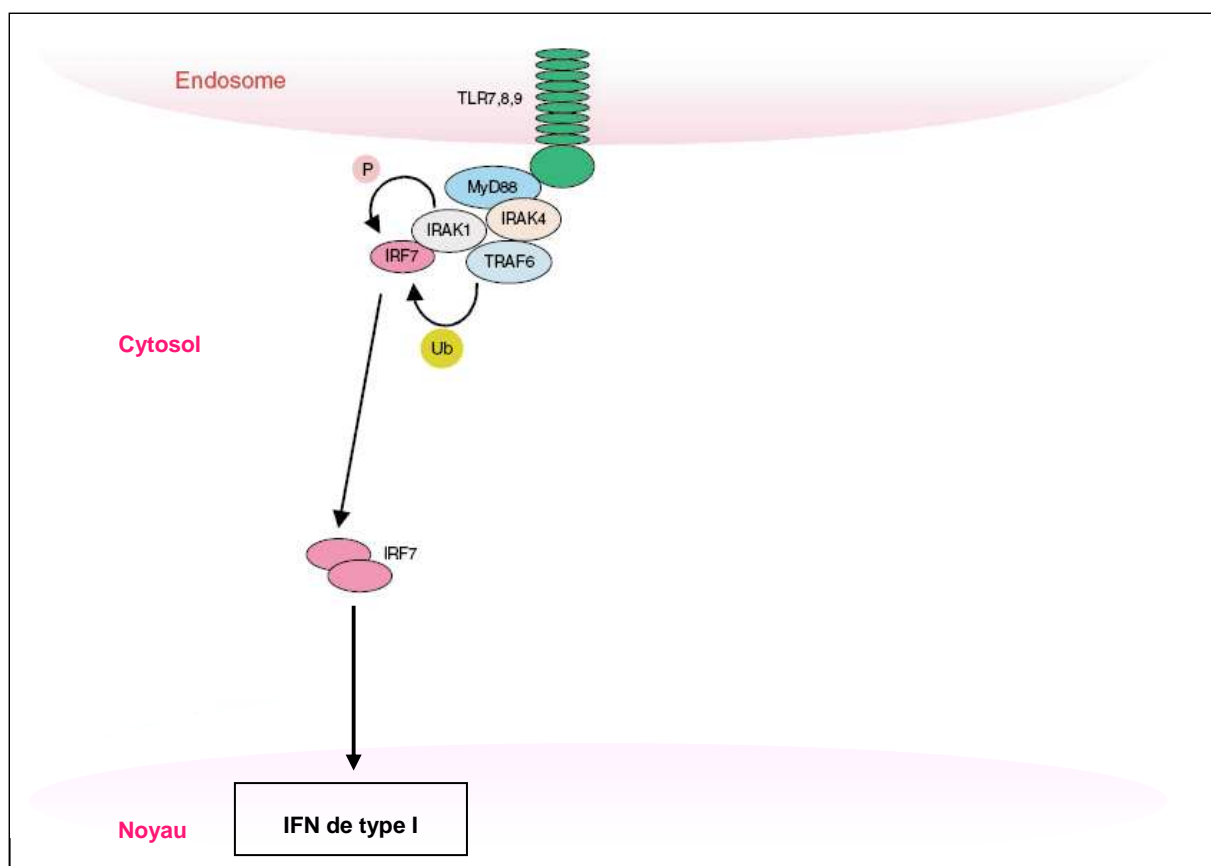
Finalement, NF- $\kappa$ B et les facteurs de transcription induits par les MAPKs régulent l'expression inductible de gènes codant pour des cytokines impliquées dans l'inflammation telles que l'IL-8, le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha) et l'IL-12, ou encore des molécules d'adhésion comme ICAM-1, des molécules chimioattractives, des protéines anti-apoptotiques et des enzymes comme iNOS et COX-2 (Boldrick, 2002) ainsi que les molécules costimulatrices CD80 et CD86 (Medzhitov, 1997).

#### ∞ Voies conduisant à l'activation des facteurs IRF

Les protéines IRFs constituent une famille de facteurs de transcription capables de reconnaître la région ISRE (IFN-stimulated response elements) du promoteur des gènes induits par ces IFN. Une fois phosphorylés, ces facteurs de transcription forment des hétérodimères, sont transloqués vers le noyau et se lient aux régions ISRE ce qui déclenche l'expression de l'interféron de type I et/ou de gènes induits par l'interféron (Akira, 2006).

- **Induction d'IFN de type I via IRF-7 (figure 9)**





**Figure 9** : Schématisation des voies de signalisation impliquant IRF-7 (adapté de Kawai, 2006)

La stimulation des TLR-7, -8 et -9 peut également conduire à la production d'IFN de type I via IRF-7. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, en particulier, peuvent produire des quantités importantes d'IFN de type I en réponse à une infection virale. TRAF-6 et MyD88 interagissent directement avec IRF-7. IRAK-1 est ensuite recruté ce qui conduit à la phosphorylation d'IRF-7 et donc à son activation (Honda, 2005 ; Kawai, 2004).

- **Production de cytokines pro-inflammatoires indépendante de NF- $\kappa$ B et des MAPKs via IRF-5**

Un autre membre de la famille des facteurs IRF intervient au cours de la voie de signalisation MyD88 dépendante et engendre la production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$ , IL-6, ou IL-12 via TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-7 et TLR-9. Il s'agit d'IRF-5. En effet, la production de cytokines pro-inflammatoires est altérée dans des cellules de souris IRF5 -/- (Moynagh, 2005).

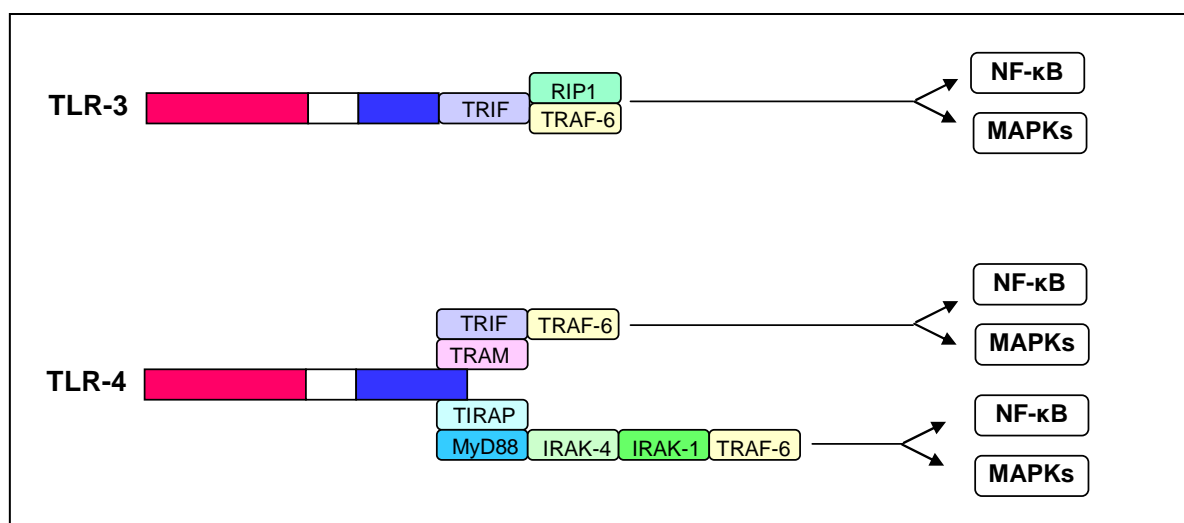
De la même façon qu'IRF-7, IRF-5 s'associe avec le complexe MyD88 et TRAF-6 (Takaoka, 2005). Des travaux ont en outre montré qu'IRF-5 est exprimé au niveau des cellules B (Barnes, 2001).

#### IV.4.2 - Voie de signalisation MyD88 indépendante

Cette voie conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et des MAPKs (avec une cinétique plus lente que MyD88) mais également du facteur IRF-3, débouchant ainsi sur la production d'IFN- $\beta$  (Hoebe, 2003 ; Yamamoto, 2003) et sur l'induction des gènes dépendants des IFN (Kawai, 2001).

##### ∞ Voie conduisant à l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPKs

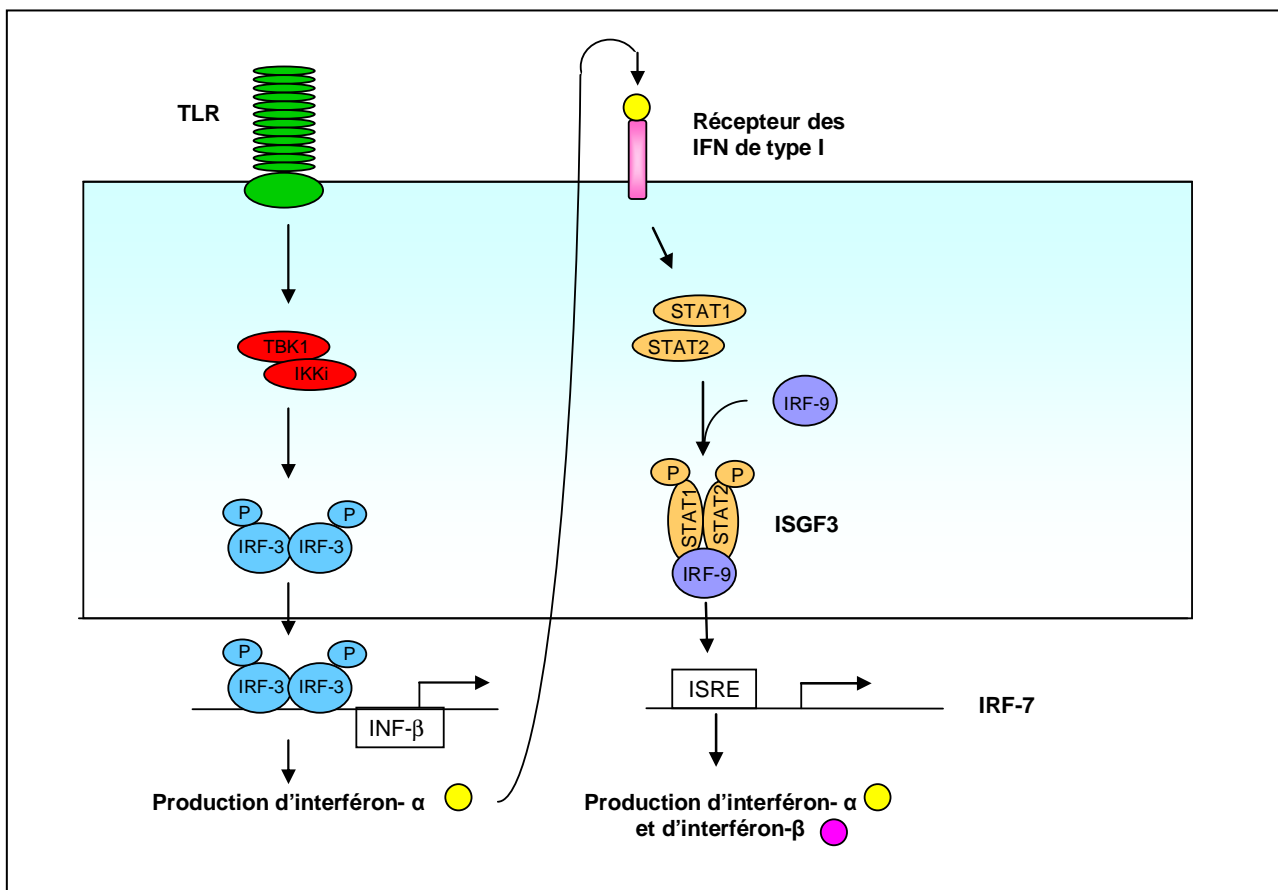
Il existe aussi une voie de signalisation indépendante de MyD88 pour TLR-3 et TLR-4. En effet, il a été montré que dans le cas de souris MyD88<sup>-/-</sup>, l'induction de NF- $\kappa$ B en réponse au LPS ou au dsRNA n'est pas abolie mais retardée. Pourtant, la maturation des cellules dendritiques de ces souris se traduisant par l'induction de molécules costimulatrices n'est pas affectée (Alexopoulou, 2001). Cette voie utilise une autre molécule à domaine TIR, connue sous le nom de TRIF ou TICAM-1, pour initier la transduction du signal. TRIF interagit directement avec TRAF-6 via ces 3 domaines de liaison (figure 10).



**Figure 10** : Schématisation des voies de signalisation impliquant TLR-3 et TLR-4 et aboutissant à l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPKs

De plus, dans le cas de TLR-3, il a été montré que TRAF-6 contient un motif RHIM (Rip homotypic interaction motif) qui lui permet d'interagir avec les protéines de la famille RIP telles que RIP1 et RIP3. Dans le cas de souris déficientes en RIP1, des études ont montré que l'activation de NF- $\kappa$ B via TLR-3 était abolie. L'interaction RIP1/TRIF est donc responsable de l'induction de NF- $\kappa$ B dans la voie de signalisation faisant intervenir TLR-3. De plus, le rôle de RIP3 n'est pas complètement élucidé : il régulerait de façon négative l'activation de NF- $\kappa$ B (Meylan, 2004) (figure 10).

La protéine TRAM, fonctionne comme un cofacteur de TRIF en aval de TLR-4 mais pas de TLR-3 dans la voie de signalisation MyD88 indépendante (Yamamoto, 2003). En effet, la production d'IFN- $\beta$  via TLR-4 et les cascades de signalisation sont abolies dans le cas de souris déficientes pour TRAM (Yamamoto, 2003) (figure 11).



**Figure 11** : Schématisation de la production d'interféron de type I via IRF-3 et IRF-7

### ∞ Voies conduisant à l'activation des facteurs IRF

L'activation de TLR-3 et TLR-4 peut conduire à l'activation d'IRF-3 dans la voie de signalisation MyD88 indépendante (Moynagh, 2005) ainsi que d'IRF-7 (Taniguchi, 2002 ; Honda, 2005). Contrairement à IRF-3 qui est constitutivement exprimé dans le cytoplasme de la plupart des cellules et qui induit l'expression d'interféron- $\beta$  (Hiscott, 1999) et de chemokines (Lin, 1999), l'expression d'IRF-7 qui est restreinte aux cellules lymphoïdes peut être induite, dans les autres cellules, par une stimulation d'IFN de type I via IRF-3 et conduit à l'expression d'IFN- $\alpha$  et d'IFN- $\beta$  (Au, 1998). La stimulation des TLRs entraîne la phosphorylation de la partie C terminale d'IRF-3 ce qui aboutit à un changement de conformation, à son homodimérisation puis à sa dimérisation avec des motifs ISRE présents dans le promoteur des gènes IFN- $\beta$ . Cela conduit alors à l'activation d'un facteur de transcription appelé ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3), constitué de STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), STAT2 et IRF-9. ISGF3 induit à son tour l'expression d'IRF-7 (Nakaya, 2001) (figure 10).

Les kinases TBK1 (TANK-binding kinase 1) également connues sous le nom T2K ou NAK (NF- $\kappa$ B-activating kinase) et IKK-i (inducible I $\kappa$ B kinase) également appelée IKK- $\epsilon$  ont été identifiées comme des kinases phosphorylant IRF-3 et IRF-7 (Fitzgerald, 2003; Sharma, 2003). Des études expérimentales réalisées chez des souris TBK1 *-/-* et IKK*i* *-/-* ont montré que ces kinases sont responsables des réponses IFN médiées par TRIF (Hemmi, 2004 ; McWhirter, 2004; Perry, 2004). En outre, la protéine NAP1 est une protéine qui se lie à TRIF et qui pourrait induire l'oligomérisation et l'activation de TBK1. L'induction d'interféron- $\beta$  par TLR-3 et TLR-4 est donc médiée par une voie de signalisation faisant intervenir la voie de signalisation TRAM-TRIF-NAP1-TBK1 (Sasai, 2005). Par ailleurs, une association de TRAF-3 avec TRIF et IRAK-1 a été rapportée (Häcker, 2006 ; Oganessian, 2006).

De plus, indépendamment de TRIF, l'activation de TLR-3 induit la phosphorylation de deux résidus tyrosine et le recrutement de PI3K. Celle-ci, au travers de la voie de signalisation PI3K/Akt est également responsable de l'activation du facteur de transcription IRF-3. Bien que non essentielle, cette voie contribue à l'activation maximale de l'IRF-3 (Sarkar, 2004).

L'activation de IRF-3 via TLR-4 peut utiliser une autre voie de signalisation. En effet, la sous unité p65 de NF- $\kappa$ B a été détectée au niveau des complexes ISRE après activation via TLR-4 mais pas via TLR-3. Ces résultats indiquent par conséquent que l'activation des ISRE médiée par IRF-3 via TLR-4 nécessite la sous unité p65 de NF- $\kappa$ B (Wietek, 2003).

## IV.5 - Expression des TLRs

### IV.5.1 - Localisation cellulaire

Les TLRs présentent une localisation différente selon les ligands qu'ils reconnaissent et la cellule dans laquelle ils sont exprimés. Ainsi, les TLRs qui sont activés par les PAMPs bactériens et fongiques (c'est à dire TLR-1, -2, -4, -5 et -6) sont exprimés à la surface cellulaire (Hopkins, 2005 ; Takeda, 2003). Il est important de noter que ces TLRs peuvent aussi être exprimés dans l'appareil de Golgi. Cette expression n'est pas nécessaire pour la signalisation par ces récepteurs mais représente un pool latent de TLRs (Latz, 2002).

Les TLRs impliqués dans la réponse aux acides nucléiques (TLR-3, -7, -8, -9) sont exprimés dans les vésicules endosomales (Hopkins, 2005 ; Takeda, 2003). Les produits issus des bactéries et virus qui utilisent cette voie pour pénétrer chez l'hôte ou qui sont capturés par phagocytose sont alors détectés dans ces compartiments par les TLRs correspondants.

TLR-3 constitue un cas particulier puisque sa localisation cellulaire dépend de la cellule dans laquelle il est exprimé. En effet, dans des lignées cellulaires fibroblastiques humaines, des données expérimentales ont démontré son expression à la surface cellulaire (Matsumoto, 2002), alors qu'il est exprimé au niveau des vésicules endosomales dans les cellules dendritiques humaines d'origine myéloïde (Matsumoto, 2003). Sa localisation dépendrait d'une région cytoplasmique appelée "région linker" située dans la boîte 3 du domaine TIR (Funami, 2004 ; Nishiya, 2005). Cette région n'est pas conservée entre les différents TLRs. Ainsi, il a été rapporté que le signal de localisation cellulaire de TLR-7 se trouve dans le domaine transmembranaire (Nishiya, 2005). En raison de la forte homologie de cette région entre TLR-7, -8, et -9, il a été postulé que TLR-8 et TLR-9 sont également localisés au niveau des vésicules endosomales du fait du signal contenu dans leur domaine transmembranaire (Takeda, 2003 ; Nishiya, 2005).

### IV.5.2 - Expression cellulaire et tissulaire

Les TLRs sont exprimés au niveau d'un grand nombre de cellules et de tissus incluant les cellules endothéliales, les monocytes et les cellules présentatrices d'antigènes comme les

cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B (Janeway, 2002). L'expression des différents TLRs varie de façon importante en fonction du type et du niveau d'activation cellulaire. Ainsi, les monocytes et les macrophages expriment tous les TLRs sauf TLR-3 alors que dans le cas des cellules dendritiques, l'expression de ces PRRs dépend de la sous-population des cellules dendritiques (Hopkins, 2005 ; Takeda, 2003 ; Zarembek, 2002 ; Muzio, 2000).

# **OBJECTIFS**

Dans le cadre de la LLC-B, différents travaux portant sur des protocoles de vaccination anti-tumorale ont montré la possibilité d'induire, *in vitro*, une réponse cellulaire spécifique des cellules tumorales (Trojan, 2000 ; Harig, 2001 ; Vuillier, 2003). Toutefois, malgré la présence de CTLs, les cellules tumorales survivent souvent en raison de leur faible immunogénicité.

*L'objectif principal de cette étude est d'augmenter l'immunogénicité des cellules B tumorales en les transformant en cellules présentatrices efficaces de leur propre idiotype et capables d'induire des réponses de type TH1 et cytotoxiques. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser comme stratégie adjuvante une activation par des agonistes des TLRs.*

Le travail présenté ici a tout d'abord consisté en l'**étude du profil d'expression des TLRs** en cytométrie de flux, à l'aide d'un panel extensif d'anticorps spécifiques. Cette étude a comparé les profils d'expression au niveau de lymphocytes B circulants et de lymphocytes B amygdaliens issus d'individus sains, et au niveau de cellules B de LLC-B.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'**effet de la stimulation avec les ligands des TLRs** exprimés au niveau des lymphocytes B tumoraux et comparé les résultats obtenus à ceux résultant de la même stimulation sur des lymphocytes B sains amygdaliens. Pour ce faire, cinq approches ont été utilisées :

- ◆ une analyse en cytométrie de flux des niveaux d'expression des molécules de costimulation et de présentation a permis de déterminer les conditions de stimulation optimales.
- ◆ une analyse cytomorphologique de manière à étudier l'aspect des cellules après stimulation.
- ◆ la méthode TUNEL pour évaluer l'apoptose de ces cellules B.
- ◆ l'analyse séquentielle d'un marquage au CFSE (carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester) pour mesurer la prolifération cellulaire.
- ◆ une étude de la sécrétion de cytokines, en cytométrie de flux, à partir de surnageants de culture de lymphocytes B tumoraux ou sains, stimulés ou non, avec des ligands de TLRs.

Enfin, une **analyse fonctionnelle** de ces cellules, activées ou non, a été entreprise dans un modèle de stimulation allogénique pour mesurer leur capacité à activer des lymphocytes T naïfs.



# **MATERIEL ET METHODES**

# **I - PATIENTS ET PRELEVEMENTS**

## **I.1 - Cellules tumorales issues des patients**

Quarante sept patients, 17 femmes et 30 hommes, âgés de 41 à 84 ans (moyenne d'âge de  $64.7 \pm 0.3$  ans) ont été inclus dans ce projet. Ils étaient tous suivis en consultation par le Professeur Pierre Feugier dans le service d'Hématologie Adulte et Médecine Interne du Professeur Pierre Lederlin (Centre Hospitalier Universitaire de Nancy). Tous les patients ont été informés oralement de l'étude et leur consentement éclairé écrit et signé a été recueilli. Leur participation à ce travail avait été approuvée par le Comité Local d'Ethique de Nancy. Les prélèvements, constitués de 2 tubes de 6 mL de sang total prélevé sur EDTA, ont été réalisés dans le cadre habituel des bilans sanguins nécessaires pour l'exploration et le suivi des LLC-B. Tous les stades de Binet ont été considérés afin d'évaluer de possibles différences entre les patients. Trente sept patients étaient au stade A, 3 au stade B et 7 au stade C. Au moment de l'étude, 5 de ces patients étaient traités par du chlorambucil, du cyclophosphamide ou de la prednisone.

Les suspensions cellulaires de 18 patients ont permis de déterminer le profil d'expression des TLRs. L'efficacité des différents facteurs de stimulation utilisés a été analysée par une étude immunophénotypique chez 9 patients. La prolifération et l'apoptose ont également été évaluées pour ces patients. La production des cytokines a été analysée dans les surnageants de suspensions cellulaires stimulées ou non provenant de 19 patients. Enfin, une analyse fonctionnelle des capacités des lymphocytes B de patients atteints de LLC-B a été réalisée dans un modèle de stimulation allogénique chez 5 patients.

## **I.2 - Cellules saines utilisées comme témoins**

### **I.2.1 - Cellules issues du sang périphérique de volontaires sains**

Des prélèvements de sang périphérique de 28 sujets normaux, comprenant 13 femmes et 15 hommes, âgés de 21 à 59 ans (moyenne d'âge de  $40 \pm 2.3$  ans) provenant de l'EFS de

Nancy ont été inclus dans cette étude. Un consentement éclairé écrit et signé a été recueilli pour chacun de ces volontaires. Ces prélèvements ont permis de constituer le groupe témoin permettant de définir les valeurs de référence de l'expression des TLRs sur les lymphocytes B.

### I.2.2 - Cellules amygdaliennes

Les amygdales constituent une source importante de lymphocytes B matures où ils représentent 50 à 60% des cellules totales. Nous avons choisi de nous intéresser aux organes lymphoïdes secondaires que constituent les amygdales palatines qui, par leur emplacement, sont mises en cause lors d'infections à répétition ou peuvent présenter chez le jeune enfant une hypertrophie gênante conduisant à prescrire leur ablation.

Les amygdales palatines obtenues lors d'une amygdalectomie thérapeutique chez 32 enfants âgés de 1 à 10 ans (moyenne d'âge de  $4.6 \pm 0.3$  ans) ont été incluses dans cette étude. Douze prélèvements ont permis de définir les valeurs de référence de l'expression des TLRs sur les lymphocytes B. D'autre part, l'effet de la stimulation des différents TLRs a été testé par une analyse en cytométrie de flux de l'expression des signaux de costimulation, de la prolifération cellulaire et de l'apoptose sur 24 spécimens. La production des cytokines a été analysée dans les surnageants de suspensions cellulaires d'amygdales palatines stimulées ou non provenant de 18 patients. L'efficacité des signaux d'activation a ensuite été évaluée dans un modèle de stimulation allogénique à partir des cellules de 6 sujets.

#### ∞ *Méthode*

Les amygdales, enveloppées dans une compresse imbibée de sérum physiologique, ont été acheminées au laboratoire immédiatement après l'intervention chirurgicale. Un fragment d'environ  $0.5 \text{ cm}^3$  a été prélevé sur chaque échantillon de tissu frais et émincé à l'aide de ciseaux dans du RPMI 1640 (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Les cellules ont été dissociées en utilisant un Potter en verre et les lymphocytes amygdaliens ont été isolés par centrifugation sur gradient de densité comme décrit dans le paragraphe I.4.

### I.3 - Les cellules répondantes

Des concentrés leuco-plaquettaires provenant de l'EFS du Centre Hospitalier

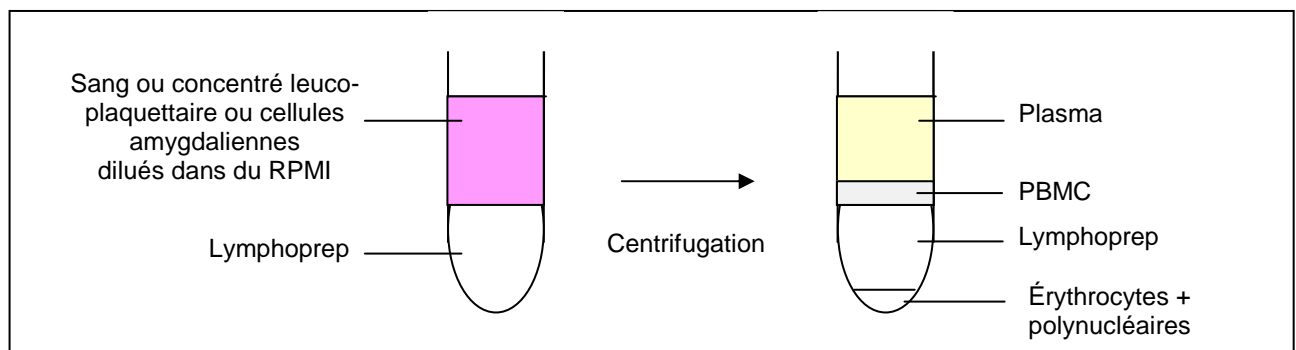
Universitaire de Nancy ont été obtenus à partir de volontaires supposés sains. Les cellules de 22 patients ont été utilisées comme cellules répondantes dans les réactions mixtes lymphocytaires.

## **I.4 - Isolement des cellules**

La séparation des lymphocytes à partir de sang périphérique, de concentrés leucoplaquettaires ou de suspensions cellulaires amygdaliennes a été réalisée par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque.

### **I.4.1 - Principe**

Cette technique repose sur les différences de densité que présentent les globules rouges, les polynucléaires, les lymphocytes et les monocytes. Les éléments figurés du sang, placés sur un milieu Ficoll-Hypaque de densité 1.077, correspondant à la densité des lymphocytes, subissent durant la centrifugation une migration différentielle qui conduit à leur séparation en plusieurs fractions. A l'interface entre le sang et le Ficoll-Hypaque, les érythrocytes sont agrégés en raison du grand nombre de polymères que contient le Ficoll-Hypaque. La densité des agrégats étant supérieure à celle du Ficoll-Hypaque, les érythrocytes sédimentent au fond du tube. La densité des granulocytes (plus sensibles que les lymphocytes aux variations de pression osmotique) s'élève dans une solution hyperosmotique et par conséquent ces polynucléaires sédimentent également au fond du tube. Les lymphocytes restent à l'interface échantillon/milieu de sédimentation et se rassemblent en un anneau opaque surnageant au dessus du Ficoll-Hypaque. Les monocytes se retrouvent dans la phase supérieure qui contient également le plasma riche en plaquettes (figure 12) (Boyum, 1976).



**Figure 12** : Séparation des lymphocytes d'une suspension cellulaire par gradient de Ficoll-Hypaque

## I.4.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Jouan, St Herblain, France)

## I.4.3 - Réactifs

- Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norvège)
- RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine et en bicarbonate de sodium (Sigma)
- Ultrosor (Gibco, Paisley, Ecosse)
- Hapes (Eurobio, Paris, France)
- Sérum de veau fœtal ou SVF (PAA Laboratories GmbH, Pasing, Autriche)
- Mélange d'antibiotiques (pénicilline (10000 U/mL), streptomycine (10000 µg/mL), fungizone (25 µg/mL) (Gibco-BRL-Life Technologies, Rockville, Maryland, USA)
- Solution de Hank's (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma)

## I.4.4 - Méthode

Environ 10 mL de suspension cellulaire amygdalienne ou de sang total périphérique dilués au demi dans du RPMI 1640 ou 5 mL de concentré leuco-plaquettaire dilué au quart

sont déposés doucement sur 10 mL de Ficoll-Hypaque sans mélanger les 2 phases. L'ensemble est centrifugé à 600 g pendant 30 minutes à température ambiante. Les lymphocytes sont ensuite recueillis en prélevant l'anneau cellulaire formé à l'interface et lavés deux fois dans du RPMI 1640.

Une numération des cellules contenue dans la suspension finale est réalisée. Pour les cultures cellulaires, les suspensions cellulaires ont été ajustées à  $5 \times 10^6$  cellules/mL dans du RPMI 1640 supplémenté avec 2% d'Ultrosor ou 10% de SVF selon les expériences réalisées, en présence d'1% d'Hepes et d'1% d'antibiotiques. Pour l'immunophénotypage des cellules B de LLC-B à J0 et l'étude du profil d'expression des TLRs, les suspensions cellulaires obtenues après isolement sur Ficoll-Hypaque ont été remises en suspension à la concentration de  $5 \times 10^6$  cellules/mL dans du milieu de Hank's.

## **II - EXPLORATIONS PHENOTYPIQUES ET FONCTIONNELLES EN CYTOMETRIE DE FLUX**

### **II.1 - Cytométrie de flux**

L'immunophénotypage des cellules de LLC-B, l'étude du profil d'expression des TLRs, l'immunophénotypage des cellules B amygdaliennes et tumorales avant et après stimulation, l'analyse de l'apoptose et de la prolifération de ces cellules, le dosage des cytokines dans les surnageants de culture des suspensions cellulaires stimulées ou non ainsi que le phénotypage des lymphocytes T après culture mixte lymphocytaire ont été réalisés par cytométrie de flux.

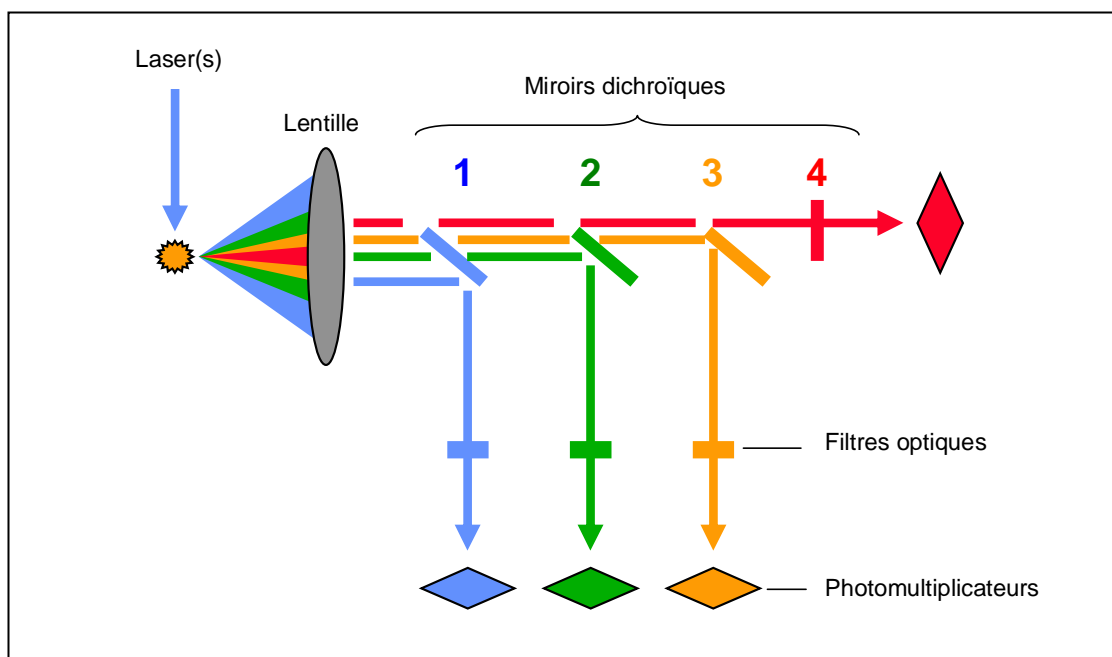
#### **II.1.1 - Principe**

Cette technique permet une analyse qualitative et quantitative précise de cellules marquées de manière directe ou indirecte par des anticorps conjugués à un ou plusieurs fluorochromes.

L'analyse est réalisée dans un système fluide très fin sous pression. Les cellules en suspension sont guidées dans un fin capillaire de liquide de gaine, où elles vont, l'une après

l'autre, traverser le faisceau d'un laser émettant une lumière cohérente à une longueur d'onde spécifique permettant d'exciter le ou les fluorochromes présents sur/dans chaque cellule. Les fluorochromes ainsi excités émettent un signal lumineux dans une longueur d'onde spécifique de chacun d'eux.

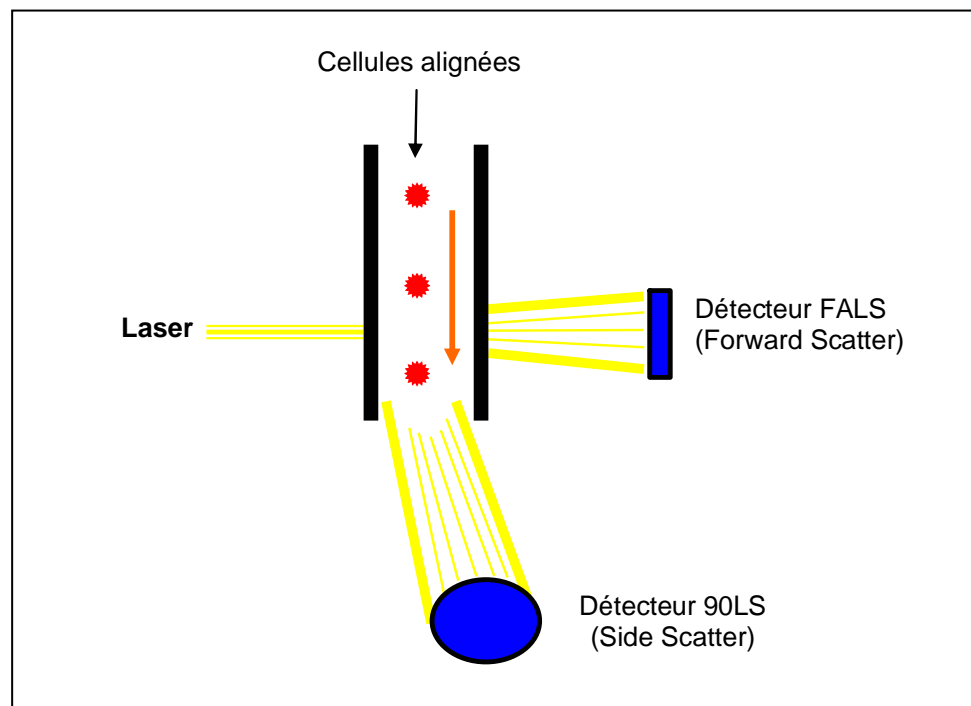
Les signaux optiques émis par chaque cellule sont focalisés et séparés par des circuits de miroirs dichroïques puis acheminés vers les systèmes de détection qui sont des photomultiplicateurs permettant de convertir les signaux optiques en signaux électriques. Des filtres optiques sont placés avant ces détecteurs et permettent de séparer dans le rayonnement émis les différentes longueurs d'onde de façon à ce que seules la longueur d'onde correspondant à l'émission d'un fluorochrome spécifique soit recueillie par chaque détecteur : par exemple, comme l'isothiocyanate de fluorescéine émet dans le vert, un filtre absorbant à 525 nm est utilisé (figure 13).



**Figure 13** : Représentation schématique du système de la fluorescence du cytomètre de flux (adapté de <http://www.cardiff.ac.uk/medic/aboutus/departments/haematology/resources/biomed04.ppt#306,11>, Diapositive 11)

Chacun des fluorochromes va donc émettre une fluorescence qui sera séparée et transformée en signal électrique. Son intensité, exprimée par un numéro de canal, sera convertie en valeurs numériques qui seront analysées sur un ordinateur : on visualisera les résultats sur un écran par des histogrammes.

Hormis la fluorescence, d'autres propriétés de la cellule sont analysées. La lumière diffractée selon le même axe que la lumière du laser est détectée dans le canal "Forward Scatter" (FS). Cette valeur est proportionnelle à la taille de la cellule analysée et peut donc permettre de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Les signaux indésirables tels que les débris cellulaires peuvent ainsi être exclus de l'analyse. La lumière diffractée selon un axe perpendiculaire au trajet de la lumière du laser est quant à elle détectée dans le canal "Side Scatter" (SS) et témoigne du contenu de la cellule (figure 14).



**Figure 14** : Principe de détection du "Forward Scatter" (FS) et du "Side Scatter" (SS)

(adapté de <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/theory/fluiopti/sld035.htm>)

Ce signal dépend ainsi du rapport nucléocytoplasmique, des granulations cytoplasmiques et de la réfringence de la cellule. Ce paramètre analyse la diffraction du laser liée aux organites intracellulaires. Il reflète l'aspect plus ou moins granuleux du cytoplasme des cellules.

L'affichage simultané des paramètres FS, SS traités par le logiciel, visualise chaque cellule sur l'écran sous forme de point. C'est le cytogramme, nuage de signaux punctiformes, qui apparaît. La formation d'un nuage de points plus dense permet de placer une fenêtre d'intérêt englobant la population cellulaire à étudier.



Pour une même cellule, plusieurs paramètres de morphologie et de fluorescence sont enregistrés simultanément. L'analyse peut donc se faire selon un paramètre donné (analyse monoparamétrique) ou en associant deux paramètres (analyse biparamétrique) accompagnés pour chacun d'une liste des statistiques afférentes. Cette dernière peut contenir pour chaque sous-population cellulaire sélectionnée le nombre de cellules, le pourcentage par rapport au total ou à un fenêtrage spécifique, la valeur moyenne de chacun des paramètres analysés, le pic de fluorescence ou encore les coefficients de variation.

## **II.2 - Immunophénotypage des LLC-B**

### **II.2.1 - Principe**

L'analyse immunophénotypique des lymphocytes B tumoraux a été réalisée, par cytométrie de flux, après marquage direct ou indirect à l'aide d'un panel étendu d'immunophénotypage des LLC-B permettant notamment de classer les patients selon les critères de Matutes (Matutes, 1994). D'autre part, la proportion de lymphocytes T a été évaluée par quadruple marquage direct et l'absence de cellules myéloïdes a été vérifiée par l'utilisation des anticorps monoclonaux anti-CD14, CD13 et CD33.

L'expression des différentes molécules recherchées a été déterminée en relevant, d'une part, le pourcentage des sous-populations de cellules positives pour chaque marqueur étudié et également la moyenne de l'intensité de fluorescence de ces événements (MFI : Mean Fluorescence Intensity).

### **II.2.2 - Matériel**

- Centrifugeuse (Jouan, St Herblain, France)
- Station de travail Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter)
- Cytomètre de flux (FC 500, Beckman Coulter, Fullerton, Californie, USA)

## II.2.3 - Réactifs

- Phosphate Buffered Saline (PBS) : NaCl 140mM (NORMAPUR®, Prolabo, Paris, France), KCl 2,5mM (Prolabo), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM (Acros Organics, New-Jersey, USA), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O 10mM (Merck Eurolab Polylabo, Créteil, France)
- SVF (PAA Laboratories)
- Milieu de Hank's (Sigma)
- Anticorps de lapin anti-immunoglobulines de souris couplé à la fluorescéine (Dako, Glostrup, Danemark)
- Paraformaldéhyde (Sigma)

Les anticorps monoclonaux utilisés sont indiqués dans le tableau 8.

**Tableau 7** Liste des anticorps monoclonaux utilisés pour l'immunophénotypage des patients atteints de LLC-B

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Isotype (espèce)</b>	<b>Fabricant</b>
CD19-FITC (fluorescein isothiocyanate)	J4.119	IgG1 (souris)	Beckman-Coulter, Miami, Floride, USA
CD5-PE (phycoerythrin)	BL1A	IgG2a (souris)	
CD45-FITC	B3821F4A	IgG2b (souris)	Beckman-Coulter
CD4-RD1 (rhodamine)	SFCI12T4D11	IgG1 (souris)	
CD8-ECD (phycoerythrin-texas red)	SFCI21Thy2D3	IgG1 (souris)	
CD3-PC5 (phycoerythrin-cyanin 5)	UCHT1	IgG1 (souris)	
FMC7-FITC	FMC7	IgM (souris)	Beckman-Coulter
CD13	SJ1D1	IgG1k (souris)	Beckman-Coulter
CD14	My4	IgG2b (souris)	Beckman-Coulter
CD33	My9	IgG2b (souris)	Beckman-Coulter
CD22	SJ10.1H11	IgG1 (souris)	Beckman-Coulter
CD23	M-L233	IgG1k (souris)	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New-Jersey, USA
CD79b-FITC	SN8	IgG1k (souris)	Dako Cytomation, Glostrup, Danemark
Fab-FITC		IgG (chèvre)	Nordic Immunology, Tilburg, Pays- Bas

## II.2.4 - Méthode

### ∞ *Immunophénotypage des lymphocytes tumoraux par double marquage CD19/CD5*

L'étude de la coexpression CD19/CD5 est réalisée sur sang total avec un anticorps anti-CD19 couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine et un anticorps anti-CD5 couplé à la phycoérythrine.

Cinquante  $\mu\text{L}$  de sang périphérique de patients atteints de LLC-B ont été incubés 30 minutes à  $4^\circ\text{C}$  avec 5  $\mu\text{L}$  du mélange d'anticorps monoclonaux d'intérêt. Les globules rouges ont ensuite été lysés grâce à la station de travail Coulter Q-Prep. Ce système présente l'avantage de permettre la lyse des érythrocytes et la fixation des leucocytes en trois étapes parfaitement chronométrées. Il s'agit d'un système automatisé qui permet l'addition séquentielle :

- d'acide formique (1.2 mg/L) jouant le rôle d'agent de lyse.
- de carbonate de sodium (6 g/L) / chlorure de sodium (14.5 g/L) / sulfate de sodium (31.3 g/L) : cette solution tampon joue le rôle de stabilisateur et neutralise la lyse formique.
- de paraformaldéhyde (10 g/L) qui permet de fixer les cellules.

Les échantillons ont ensuite été conservés à  $4^\circ\text{C}$  à l'obscurité avant d'être analysés par cytométrie de flux.

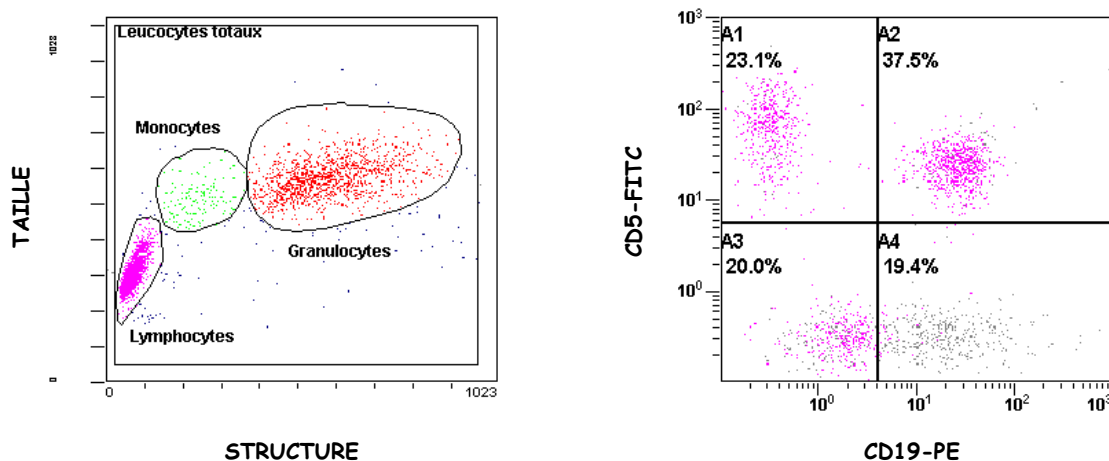
Les données ont été analysées à l'aide des histogrammes suivants :

- **un histogramme biparamétrique Structure/Taille** qui donne accès à des informations sur la taille et la morphologie de la cellule. Sur ce cytogramme ou scattergramme, chaque cellule est représentée par un point dont les coordonnées indiquent la granularité cellulaire en abscisse et la taille de la cellule en ordonnée. La corrélation de ces deux paramètres permet de différencier les 3 sous-populations leucocytaires (lymphocytes, monocytes et granulocytes) qui apparaissent sous forme de nuages de points autour desquels sont définies des fenêtres d'intérêt. Les polynucléaires ont une granulosité supérieure à celle des monocytes pour une taille quasiment équivalente. Les lymphocytes ont une taille et une granularité inférieure à celles des deux autres populations leucocytaires. Les signaux indésirables tels que

les débris cellulaires peuvent être détectés et exclus de l'analyse sur leurs critères de petite taille et faible granularité. De la même façon, les agrégats situés très haut dans la partie supérieure de l'écran peuvent être exclus de la région à étudier. Une fenêtre d'intérêt (ou Bitmap) a été placée au niveau de chacune des 3 sous-populations. Seules les cellules contenues dans la Bitmap "lymphocytes" ont été étudiées dans la suite des analyses.

- **un histogramme biparamétrique FITC/PE** : cet histogramme permet de différencier, au niveau des lymphocytes, les populations cellulaires marquées en FITC (FL1) (quadrant A1), en PE (FL2) (quadrant A1) ou à la fois en FITC et PE (quadrant A2), ce qui correspond aux cellules exprimant à la fois CD19 et CD5.

Un exemple de l'ensemble de ces histogrammes est présenté dans la figure 15.



**Figure 15** : Exemple d'histogrammes biparamétriques utilisés pour l'immunophénotypage des lymphocytes B tumoraux par double marquage CD19/CD5

Les valeurs relevées étaient le pourcentage de lymphocytes marqués pour chaque molécule d'intérêt et la moyenne d'intensité de fluorescence de chacune des populations simplement marquée, doublement marquée ou non marquée, caractéristique de la densité antigénique de chaque marqueur sur les cellules.

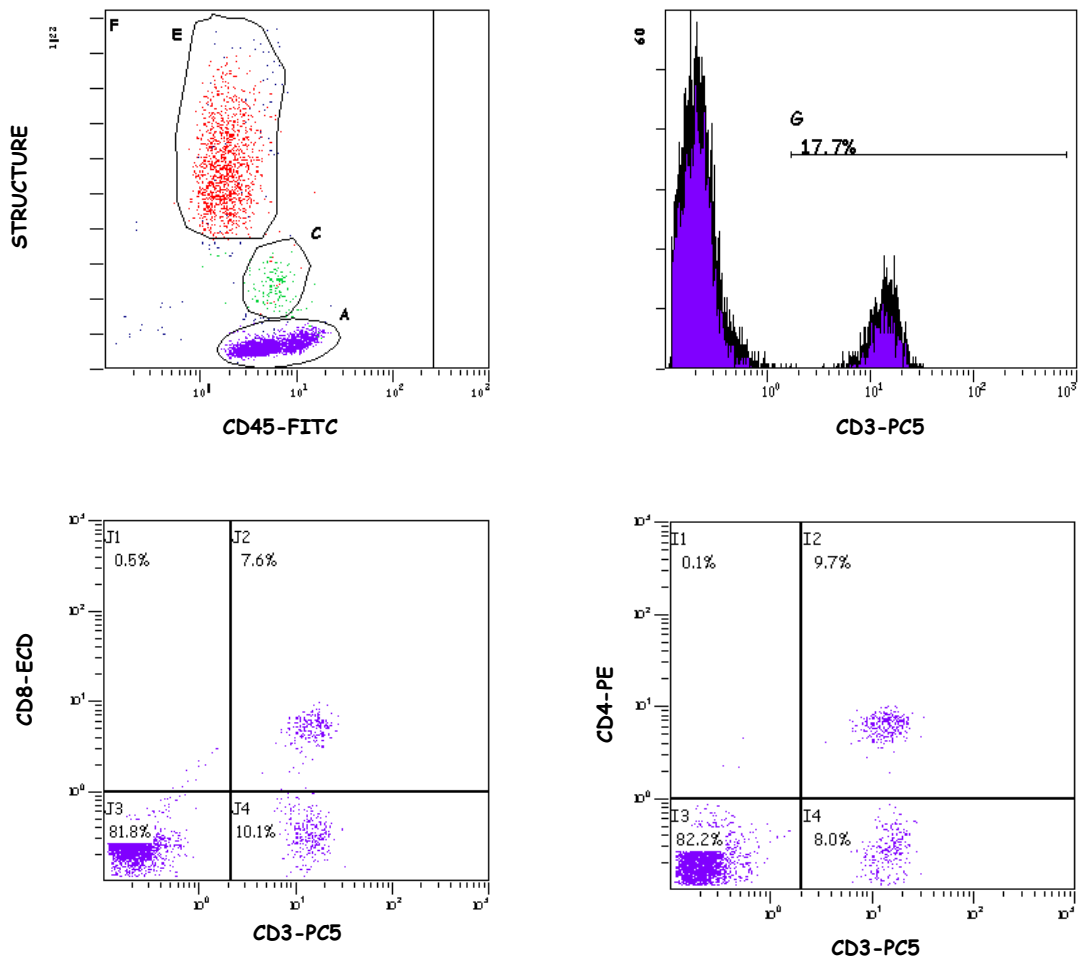
*∞ Immunophénotypage des lymphocytes T par quadruple marquage (CD45/CD3/CD4/CD8)*

L'immunophénotypage des lymphocytes T a été réalisé selon une stratégie similaire à l'aide d'un mélange d'anticorps monoclonaux conjugués à des fluorochromes différents.

Les histogrammes suivants ont été générés pour chaque prélèvement étudié :

- **un histogramme biparamétrique CD45/Taille** qui exprime la taille des cellules en fonction du logarithme de l'intensité de fluorescence CD45-FITC. Cet histogramme permet de repérer et d'analyser les lymphocytes qui sont les leucocytes exprimant le plus fortement cette molécule en définissant les contours d'une Bitmap appelée Bitmap A. Seules les cellules contenues dans cette Bitmap ont été étudiées dans la suite des analyses.
- **un histogramme monoparamétrique CD3/count** permettant de comptabiliser le nombre de cellules exprimant le marqueur CD3-PC5 au sein des lymphocytes de la Bitmap A.
- **un histogramme biparamétrique CD3/CD8** permettant de déterminer le pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD3 (quadrant J4), le marqueur CD8-ECD (quadrant J1) et les cellules doublement marquées exprimant à la fois les marqueurs CD3 et CD8 (quadrant J2).
- **un histogramme biparamétrique CD3/CD4** permettant de déterminer le pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD3 (cadre I4), le marqueur CD4-RD1 (quadrant I1) et les cellules doublement marquées exprimant à la fois les marqueurs CD3 et CD4 (quadrant I2).

Un exemple de l'ensemble de ces histogrammes est présenté dans la figure 16.



**Figure 16** : Exemple d’histogrammes monoparamétrique et biparamétriques utilisés pour l’immunophénotypage des lymphocytes T par quadruple marquage

∞ *Immunophénotypage des lymphocytes tumoraux par simple marquage*

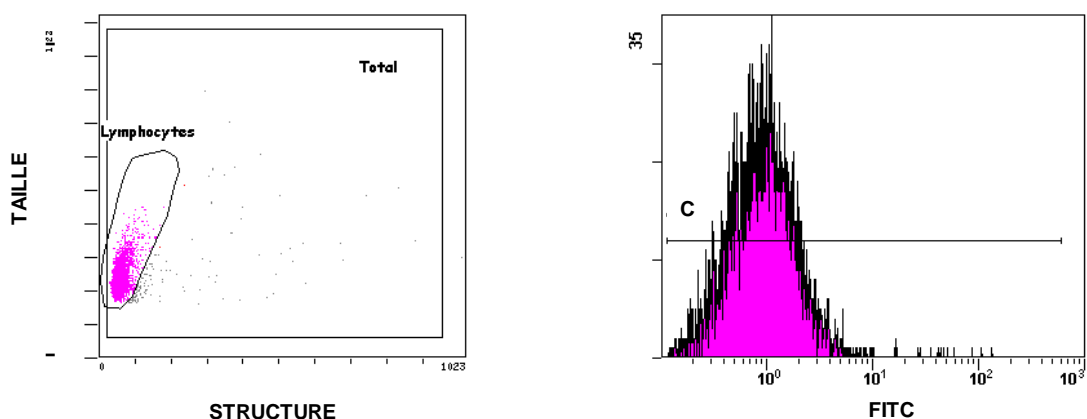
Pour les marquages indirects réalisés avec des anticorps monoclonaux non conjugués à un fluorochrome (CD20, CD22, CD23, CD79 $\beta$ , CD14, CD13 et CD33), 50  $\mu$ L de suspension cellulaire obtenue après isolement des PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) ont d’abord été incubés avec 5  $\mu$ L d’un anticorps primaire non-conjugué dirigé contre la molécule étudiée. Après lavage avec 1 mL de solution de rinçage constituée de Hank’s supplémenté avec 0.1% de SVF, les échantillons ont été centrifugés 5 minutes à 600 g puis incubés avec 10  $\mu$ L d’une solution contenant un anticorps secondaire de lapin anti-immunoglobulines de souris conjugué au FITC. Un rinçage a été à nouveau effectué et 300  $\mu$ L de paraformaldéhyde 1% en PBS ont été ajoutés au culot cellulaire afin de fixer les cellules. Les cellules ont été

conservées à 4°C jusqu'à leur analyse en cytométrie de flux.

Pour l'étude des marqueurs directement conjugués (anti-FMC7-FITC, anti-CD79 $\beta$ -FITC et chaînes lourdes et légères des immunoglobulines), 50  $\mu$ L d'une suspension cellulaire lymphocytaire isolée à partir du sang périphérique ont été incubés 30 minutes à 4°C dans l'obscurité en présence des anticorps conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine. Les cellules ont ensuite été lavées avec 1 mL de solution de rinçage et fixées avec 300  $\mu$ L de paraformaldéhyde 1% en PBS puis conservées à 4°C jusqu'à leur analyse en cytométrie de flux.

Pour chaque prélèvement étudié, les données ont été analysées à l'aide des histogrammes suivants (figure 17) :

- **un histogramme biparamétrique Structure/Taille** permettant d'identifier les populations cellulaires analysées et de placer la fenêtre d'intérêt englobant la population lymphocytaire.
- **un histogramme monoparamétrique FITC/Count** : il permet d'analyser la répartition de l'intensité de fluorescence dans la population cellulaire comprise dans la Bitmap retenue. Grâce à des curseurs d'intégration, il est possible de définir des sous-groupes pour lesquels sont calculés le pourcentage de cellules marquées et l'intensité de fluorescence moyenne.



**Figure 17** : Exemple d'histogrammes biparamétrique et monoparamétrique utilisés pour l'immunophénotypage des cellules de LLC-B par simple marquage direct et indirect.



## II.3 - Etude de l'expression des TLRs

### II.3.1 - Principe

Le profil d'expression des TLRs au sein des sous-populations lymphocytaires B circulantes saines et pathologiques a été étudié par un panel d'anticorps dirigés contre les différents TLRs (TLR-2 à 10). L'expression des TLRs a été déterminée au niveau des cellules B à l'aide d'un double marquage. Les TLR-2 et -4 sont exprimés à la surface cellulaire. Par contre, pour les autres TLRs (TLR-3, -6, -7, -9 et -10), un marquage intracytoplasmique a été réalisé après perméabilisation des cellules.

### II.3.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Jouan, St Herblain, France)
- Cytomètre de flux (FC 500, Beckman Coulter, Fullerton, Californie, USA)

### II.3.3 - Réactifs

- Anticorps :
  - Anti-TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6 et TLR-9-FITC (Imgenex, San Diego, Californie, USA)
  - Anti-TLR-7 et TLR-10 (Imgenex)
  - Anti-CD19-ECD (Beckman Coulter)
  - Anticorps de porc anti-lapin couplé à la fluorescéine (Dako)
- IntraStain (Dako)
- Solution de rinçage : solution de Hank's (Sigma) + 0.1% de SVF (PAA laboratoires)
- Paraformaldéhyde (Sigma) 1% en PBS

## II.3.4 - Méthodes

L'étude des différents TLRs a été réalisée, dans une première série d'analyses, au niveau des cellules B CD19<sup>+</sup> et, dans une deuxième série d'analyses, au niveau des cellules CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> et CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>-</sup>.

### ∞ *TLR-2 et TLR-4*

Cinquante µL d'une suspension cellulaire ajustée à  $5 \times 10^6$  cellules/mL ont été incubés 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec 2 µL de l'anticorps monoclonal dirigé contre le TLR étudié et soit 5 µL d'anticorps anti-CD19-ECD soit 5 µL d'anticorps anti-CD19-PC7 et 5 µL d'anti-CD5-PC5. Ces mélanges ont ensuite été lavés avec 2 mL de solution de rinçage et centrifugés 5 minutes à 600 g. Après élimination du surnageant, les cellules ont été fixées avec 300 µL de paraformaldéhyde et les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à analyse en cytométrie de flux.

### ∞ *TLR-3, TLR-6 et TLR-9*

Cinquante µL d'une suspension cellulaire ajustée à  $5 \times 10^6$  cellules/mL ont été incubés 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec soit 5 µL d'anticorps anti-CD19-ECD soit avec 5 µL d'anticorps anti-CD19-PC7 et 5 µL d'anti-CD5-PC5. Cent µL de réactif A du kit IntraStain ont ensuite été ajoutés afin de fixer les cellules et le mélange a été incubé 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Un lavage a été réalisé avec 2 mL de solution de rinçage puis 100 µL de réactif B IntraStain permettant la perméabilisation des cellules ainsi que 2 µL d'anticorps monoclonal spécifique des TLRs ont été ajoutés au culot cellulaire. Le mélange a été incubé 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Deux mL de solution de rinçage ont ensuite été ajoutés pour laver les cellules. Après élimination du surnageant, les cellules ont été fixées avec 300 µL de paraformaldéhyde et les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à analyse en cytométrie de flux.

### ∞ *TLR-7 et TLR-10*

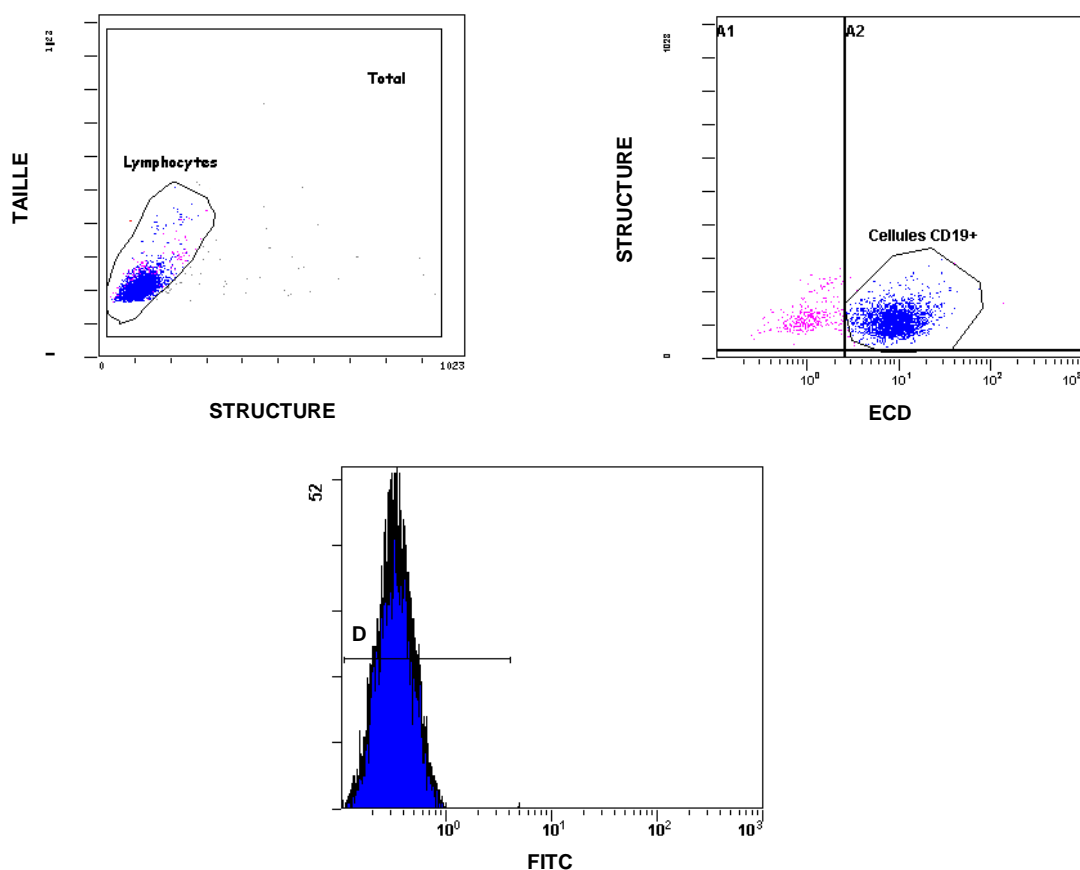
Le mode opératoire est le même que TLR-3, TLR-6 et TLR-9 mais l'incubation avec le réactif B IntraStain et l'anticorps anti-TLR a été suivie d'un lavage, et de l'ajout de 2 µL d'anticorps secondaire de porc anti-immunoglobulines de lapin conjugué à la fluorescéine. Le mélange a ensuite été incubé 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité puis lavé.

Trois cents  $\mu\text{L}$  de paraformaldéhyde ont été ajoutés afin de fixer les cellules avant l'analyse en cytométrie de flux.

Des contrôles isotypiques ont été réalisés, en parallèle, à la surface cellulaire, après perméabilisation et avec des immunoglobulines de porc anti-lapin couplées à la fluorescéine de façon à déterminer le seuil de positivité du marquage, l'intensité de fluorescence de base pour chaque fluorochrome et à calculer les MFI relatives.

Pour l'étude des TLRs au niveau des cellules B CD19+, les données ont été analysées à l'aide des histogrammes suivants (figure 18) :

- **un histogramme biparamétrique Structure/Taille** : cet histogramme permet de repérer les populations cellulaires analysées et de placer la fenêtre d'intérêt englobant la population lymphocytaire.
- **un histogramme biparamétrique CD19-ECD/Structure** qui permet de déterminer, au niveau des lymphocytes compris dans la fenêtre retenue, les cellules exprimant le marqueur CD19. Une Bitmap a été placée au niveau des cellules CD19+.
- **un histogramme monoparamétrique FITC/Count** : cet histogramme permet de différencier, au sein des lymphocytes exprimant CD19, les cellules exprimant le TLR d'intérêt.

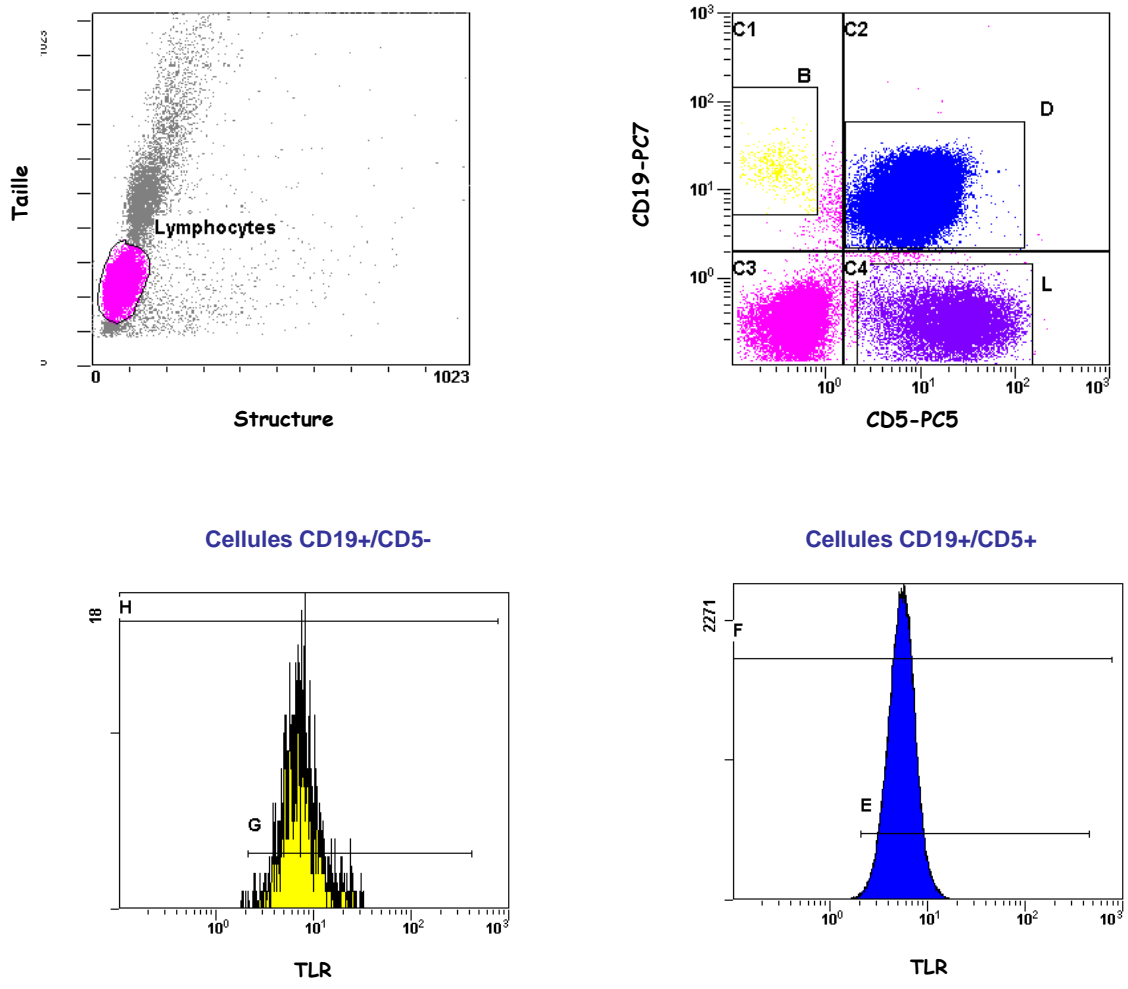


**Figure 18** : Exemple d’histogrammes biparamétriques et monoparamétrique utilisés pour l’étude du profil d’expression des différents TLRs au niveau des lymphocytes B CD19+ sains et tumoraux.

Pour l’analyse du profil d’expression des TLRs au niveau des cellules CD19+/CD5- et CD19+/CD5+, les histogrammes suivants ont été générés pour chaque prélèvement étudié (figure 19):

- **un histogramme biparamétrique Structure/Taille** : cet histogramme permet de repérer les populations cellulaires analysées et de placer la fenêtre d’intérêt englobant la population lymphocytaire.
- **un histogramme biparamétrique CD5-PC5/CD19-PC7** permettant de différencier, au niveau des lymphocytes compris dans la fenêtre retenue, les cellules CD19+ et CD5+ (cadre D), et les cellules CD19+ et CD5- (cadre B).
- **deux histogrammes monoparamétriques TLR/Count** permettant de comptabiliser le nombre de cellules exprimant le TLR étudié respectivement au sein

des lymphocytes du cadre D (CD19+/CD5+) et des lymphocytes du cadre B (CD19+/CD5-).



**Figure 19** : Exemple d'histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l'étude du profil d'expression des TLRs au niveau des cellules B CD19+CD5- et CD19+ CD5+

## II.4 - Stimulation des cellules B saines et pathologiques via des ligands de TLRs

Nous avons évalué l'effet de la stimulation de ligands respectivement spécifiques de TLR-4, de TLR-7 et de TLR-9 sur des cellules B amygdaliennes et pathologiques sur

plusieurs jours, et à différentes concentrations. Suite à des travaux précédents réalisés au laboratoire par le Docteur Kennel, nous avons choisi d'utiliser le PMA comme contrôle de stimulation positif.

Pour chaque stimulation, les suspensions cellulaires sont placées dans un milieu de culture contenant les nutriments et les facteurs de croissance nécessaires à leur survie et dans des conditions optimales (atmosphère humide, enrichie en CO<sub>2</sub>, à 37°C) en présence ou non d'agent de stimulation. Ces cellules sont manipulées dans des conditions limitant les risques de contamination sous hotte à flux laminaire.

#### II.4.1 - Matériel

- Hotte stérile à flux laminaire (SSVAM 19, ESI, Cachan, France)
- Etuve à CO<sub>2</sub> (IR Sensor CO<sub>2</sub> incubator, Sanyo, Tokyo, Japon)

#### II.4.2 - Réactifs

- Chambres de culture Costar® 12 puits (Corning incorporated, New-York, USA)
- RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine et en bicarbonate de sodium (Sigma)
- Antibiotiques (Pénicilline 10 000 U/mL, Streptomycine 10 000 mg/mL, Fungizone 25mg/mL) (Gibco)
- Hepes (Eurobio)
- LPS provenant d'Escherichia Coli 0111:B4 (Sigma)
- Imiquimod R837 (Invivogen, San Diego, Californie, USA).
- ODN M362 (5'-TCGTCGTCGTTTCGAACGACGTTGAT-3, Invivogen)
- ODN M362 contrôle (5'-TGCTGCTGCTTGCAAGCAGCTTGAT-3, Invivogen)
- Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA ≥ 99%, Sigma)
- Solution de rinçage : solution de Hank's (Sigma) + 0.1% de SVF (PAA laboratoires)

## II.4.3 - Méthode

Les suspensions cellulaires tumorales et amygdaliennes ont été stimulées avec quatre concentrations d'imiquimod R837, ligand de TLR-7 : 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL et 20 µg/mL. Pour évaluer l'effet de l'engagement de TLR-9, ces mêmes suspensions cellulaires ont été stimulées avec 0.25 µM, 0.5 µM, 1 µM d'ODN M362 et 1 µM d'ODN M362 contrôle. Quatre concentrations de LPS qui est un ligand de TLR-4 ont également été testées : 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL et 200 µg/mL. Enfin, les cellules B tumorales et saines ont été activées par du PMA à la concentration de 5 µg/L. Cette concentration a été choisie d'après des travaux antérieurs du Docteur Anne Kennel et a permis de réaliser des puits contrôles de stimulation positive.

Chaque suspension cellulaire a été mise en culture, en présence ou non d'agents de stimulation, dans du RPMI 1640 supplémenté avec 2% d'Ultrosor, 1% de tampon Hepes, 1% d'antibiotiques et a été incubée dans des chambres de plaques de culture Costar® 12 puits stériles à raison de 1,5 mL par puits ( $5 \times 10^6$  cellules/mL) pendant 24, 48 et 72 heures dans une étuve à saturation de vapeur d'eau, 37°C et 6% de CO<sub>2</sub>.

## **II.5 - Analyse immunophénotypique des cellules B saines et tumorales stimulées**

### II.5.1 - Principe

Pour chaque suspension cellulaire amygdalienne ou issue de patients atteints de LLC-B, la maturation des cellules stimulées a été évaluée par une analyse immunophénotypique avec une série de marqueurs dirigés contre des molécules d'activation ou de costimulation : CD40, CD80, CD83, CD86, CD54, CD58, CD38, CD138, HLA-DR. Les pourcentages de cellules T et de cellules B tumorales ont également été analysés respectivement par un quadruple marquage (CD45/CD3/CD4/CD8) et un double marquage CD19/CD5 comme décrit plus haut.

## II.5.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Jouan)
- Cytomètre de flux (EPICS XL, Beckman Coulter)
- Coulter CXP software tetraCXP System

## II.5.3 - Réactifs

- Solution de lavage : solution de Hank's (Sigma) avec 0.1% de SVF (PAA laboratories)
- Anticorps de lapin anti-immunoglobulines de souris couplé à la fluorescéine (Dako)
- Paraformaldéhyde (Sigma) 1% en PBS
- Fluorosphères (Flow-Count spheres, Beckman Coulter)

Les anticorps monoclonaux utilisés sont indiqués dans le tableau 9.



**Tableau 8** Anticorps monoclonaux utilisés pour l'immunophénotypage des suspensions cellulaires stimulées

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Isotype (espèce)</b>	<b>Fabricant</b>
CD40	MAB89	IgG1 (souris)	Beckman-Coulter
CD80	MAM104	IgG1 (souris)	Beckman-Coulter
CD83	HB15a	IgG2b (souris)	Beckman-Coulter
CD86	HA5.2B7	IgG2b (souris)	Beckman-Coulter
CD54	84H10	IgG1 (souris)	Beckman-Coulter
CD58	AICD58	IgG2a (souris)	Beckman-Coulter
CD38	T16	IgG1 (souris)	Beckman-Coulter
CD138	BB4	IgG1 (souris)	Beckman-Coulter
HLA-DR	B8.12.2	IgG2b (souris)	Beckman-Coulter
CCR7-FITC	150503	IgG2a (souris)	R&D System, Minneapolis, Minnesota, USA
CD19-FITC	J4.119	IgG1 (souris)	Beckman-Coulter
CD5-PE	BL1A	IgG2a (souris)	
CD45-FITC	B3821F4A	IgG2b (souris)	Beckman-Coulter
CD4-RD1	SFCI12T4D11	IgG1 (souris)	
CD8-ECD	SFCI21Thy2D3	IgG1 (souris)	
CD3-PC5	UCHT1	IgG1 (souris)	

## II.5.4 - Méthode

Cinquante  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire stimulée ou non avec le PMA, le LPS, l'imiquimod R837, les ODN M362 contrôles et les ODN M362 ont d'abord été incubés avec 5  $\mu\text{L}$  d'un anticorps primaire non-conjugué dirigé contre la molécule étudiée. Le mélange a ensuite été lavé avec 2 mL de solution de rinçage puis incubé avec 10  $\mu\text{L}$  d'une solution contenant un anticorps secondaire de lapin anti-immunoglobulines de souris conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Un deuxième rinçage a été effectué à nouveau avec 1 mL de solution de RPMI supplémenté avec 0.1% de SVF et les cellules ont été centrifugées 5 min à 600 g. Le surnageant a été éliminé et 300  $\mu\text{L}$  de paraformaldéhyde 1% en PBS ont été ajoutés afin de fixer les cellules. Les cellules ont été conservées à 4°C jusqu'à leur analyse en cytométrie de flux.

Des contrôles isotypiques ont été réalisés permettant ainsi de déterminer l'intensité de fluorescence de base pour chaque fluorochrome et de calculer les MFI relatives.

Pour chacune des suspensions cellulaires, les histogrammes générés ont été étudiés comme décrit dans les paragraphes II.4.1, II.4.2 et II.4.3.

Pour certains échantillons, le nombre absolu de cellules a été déterminé en ajoutant 50  $\mu\text{L}$  de fluorosphères à 50  $\mu\text{L}$  de chaque suspension cellulaire stimulée ou non. Le programme d'analyse du cytomètre établit alors automatiquement la numération de chaque population d'intérêt.

## II.6 - Analyses morphologiques

### II.6.1 - Principe

Les cellules des différentes suspensions cellulaires sont étalées par cyto-centrifugation sur une lame de verre : la force centrifuge projette les cellules sur la lame de verre sur laquelle elles adhèrent et le liquide est absorbé par un papier filtre percé en son centre au calibre de la pastille de cytospin fixée sur la lame. Les lames sont ensuite fixées et colorées puis observées par microscopie optique.

## II.6.2 - Matériel

- Cytocentrifugeuse (Cytospin 2, Shandon, Runcorn, Royaume-Uni)
- Microscope (U-AN, Olympus, Tokyo, Japon)
- Caméra et logiciel d'analyse d'images (Olympus BX60)

## II.6.3 - Réactifs

- PBS 1X
- Set de coloration Diff-Quik® (Düdingen, Suisse)

## II.6.4 - Méthode

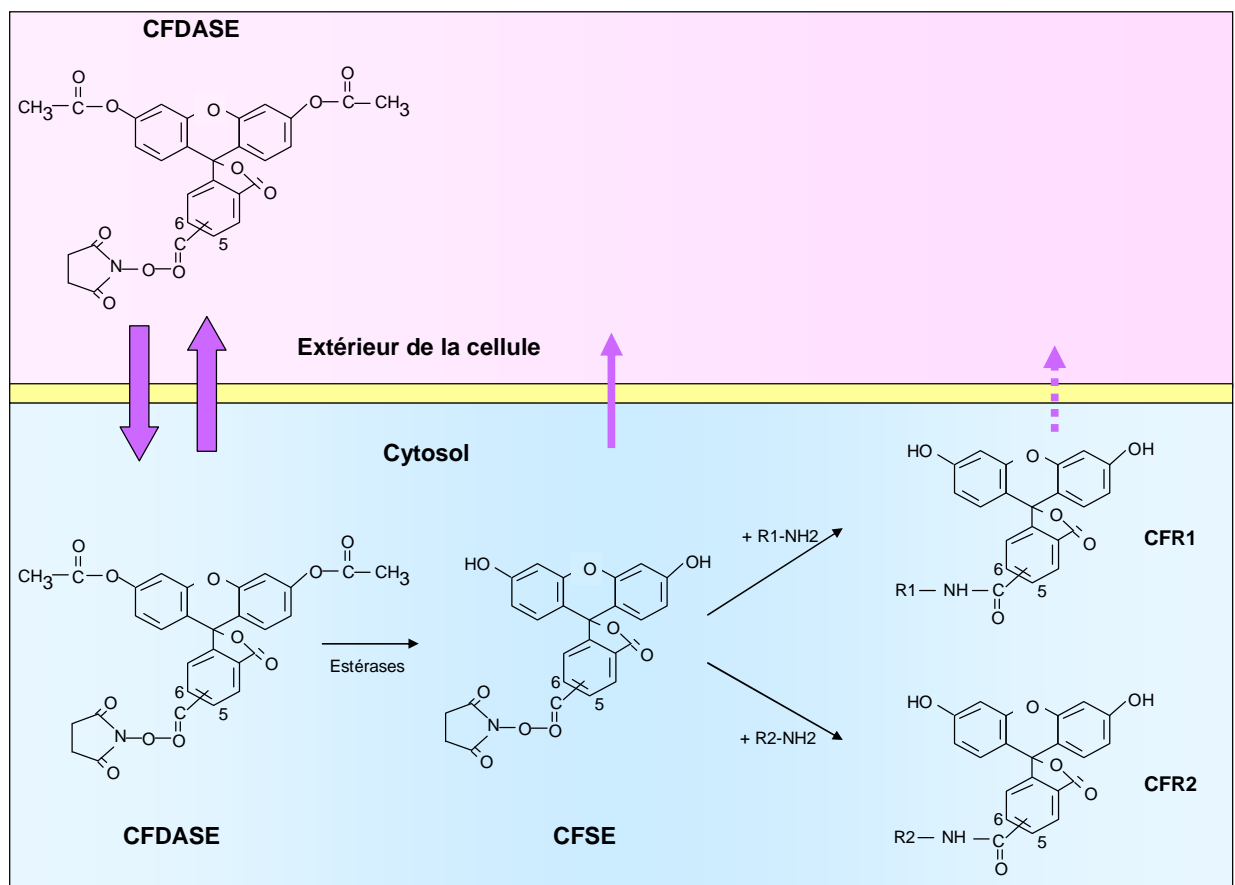
Cinquante  $\mu\text{L}$  d'une suspension cellulaire ont été déposés dans le fond des cônes de chaque chambre de centrifugation et centrifugés 5 min à 400 tours/min. Après séchage de l'étalement à l'air libre, les cellules ont ensuite été colorées avec le set de coloration rapide Diff-Quik® qui est comparable à la technique de Pappenheim (May-Grunwald-Giemsa) selon les recommandations du fournisseur. Les lames ont été trempées 5 x 1 seconde dans le réactif Solution fixative, égouttées, trempées dans le réactif Solution colorante I 5 x 1 seconde, égouttées à nouveau puis trempées dans la Solution colorante II. Les lames ont ensuite été rincées à l'eau, séchées à l'air libre puis observées par microscopie optique.

## **II.7 - Evaluation de la prolifération des cellules stimulées**

La prolifération des suspensions cellulaires a été étudiée par marquage avec du CFSE.

### II.7.1 - Principe

Le CFDA-SE (carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester) qui constitue le précurseur du CFSE (carboxy-fluorescein succinimidyl ester) est capable de diffuser largement dans les cellules et possède deux groupements acétate qui le rendent non fluorescent. Il faut noter qu'en raison de sa nature lipophile, ce composé peut, à ce stade, également ressortir des cellules. Une fois ce précurseur internalisé, des estérases intracellulaires hydrolysent ses groupements acétate et le CFDA-SE devient alors le CFSE qui est intensément fluorescent et moins lipophile que son précurseur. Son groupement succinimidyl lui permet d'interagir avec les groupements amines des protéines intracellulaires via des liaisons amide très stables. Les molécules fluorescentes ainsi obtenues peuvent, dans certains cas, être rapidement dégradées ou encore sortir de la cellule (CFR1). Dans les autres cas, les conjugués sont incapables de sortir de la cellule (CFR2) et le marquage covalent obtenu sur ces protéines est très stable à long terme (figure 20).



**Figure 20** : Représentation schématique des différentes étapes du marquage des cellules avec le CFSA-DE (adapté de Parish, 1999)

Le groupement carbonyle situé entre les positions 5 et 6 du cycle groupement benzène indique que le colorant est un mélange des isomères 5 et 6-carbonyle.

Ce marquage durable permet d'utiliser cette molécule pour suivre la prolifération des cellules *in vivo* et *in vitro* (Parish, 1999). La fluorescence des protéines marquées se distribue de façon égale entre les cellules filles, ce qui permet de suivre la prolifération cellulaire, par la décroissance du signal fluorescent, en cytométrie de flux.

## II.7.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Jouan)
- Cytomètre de flux (FC 500, Beckman Coulter)

## II.7.3 - Réactifs

- CFSE (Molecular Probes, Eugene, Oregon)
- PBS 1x
- RPMI 1640 (Sigma)
- Plaques de culture de 96 puits (COSTAR Stripwell, Corning)

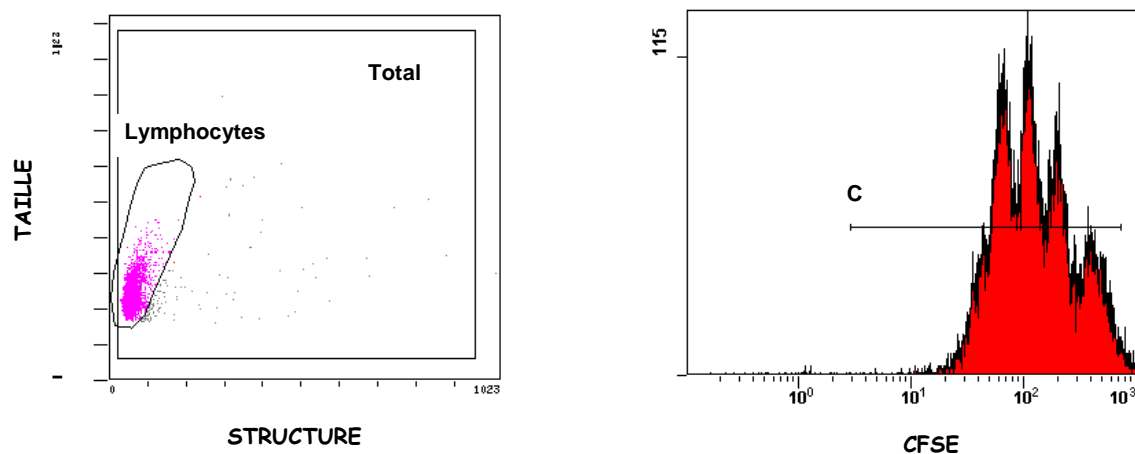
## II.7.4 - Méthode

A J0, les suspensions cellulaires ont été incubées à  $5 \times 10^6$  cellules/mL avec  $5 \mu\text{M}$  de CFDA-SE pendant 10 minutes à  $37^\circ\text{C}$ . Cinq volumes de RPMI 1640 froid ont été ajoutés de manière à "absorber" le CFSE libre et le mélange a été incubé 5 minutes sur glace. Les suspensions cellulaires marquées ont ensuite été lavées 3 fois avec du RPMI, remises en suspension à une concentration de  $5 \times 10^6$  cellules/mL dans du RPMI 1640 supplémenté avec 2% d'Ultrosor, 1% de tampon Hepes, 1% d'antibiotiques en présence ou non de facteurs de stimulation puis cultivées dans des plaques de culture de 96 puits pendant 1, 2, 3 jours et dans

certains cas jusqu'à 7 jours à 37°C sous atmosphère enrichie à 6% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été recueillies après culture, lavées avec du PBS et fixées avec du paraformaldéhyde à 1% dans du PBS puis analysées par cytométrie de flux. Les cellules en prolifération ont été estimées par la décroissance de la MFI du CFSE.

Pour chaque prélèvement étudié, les données ont été analysées à l'aide des histogrammes suivants (figure 21) :

- **un histogramme biparamétrique Structure/Taille** permettant d'identifier les populations cellulaires analysées et de placer la fenêtre d'intérêt englobant la population lymphocytaire.
- **un histogramme monoparamétrique CFSE/Count** : il permet d'analyser la répartition de l'intensité de fluorescence du CFSE au sein de la fenêtre d'intérêt.



**Figure 21** : Exemples d'histogrammes biparamétrique et monoparamétrique utilisés pour l'étude de la prolifération après marquage par le CFSE des suspensions cellulaires stimulées ou non

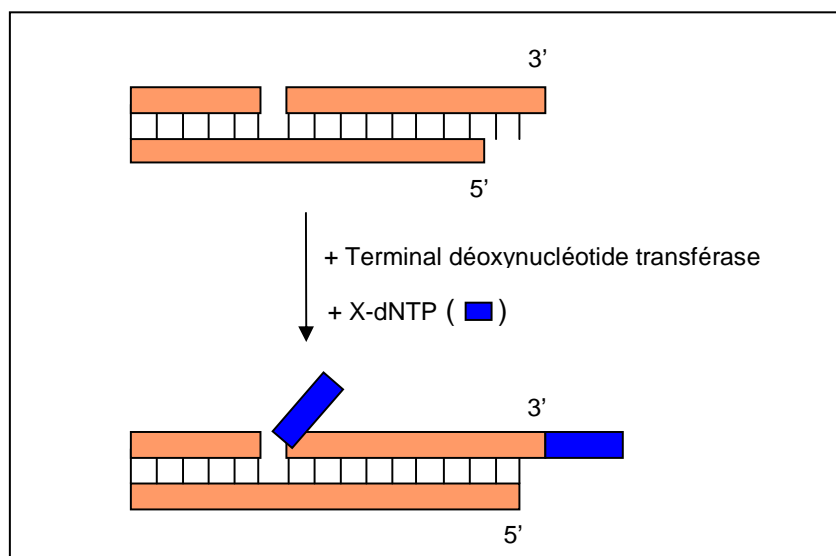
## II.8 - Evaluation de l'apoptose

### II.8.1 - Principe

L'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée, est caractérisée par des critères morphologiques très précis tels que la diminution du volume cellulaire, le maintien de

l'intégrité de la membrane plasmique au début du processus, une relocalisation des organites cytoplasmiques, une condensation de la chromatine puis la fragmentation du noyau et du cytoplasme. La cellule se scinde en corps apoptotiques, délimités par une membrane intacte, contenant des organelles, des fragments nucléaires et un cytoplasme condensé. On observe également des clivages de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires ou de petits poids moléculaires (clivage entre les nucléosomes) après l'activation d'endonucléases endogènes. Le recrutement d'enzymes spécifiques que sont les aminophosphatidyl translocases entraîne la translocation de la phosphatidylsérine de la face interne à la face externe de la membrane plasmique.

La méthode TUNEL permet de mettre en évidence in situ la fragmentation de l'ADN nucléaire qui signe l'engagement définitif de la cellule dans la mort cellulaire programmée. Elle est basée sur le marquage des extrémités 3'OH libres des fragments d'ADN par la TdT (terminal déoxynucléotide transférase) : cette enzyme catalyse l'accrochage de nucléotides marqués au niveau de ces extrémités 3'-OH libres générés au cours de l'apoptose (figure 22).



**Figure 22** : Représentation schématique du principe de la méthode TUNEL

(adapté de [https://www.roche-applied-science.com/PROD\\_IFN/MANUALS/CELL\\_MAN/apoptosis\\_033\\_035.pdf](https://www.roche-applied-science.com/PROD_IFN/MANUALS/CELL_MAN/apoptosis_033_035.pdf))

Les nucléotides sont marqués à la fluorescéine et peuvent ainsi être détectés par cytométrie de flux.

## II.8.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Jouan)
- Cytomètre de flux (FC 500, Beckman Coulter)

## II.8.3 - Réactifs

- Roche Molecular Biochemicals In Situ Cell Death Detection kit, Fluorescein (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana)
- PBS 1x
- Paraformaldéhyde (Sigma) dilué à 4% dans du PBS
- Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué à 0,1% dans une solution de citrate de sodium (Sigma) à 0.1%
- Anticorps monoclonal anti-CD19-ECD (Beckman Coulter)

## II.8.4 - Méthode

La présence d'apoptose a été évaluée par la méthode TUNEL selon les instructions du fournisseur. Des aliquotes de 100  $\mu$ L de chaque culture cellulaire stimulée ou non avec des ODN CpG et GpC, de l'imiquimod ou du PMA ont été fixés avec du paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS pendant une heure à température ambiante, lavés avec du PBS, centrifugés 5 minutes à 600 g puis perméabilisés grâce à du Triton X-100 dilué à 0,1% dans une solution de citrate de sodium à 0.1% pendant 5 minutes sur glace. Les cellules ont ensuite été une nouvelle fois lavées avec du PBS puis resuspendues dans 25  $\mu$ L d'un mélange contenant des dUTP conjugués à la fluorescéine et de la TdT et incubées pendant une heure à 37°C. Après marquage, les cellules ont été lavées avec du PBS, centrifugées 5 minutes à 600 g, puis fixées avec du paraformaldéhyde à 1% et analysées par cytométrie de flux.

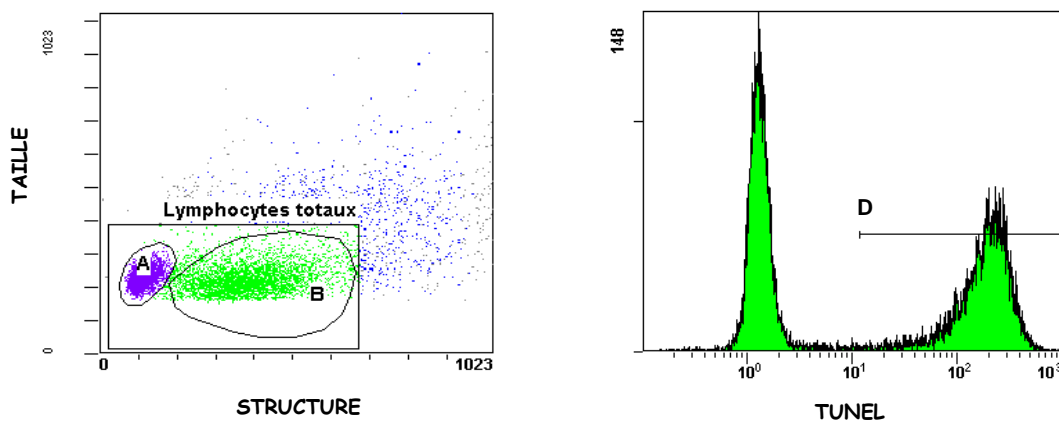
Pour les contrôles négatifs, le protocole est identique mais la TdT n'a pas été ajoutée.



Pour certaines suspensions cellulaires, un marquage avec un anticorps anti-CD19-ECD ou avec un anticorps anti-CD3-ECD a été réalisé avant marquage par la méthode TUNEL.

Chacune des suspensions cellulaires stimulées ou non a été analysée selon les histogrammes suivants (figure 23) :

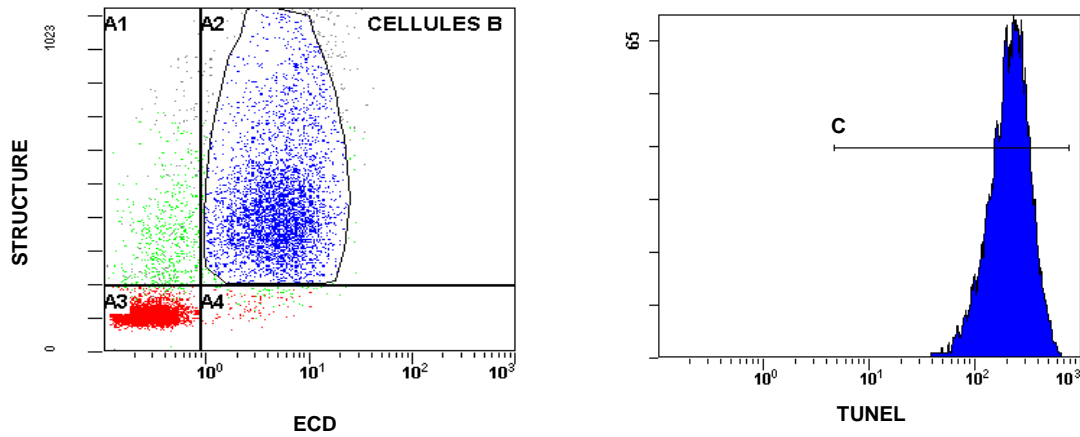
- **un histogramme biparamétrique Structure/Taille** permettant d'identifier les populations cellulaires analysées et de placer la Bitmap "Lymphocytes totaux" au niveau des lymphocytes
- **un histogramme monoparamétrique TUNEL/count** permettant d'analyser la répartition de l'intensité de fluorescence dans la population cellulaire comprise dans la Bitmap retenue. Grâce à des curseurs d'intégration, il est possible de calculer le pourcentage de cellules marquées et l'intensité de fluorescence moyenne.



**Figure 23** : Exemples d'histogrammes biparamétrique et monoparamétrique utilisés pour l'étude de l'apoptose des suspensions cellulaires de LLC-B et amygdaliennes stimulées ou non

Pour les suspensions cellulaires qui ont été incubées avec l'anticorps anti-CD19-ECD, des histogrammes supplémentaires ont été générés (figure 24) :

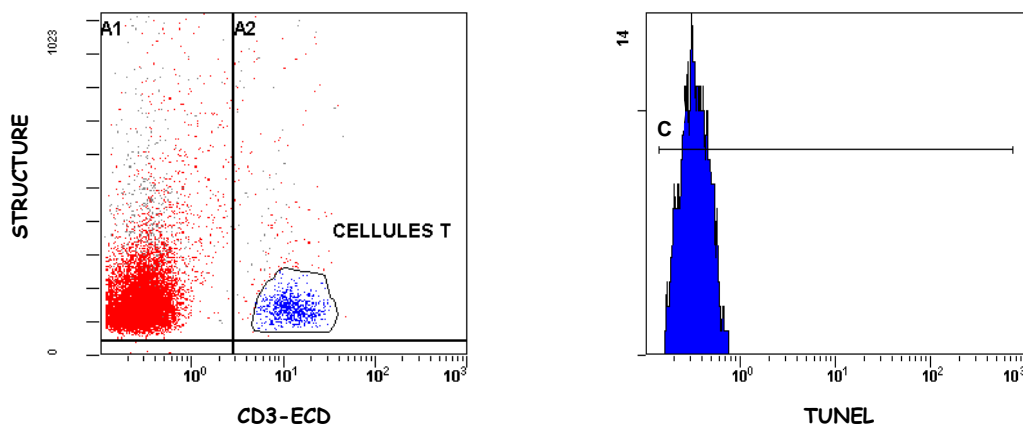
- **un histogramme biparamétrique CD19-ECD/Structure** qui permet d'identifier, parmi les lymphocytes définis dans la Bitmap "Lymphocytes totaux", les cellules exprimant le marqueur CD19.
- **un histogramme monoparamétrique TUNEL/count** : permettant d'analyser la répartition de l'intensité de fluorescence des lymphocytes exprimant le marqueur CD19.



**Figure 24** : Exemples d'histogrammes biparamétrique et monoparamétrique générés pour évaluer l'apoptose des cellules B saines et pathologiques

De la même façon, pour les cellules incubées avec un anticorps anti-CD3-ECD, les histogrammes suivant ont été analysés (figure 25) :

- **un histogramme biparamétrique ECD/Structure** qui permet d'identifier, parmi les lymphocytes définis dans la Bitmap "Lymphocytes totaux", les cellules exprimant le marqueur CD3.
- **un histogramme monoparamétrique TUNEL/count** : cet histogramme permet d'étudier la répartition de l'intensité de fluorescence des lymphocytes CD3+.

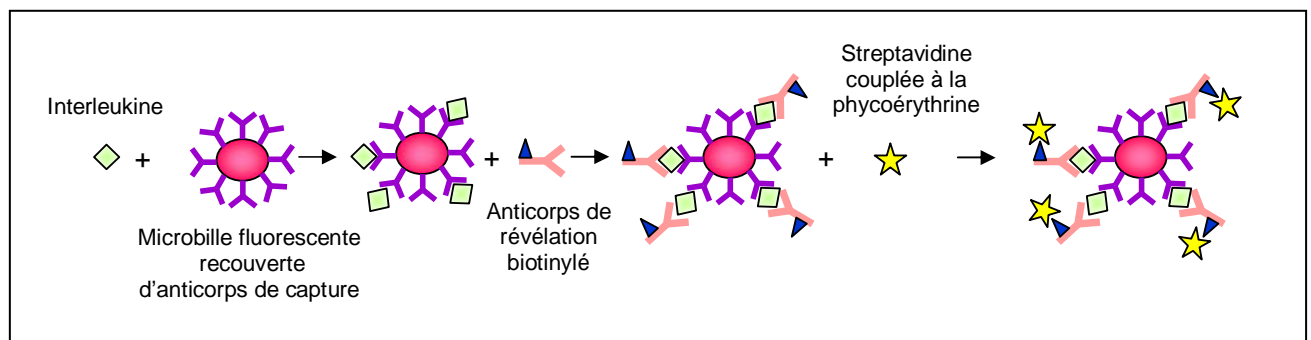


**Figure 25** : Exemples d'histogrammes biparamétrique et monoparamétrique générés pour évaluer l'apoptose des cellules T

## II.9 - Evaluation de la sécrétion de cytokines par les différentes suspensions cellulaires stimulées ou non

### II.9.1 - Principe

Le dosage des cytokines IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$  présentes dans les surnageants de culture a été réalisé en cytométrie en flux par le kit "FlowCytomix human Th1/Th2 11plex Kit". Cette méthode permet la quantification simultanée de 11 cytokines, dans un faible volume d'échantillon (25  $\mu$ L) par une technique apparentée à un ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Elle est basée sur l'utilisation de deux types de microbilles de diamètres 4.4 et 5.5  $\mu$ m comprenant respectivement cinq et six microbilles d'intensités de fluorescence rouge distinctes : elles sont marquées par le Starfire Red<sup>TM</sup> dont l'émission maximale se situe entre 685 et 690 nm. Ces microbilles sont recouvertes chacune d'un anticorps de capture dirigé contre une interleukine spécifique, différente pour chaque bille. Ces anticorps capturent les cytokines éventuellement présentes dans le liquide testé. Cette fixation est proportionnelle à la concentration de cytokines et est révélée par un mélange d'anticorps également dirigés contre chacune des cytokines recherchées. Ces anticorps sont couplés à la biotine et sont enfin marqués par fixation de streptavidine conjuguée à la phycoérythrine (figure 26). Les interleukines mises en évidence peuvent alors être quantifiées grâce à une gamme de titration réalisée avec une série de standards.



**Figure 26** : Représentation schématique du principe de la technique d'analyse d'interleukines par la technologie FlowCytomix (Bender MedSystems).

## II.9.2 - Matériel

- Centrifugeuse (Jouan)
- Cytomètre de flux (FC 500, Beckman Coulter)
- Logiciel d'analyse "FlowCytometrix Pro 2.1 Software"

## II.9.3 - Réactifs

- Trousse de dosage "FlowCytomix human Th1/Th2 11plex Kit" (Bender MedSystems GmbH, Vienne, Autriche)

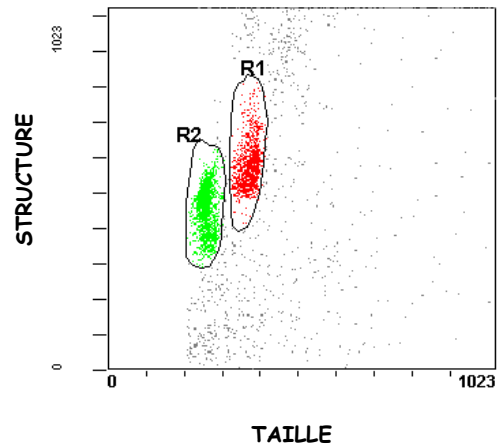
## II.9.4 - Méthode

Une gamme standard de dilutions est réalisée pour chaque cytokine étudiée. Les gammes de dilutions des cytokines IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$  comprenaient 8 points de gamme : 20000 pg/mL, 6666.7 pg/mL, 2222.2 pg/mL, 740.7 pg/mL, 246.9 pg/mL, 82.3 pg/mL, 27.44 pg/mL et 0 pg/mL.

La gamme de dilution du standard IL-8 s'étendait de 10000 pg/mL à 0 pg/mL (10000 pg/mL, 3333 pg/mL, 1111.1 pg/mL, 370.4 pg/mL, 123.5 pg/mL, 41.15 pg/mL, 13.7 pg/mL et 0 pg/mL)

Vingt-cinq  $\mu$ L du mélange de toutes les billes ainsi que 50  $\mu$ L du mélange des conjugués biotine spécifiques de chacune des billes ont été ajoutés à 25  $\mu$ L de surnageants de culture à doser ou à 25  $\mu$ L de chaque point de gamme. Le mélange a été incubé 2 heures à température ambiante et à l'obscurité avant d'être lavé 2 fois avec 1 mL de tampon 1x et centrifugé à 200 g pendant 5 minutes. Cinquante  $\mu$ L de streptavidine marquée à la phycoérythrine ont ensuite été ajoutés au culot. Le mélange a été incubé 1 heure à température ambiante puis rincé à nouveau 2 fois avec 1 mL de tampon 1x. Après élimination du surnageant, 500  $\mu$ L de tampon 1x ont été ajoutés et les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à analyse par cytométrie de flux.

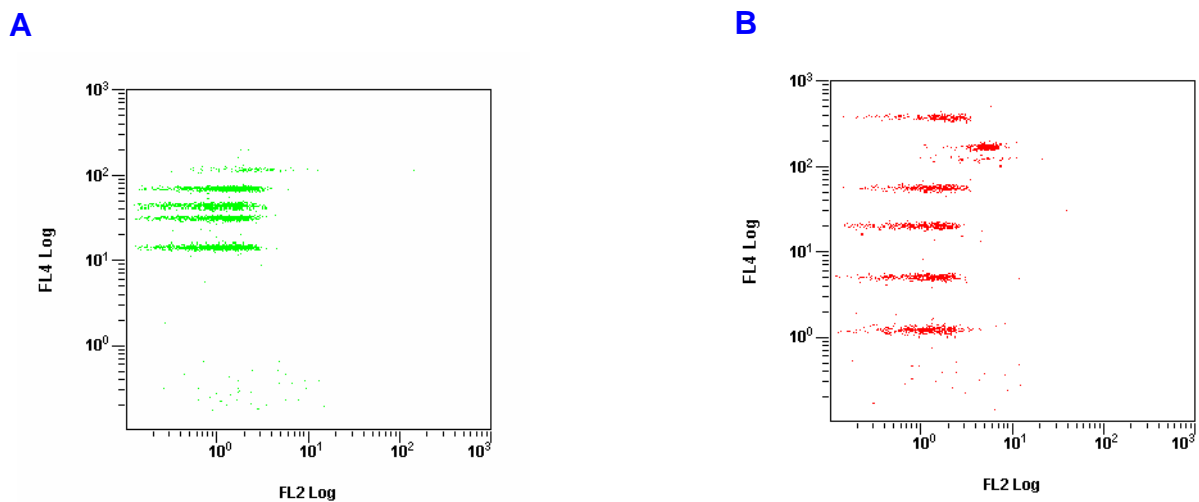
Un exemple des histogrammes générés par cytométrie de flux sont présentés sur la figure 27 et 28.



**Figure 27** : Exemple d'histogramme biparamétrique utilisé pour discriminer des deux populations de billes utilisées pour le dosage des cytokines dans les surnageants de culture des suspensions cellulaires stimulées ou non

Les fenêtres R1 et R2 englobent respectivement les microbilles de diamètres 5.5 et 4,4  $\mu\text{m}$ .

La figure 28 représente la fluorescence de base des deux populations de microbilles contenues dans R1 (A) et R2 (B).



**Figure 28** : Fluorescence de base des deux populations de microbilles

## **II.10 - Etude fonctionnelle : réaction mixte leucocytaire**

### **II.10.1 - Principe**

La réaction mixte lymphocytaire explore la prolifération lymphocytaire T spécifique d'une réponse allogénique. Cette méthode consiste à mettre en culture deux populations lymphocytaires issues de deux individus différents. Dans la réaction mixte lymphocytaire unilatérale ou unidirectionnelle, l'une des deux populations est irradiée ce qui permet de bloquer sa prolifération. La population inactivée est dite stimulante et l'autre population est dite répondante. Cette technique implique une réponse proliférative lymphocytaire résultant de la différence de spécificité des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II entre les deux populations lymphocytaires. La population T répondante reconnaît les déterminants allogéniques de l'autre ce qui induit une transformation blastique. La population de cellules stimulantes est mise en présence de deux populations de cellules répondantes différentes, dans deux tests distincts, afin d'augmenter la probabilité que les lymphocytes T "répondeurs" possèdent un phénotype HLA différent de celui des cellules tumorales et à pouvoir proliférer. Idéalement, ce phénotype HLA devrait être connu pour chaque patient testé, ce qui est irréalisable en pratique.

Les mesures de prolifération cellulaire des réactions lymphocytaires mixtes en présence des cellules tumorales et amygdaliennes ont été réalisées par cytométrie de flux après marquage des cellules répondantes au CFSE.

### **II.10.2 - Matériel**

- Centrifugeuse (Jouan)
- Cytomètre de flux (FC 500, Beckman Coulter)

### II.10.3 - Réactifs

- Plaques de culture de 96 puits (Corning)
- CFSE (Molecular Probes)
- PBS 1x
- RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine et en bicarbonate de sodium (Sigma)
- Antibiotiques (Pénicilline 10 000 U/mL, Streptomycine 10 000 mg/mL, Fungizone 25mg/mL) (Gibco)
- Hepes (Eurobio)
- SVF (PAA Laboratories)
- Phytohemagglutinin-L (PHA-L) (Sigma)
- Anticorps :
  - Anticorps anti-CD3-ECD (Beckman Coulter)
  - Anticorps anti-CD4-PC5 (Beckman Coulter)
  - Anticorps anti-CD8-PC7 (Beckman Coulter)
- Paraformaldéhyde (Sigma) 1% en PBS

### II.10.4 - Méthode

Les cellules mononuclées issues de concentrés leuco-plaquettaires ont été marquées au CFSE comme décrit dans le paragraphe VII.2. Cent  $\mu\text{L}$  de cellules mononuclées marquées ont été ensuite remises en suspension dans du milieu de culture complet dans du RPMI 1640 supplémenté avec 5% de SVF, 1% de tampon Hepes, 1% d'antibiotiques à la concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Cette suspension cellulaire a été répartie à raison de 100  $\mu\text{L}$ /puits dans des plaques de culture de 96 puits à fond rond. Ces cellules correspondaient aux cellules répondantes. Cent  $\mu\text{L}$  de suspensions cellulaires d'amygdales palatines ou de LLC-B stimulées ou non avec le PMA et les ODN CpG ont été ajoutés à des doses graduelles pour stimuler les cellules répondantes (ratio lymphocytes B/lymphocytes T de 1/1, 1/3, 1/10, 1/30 et 1/100). Un contrôle négatif de prolifération spontanée des cellules et un contrôle positif de stimulation ont également été réalisés en ajoutant respectivement aux cellules répondantes 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture seul et 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture additionné de

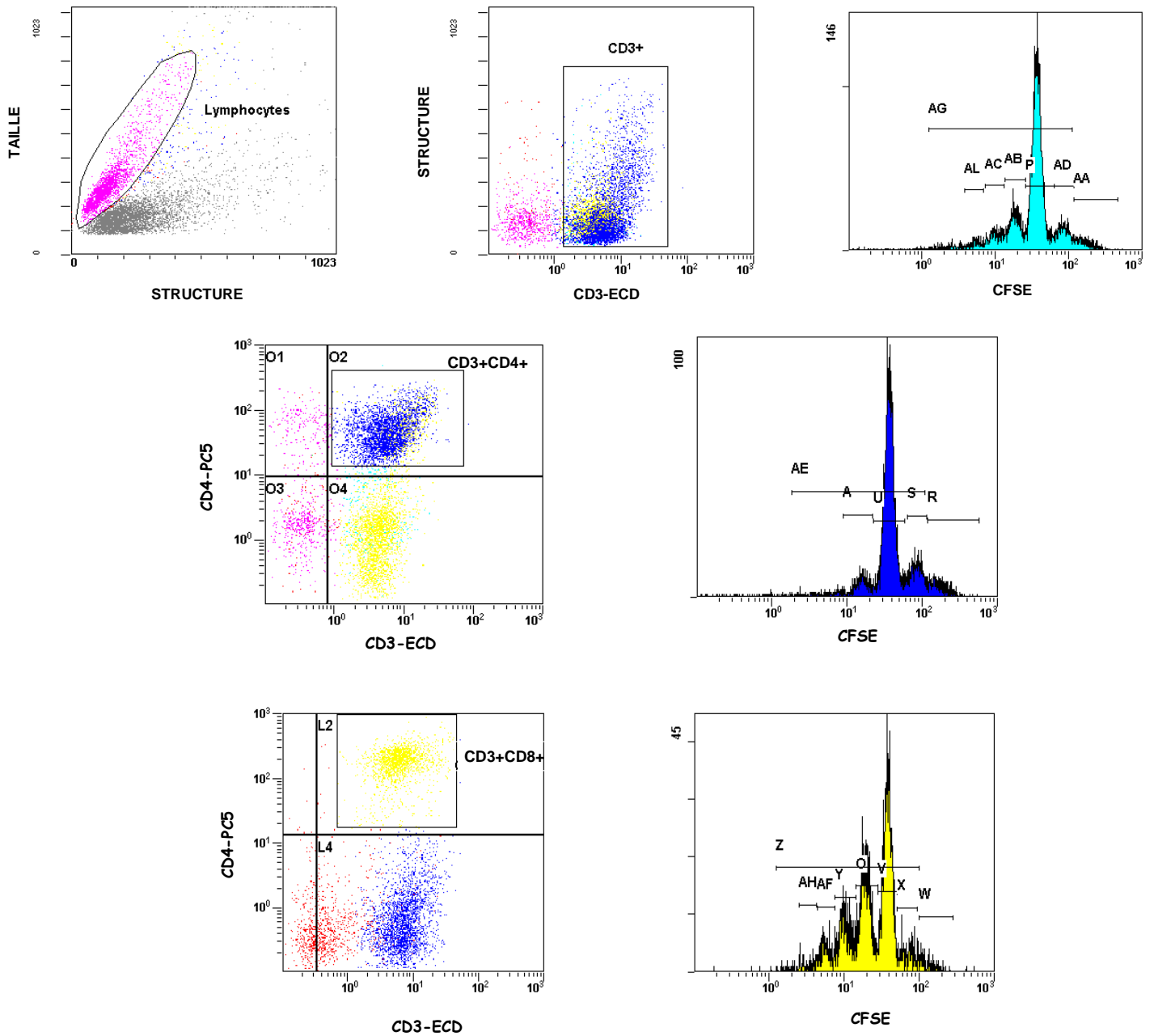
phytohemagglutinine-L (PHA-L) à la concentration de 5 mg/mL. La PHA-L est une lectine d'origine végétale qui stimule les lymphocytes T. Trois réplicats ont été réalisés pour chaque mesure. Les suspensions cellulaires ont été incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité.

A J6, les cellules ont été recueillies, lavées avec du PBS 1x, puis incubées avec un anticorps anti-CD3-ECD, un anticorps anti-CD4-PC5, et un anticorps anti-CD8-PC7 pendant 15 minutes à température ambiante. Après marquage, les cellules ont à nouveau été lavées avec du PBS 1x puis fixées avec 300 µL de paraformaldéhyde et conservées à 4°C jusqu'à analyse par cytométrie de flux.

Les données ont été analysées à l'aide des histogrammes suivants (figure 29) :

- **un histogramme biparamétrique Structure/Taille** : cet histogramme permet de placer la fenêtre d'intérêt au niveau des lymphocytes.
- **un histogramme biparamétrique CD3-ECD/Structure** qui permet de repérer les cellules fluorescentes marquées au CD3-ECD et de placer la fenêtre d'intérêt englobant les lymphocytes CD3+.
- **un histogramme monoparamétrique CFSE/Count** : il permet d'analyser la répartition de l'intensité de fluorescence du CFSE parmi les lymphocytes exprimant le marqueur CD3.
- **un histogramme biparamétrique CD3-ECD/CD4-PC5** qui permet de distinguer, parmi les lymphocytes de la fenêtre d'intérêt, les cellules doublement marquées exprimant à la fois CD3 et CD4 (J2). Il permet de placer une Bitmap au niveau des lymphocytes CD3+ CD4+.
- **un histogramme monoparamétrique CFSE/Count** : il permet d'analyser la répartition de l'intensité de fluorescence du CFSE parmi les lymphocytes CD3+ CD4+.
- **un histogramme biparamétrique CD3-ECD/CD8-PC7** : il permet de repérer, parmi les lymphocytes, les cellules exprimant à la fois CD3 et CD8 (L2) et de placer une Bitmap au niveau des lymphocytes CD3+ CD8+.
- **un histogramme monoparamétrique CFSE/Count** : il permet d'analyser la répartition de l'intensité de fluorescence du CFSE parmi les lymphocytes CD3+ CD8+.





**Figure 29** : Exemples d'histogrammes biparamétriques et monoparamétriques utilisés pour l'étude de la prolifération de cellules T allogéniques dans une réaction mixte lymphocytaire.

### **III - ANALYSES STATISTIQUES**

Toutes les études statistiques de ce travail ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPadPrism™ (San Diego, Californie, USA). La normalité de la distribution des résultats a été testée par le test de Kolmogorov Smirnov.

Les comparaisons de l'expression des différents TLRs entre les patients atteints de LLC-B et les sujets sains ont été réalisées par un test T de Student ( $p < 0.05$ ). En l'absence de distribution normale, ces résultats ont été analysés par un test de Mann-Whitney non apparié ( $p < 0.05$ ).

Les analyses immunophénotypiques réalisées au niveau des suspensions cellulaires saines et tumorales ont été comparées avant et après stimulation par un test T de Student apparié ( $p < 0.05$ ).

La comparaison de la sécrétion de cytokines par les différentes suspensions cellulaires stimulées ou non a été réalisée par un test T de Student apparié ( $p < 0.05$ ) ou, en l'absence de distribution normale, par un test de Wilcoxon apparié ( $p < 0.05$ ). Les profils cytokiniques obtenus dans les suspensions de LLC-B ont été comparés à ceux obtenus dans les suspensions amygdaliennes par un test T de Student ( $p < 0.05$ ) ou, en l'absence de distribution gaussienne, par un test de Mann-Whitney non apparié ( $p < 0.05$ ).

La prolifération des lymphocytes T naïfs en réponse aux cellules B saines et tumorales stimulées a été comparée aux résultats obtenus avec des cellules B saines et tumorales non stimulées par un test T de Student apparié ( $p < 0.05$ ).

# **RESULTATS**

## **I - ETUDE DE L'EXPRESSION DES TLRs**

L'étude du profil d'expression des TLRs sur les lymphocytes B normaux a été réalisée par cytométrie de flux au niveau de prélèvements sanguins de volontaires sains et de suspensions cellulaires éluées d'amygdales palatines. Les résultats obtenus pour ces cellules B témoins ont été comparés avec ceux observés pour des cellules B de patients atteints de LLC.

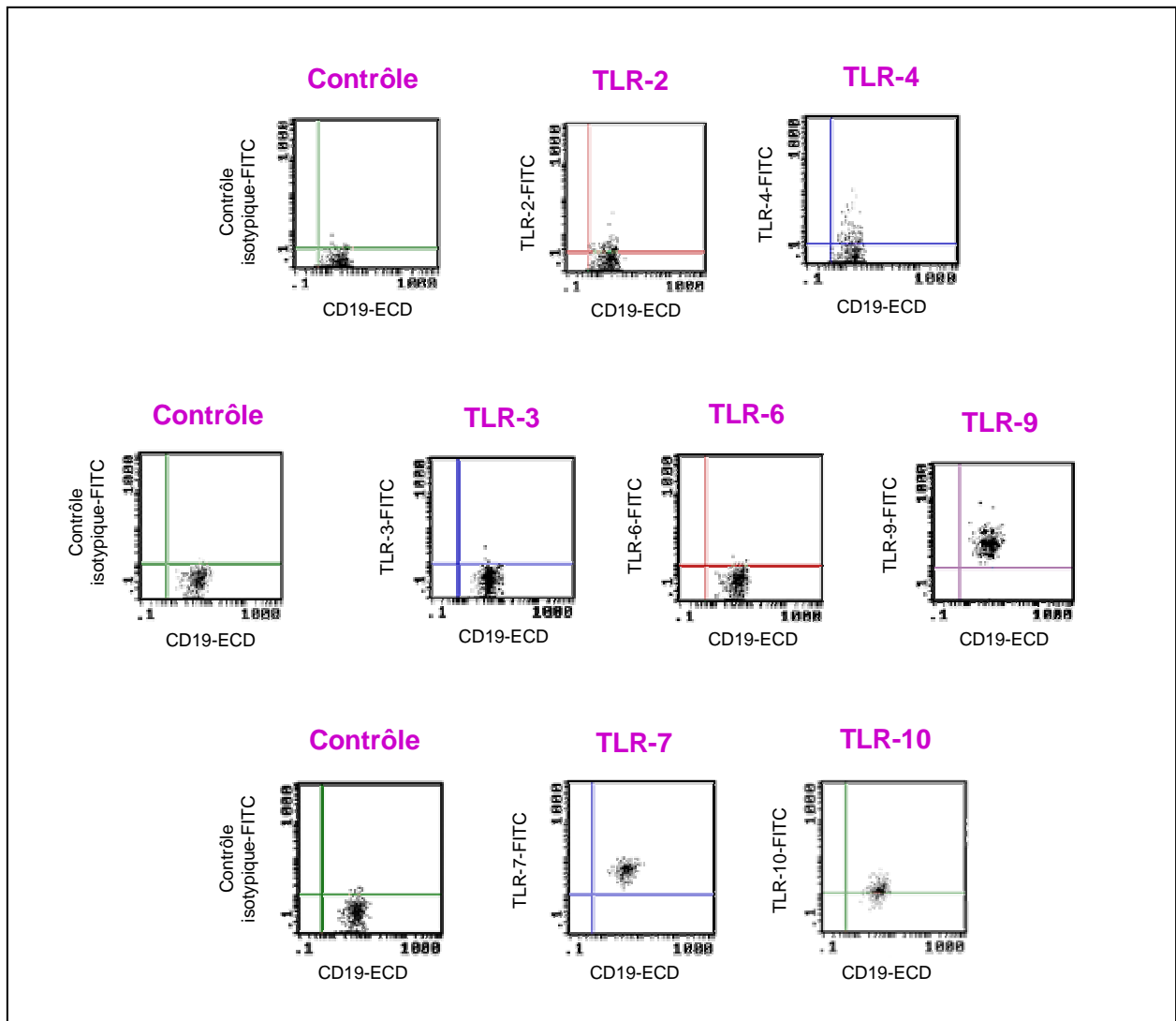
Dans les échantillons de patients atteints de LLC-B les proportions de cellules leucémiques étaient comprises entre 63 et 98% (moyenne :  $81.3 \pm 3.4$ ). Les proportions de cellules T et B normales persistantes étaient respectivement comprises entre 1 et 20.8% (moyenne :  $2.7 \pm 0.8$ ) et 0 et 8% (moyenne :  $7 \pm 2.3$ ). Tous les patients présentaient un score de Matutes de 4 ou 5 et aucune expression de CD38 n'a été relevée.

Dans les suspensions cellulaires obtenues à partir du sang périphérique des sujets sains et d'amygdales palatines, les proportions de cellules B CD19+ étaient respectivement comprises entre 2.3 et 14.6% (moyenne :  $9.6 \pm 1.7$ ) et entre 62 et 87% (moyenne :  $72.4 \pm 2.7$ ). D'autre part, les proportions de cellules CD19+/CD5+ étaient respectivement comprises entre 0.5 et 5.5% (moyenne :  $2.2 \pm 0.5$ ) et entre 1 et 20% (moyenne :  $7.3 \pm 2.1$ ).

L'expression des TLRs a été ainsi analysée au niveau des cellules B CD19+ de 17 sujets contrôles âgés de 25 à 55 ans (moyenne d'âge de  $38 \pm 0.6$  ans), de 12 amygdales palatines d'enfants âgés de 3 à 7 ans (moyenne d'âge de  $4.9 \pm 0.5$  ans) et de 18 patients âgés de 43 à 82 ans (moyenne d'âge de  $63 \pm 2.7$  ans).

### **I.1.1 - Etude de l'expression des TLRs au niveau de lymphocytes B normaux**

La figure 30 présente un exemple des profils d'expression obtenus pour chacun des TLRs étudiés.

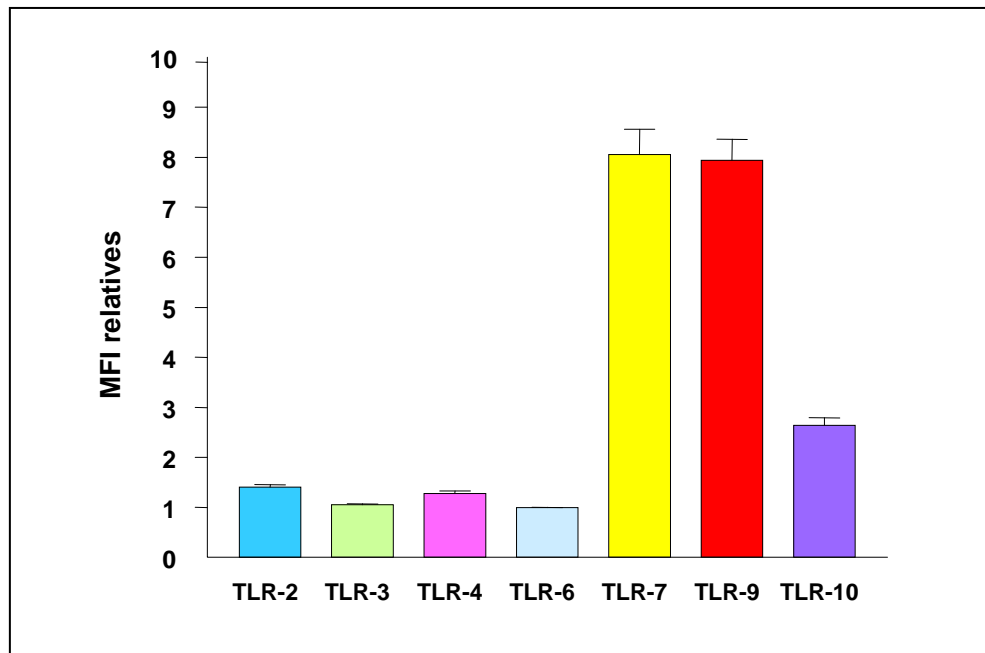


**Figure 30** : Profil d'expression des TLRs en cytométrie de flux au niveau des cellules B CD19+ du sang périphérique de sujets témoins sains

Les lymphocytes B ont été marqués avec un anticorps anti-CD19-ECD et avec des anticorps anti-TLR-2, TLR-4, TLR-3, TLR-6, TLR-7, TLR-9 et TLR-10 ou avec des isotypes contrôles. TLR-2 et TLR-4 ont été étudiés à la surface cellulaire, alors que TLR-3, TLR-6, TLR-7, TLR-9 et TLR-10 ont été analysés après perméabilisation. Les histogrammes des intensités de fluorescence des TLRs étudiés sont représentés avec le contrôle isotypique correspondant.

Il est à noter que pour TLR-4, il semble y avoir une deuxième population, très minoritaire, avec une forte expression de ce récepteur.

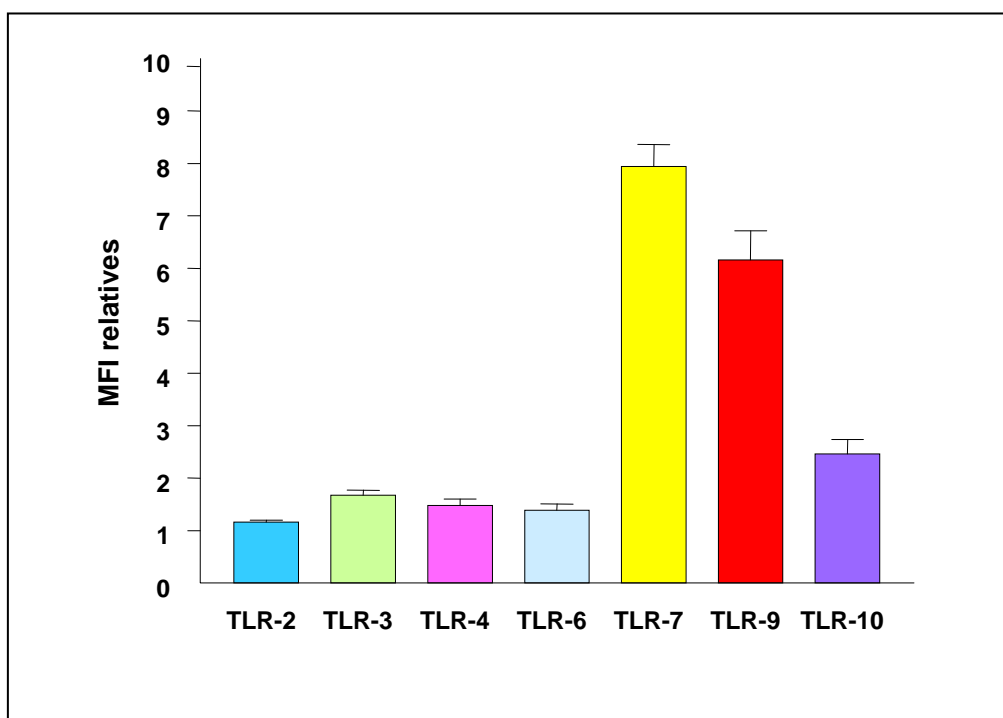
L'analyse par cytométrie de flux a montré une absence d'expression de TLR-3 et TLR-6 et une faible expression de TLR-2 et TLR-4 au niveau des lymphocytes B CD19+ issus du sang périphérique des volontaires sains. Par contre, une forte expression intracytoplasmique de TLR-7, TLR-9 et TLR-10 a pu être mise en évidence chez tous les sujets testés (figure 31).



**Figure 31** : Profil d'expression des TLRs au niveau des cellules B CD19+ du sang périphérique de sujets témoins

Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI des TLRs par rapport au contrôle isotypique.

L'expression des TLRs au niveau de cellules B CD19+ amygdaliennes met en évidence des résultats similaires à ceux observés au niveau des lymphocytes B du sang périphérique c'est à dire une faible expression de TLR-3, TLR-6, TLR-2 et TLR-4 et une forte expression de TLR-7, TLR-9 et TLR-10 (figure 32).

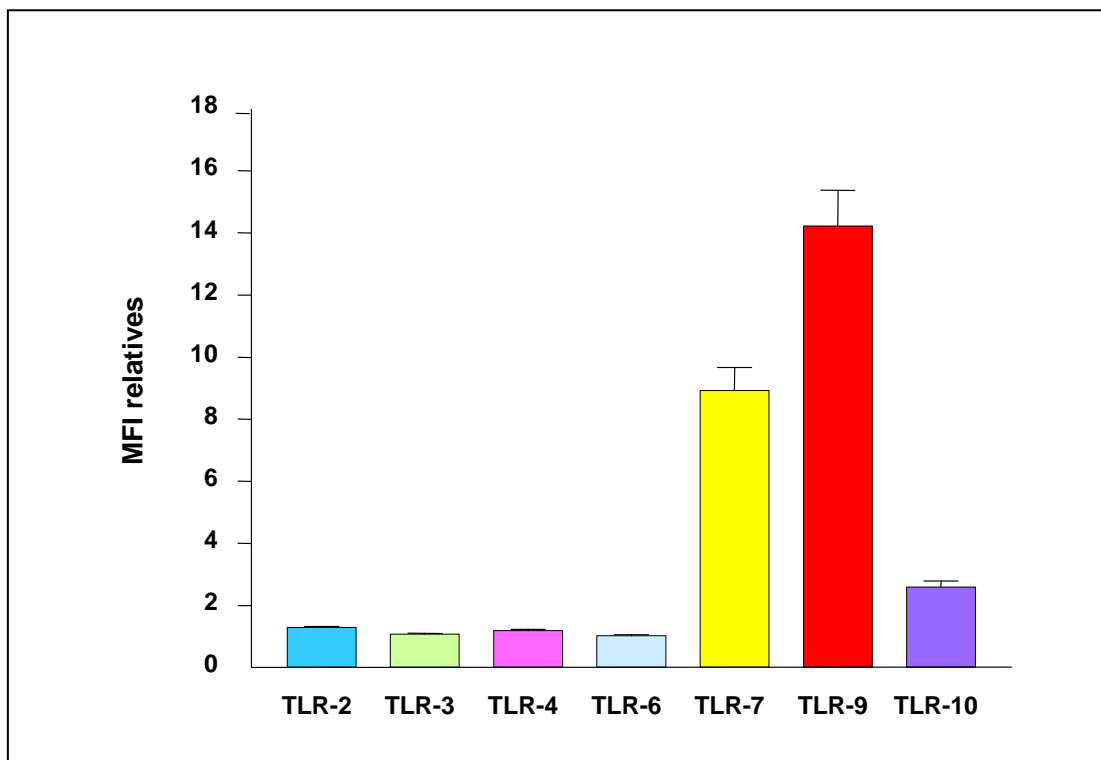


**Figure 32** : Profil d'expression des TLRs au niveau des cellules B CD19+ d'amygdales palatines

Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI des TLRs par rapport au contrôle isotypique.

### I.1.2 - Etude de l'expression des TLRs au niveau des cellules B de LLC-B

Ces analyses immunophénotypiques ont montré un profil d'expression similaire à celui des cellules B saines. En effet, aucune expression de TLR-3 et TLR-6 n'a été notée, TLR-2 et TLR-4 étaient faiblement exprimés, alors que TLR-7, TLR-9 et TLR-10 étaient fortement exprimés. Toutefois, les cellules CD19+ de LLC-B présentaient une expression de TLR-9 quasiment 2 fois plus importante par rapport à celle observée au niveau des lymphocytes B CD19+ sains (figure 33).



**Figure 33** : Profil d'expression des TLRs au niveau des cellules B CD19+ de patients atteints de LLC-B

Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI des TLRs par rapport au contrôle isotypique.

Le tableau 10 présente l'ensemble des résultats ratios de MFI obtenus pour les différents TLRs étudiés, au niveau des lymphocytes B CD19+ sains du sang périphérique, d'amygdales palatines et des cellules tumorales de LLC-B.



**Tableau 9** Expression des TLRs au niveau des cellules B normales du sang périphérique et d'amygdales palatines et au niveau de cellules B de LLC.

	Lymphocytes B sains Sang périphérique	Lymphocytes B sains Amygdales	Lymphocytes B tumoraux
TLR-2	1.41 ± 0.04	1.16 ± 0.04	1.28 ± 0.04
TLR-3	1.05 ± 0.02	1.67 ± 0.10	1.08 ± 0.02
TLR-4	1.28 ± 0.05	1.48 ± 0.12	1.18 ± 0.05
TLR-6	0.99 ± 0.01	1.39 ± 0.12	1.02 ± 0.03
TLR-7	<b>8.06 ± 0.50</b>	<b>7.94 ± 0.42</b>	<b>8.93 ± 0.74</b>
TLR-9	<b>7.94 ± 0.42*</b>	<b>6.16 ± 0.56**</b>	<b>14.22 ± 1.15</b>
TLR-10	<b>2.64 ± 0.15</b>	<b>2.46 ± 0.28</b>	<b>2.59 ± 0.20</b>

Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne (± ES) des ratios de MFI des TLRs par rapport au contrôle isotypique.

\* = p<0.001 versus lymphocytes B tumoraux ; \*\* = p<0.03 versus lymphocytes B tumoraux

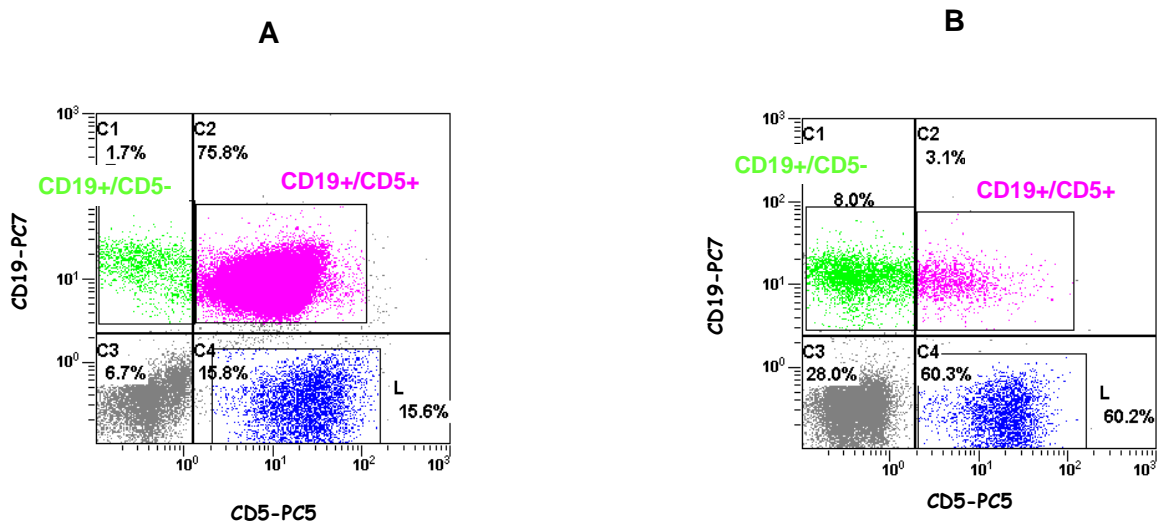
Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les TLR-2, -3, -4, -6, -7 et -10, d'une part, entre les cellules B saines du sang périphérique et les cellules B tumorales de LLC-B, et d'autre part, entre les cellules B saines amygdaliennes et les cellules B de LLC-B. Par contre, l'expression de TLR-9 était significativement plus importante dans les cellules B tumorales du sang périphérique (p<0.001) ainsi que dans les cellules B amygdaliennes (p<0.03) par rapport aux cellules B CD19+ de patients atteints de LLC-B.

Afin de vérifier que les cellules B normales CD19+/CD5-, présentes en très faible proportion chez les patients atteints de LLC-B, mais également que les cellules B CD19+/CD5+, rares chez les sujets sains, n'influençaient pas les résultats précédemment décrits, nous avons examiné, au cours d'une deuxième série d'analyses, l'expression des TLRs intracytoplasmiques à la fois au niveau des cellules B CD19+/CD5+ et des cellules CD19+/CD5- de prélèvements sanguins pathologiques et contrôles.

L'expression des TLR-7, TLR-9 et TLR-10 a alors été recherchée par cytométrie de flux

chez 11 patients atteints de LLC-B (moyenne d'âge de  $64.9 \pm 3.7$ ), et 11 sujets contrôles (moyenne d'âge de  $46.6 \pm 3.7$  ans).

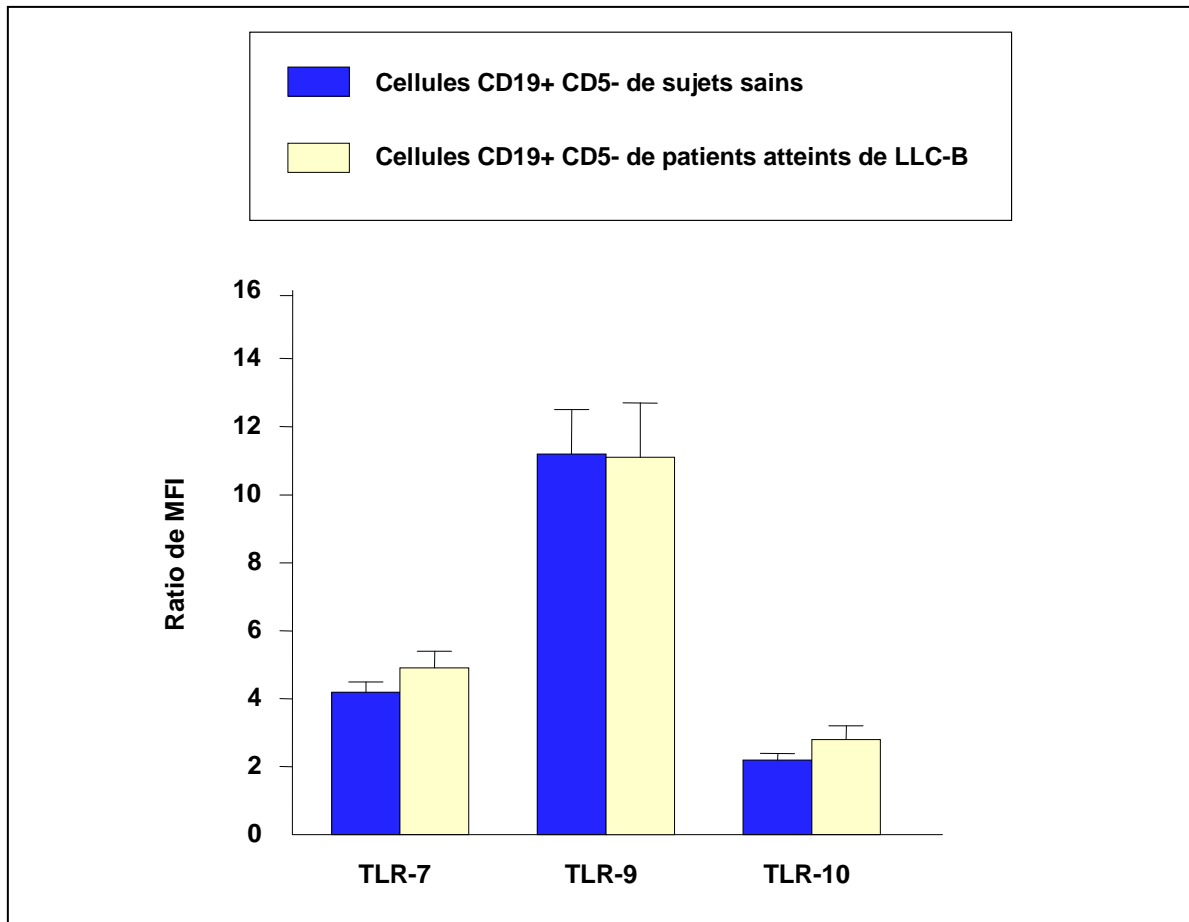
La figure 34 illustre un exemple des histogrammes obtenus par cytométrie de flux permettant d'identifier les cellules CD19+/CD5- et les cellules CD19+/CD5+ dans les échantillons de patients atteints de LLC-B (figure 34A) et de sujets contrôles (figure 34B).



**Figure 34** : Exemple d'histogrammes biparamétriques utilisés pour l'étude du profil d'expression des TLR-7, -9 et -10 au niveau des cellules B CD19+CD5- et CD19+CD5+ dans des échantillons de sujets contrôles et de patients atteints de LLC-B

Les lymphocytes B ont été marqués avec des anticorps anti-CD19-PC7, anti-CD5-PC5 et avec des anticorps anti-TLR-7, TLR-9 et TLR-10 ou avec des isotypes contrôles. Les histogrammes **A** et **B** sont représentatifs du profil de distribution des cellules CD19+/CD5+ et CD19+/CD5- respectivement chez les patients atteints de LLC-B et les sujets contrôles.

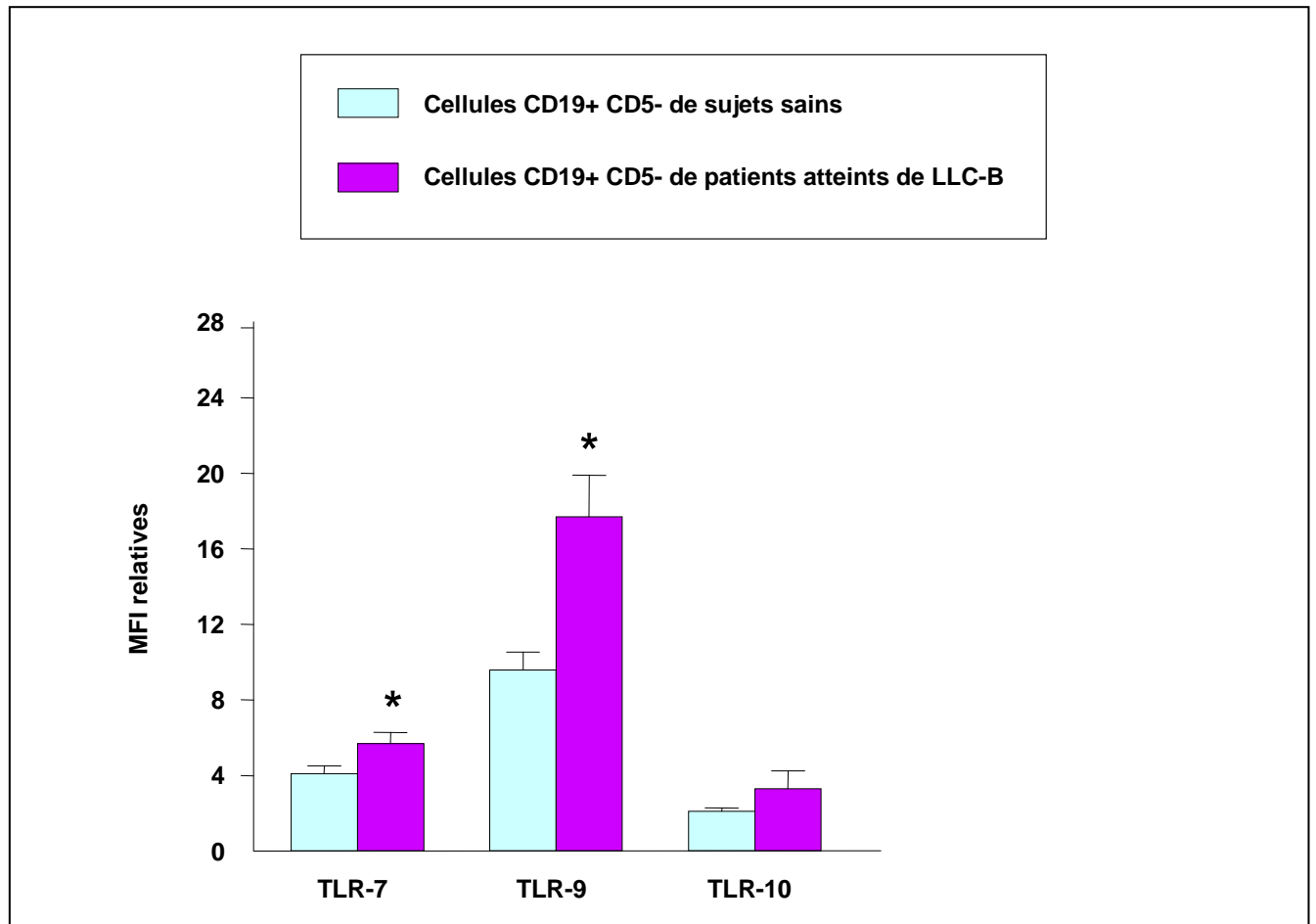
Les analyses immunophénotypiques ont montré que les lymphocytes B normaux CD19+/CD5- des patients et des individus témoins présentaient une expression identique de ces 3 TLRs (figure 35).



**Figure 35** : Expression de TLR-7, TLR-9 et TLR-10 au niveau des cellules B CD19+ CD5- de sujets sains et de patients atteints de LLC-B

Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI des TLRs par rapport au contrôle isotypique.

Par contre, nous avons relevé une expression significativement plus importante de TLR-7 ( $p=0.02$ ) et TLR-9 ( $p=0.002$ ) au niveau des cellules B CD19+/CD5+ des patients par rapport aux cellules B CD19+/CD5+ des sujets normaux. Aucune différence n'a été observée pour TLR-10 (figure 36).



**Figure 36** : Expression de TLR-7, TLR-9 et TLR-10 au niveau des cellules B CD19+ CD5+ de sujets sains et de patients atteints de LLC-B

Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI des TLRs par rapport au contrôle isotypique.

\* =  $p < 0.05$  versus lymphocytes B CD19+/CD5+ sains.

Au vu de ces résultats, et puisque aucun ligand n'a été identifié pour TLR-10, nous avons choisi de nous focaliser sur TLR-7 et TLR-9 et d'étudier l'effet de leur stimulation via un de leur ligands sur des cellules B de LLC et des lymphocytes B normaux amygdaliens. Nous nous sommes également intéressés à l'effet d'une stimulation de TLR-4 via le LPS, puisque, d'une part, nous avons noté une sous-population de cellules B, minoritaire, qui exprime fortement TLR-4 et, d'autre part, puisque le LPS est couramment utilisé pour stimuler des cellules B murines.

Des travaux précédents réalisés au laboratoire ont montré qu'une stimulation des cellules B amygdaliennes et de LLC-B avec le PMA induisait des modifications immunophénotypiques avec une augmentation de l'expression des marqueurs de coactivation et de présentation. Les stimulations avec cet ester de phorbol ont donc joué le rôle de contrôle de stimulation positive dans nos travaux et nous avons comparé l'effet de cette activation avec une stimulation par le LPS.

## **II - EFFET DE LA STIMULATION DES CELLULES B SAINES ET TUMORALES VIA TLR-4**

### **II.1 - Stimulation des cellules B amygdaliennes via TLR-4**

L'influence d'une stimulation de TLR-4 via le LPS a été étudiée au niveau de cellules B amygdaliennes représentatives de lymphocytes B normaux.

Cette analyse a été réalisée au niveau de suspensions cellulaires éluées de 5 amygdales palatines d'enfants âgés de 1 à 5 ans (moyenne d'âge de  $4 \pm 0.2$  ans) exprimant en moyenne 69.6% ( $\pm 2.1$ ) de cellules B, 6% ( $\pm 1.4$ ) de cellules CD19+/CD5+ et 19% ( $\pm 3.3$ ) de lymphocytes T. L'absence de CD14 et de CD33 a été vérifiée dans toutes les suspensions cellulaires .

Les suspensions cellulaires de cellules B amygdaliennes ont été stimulées pendant 3 jours avec 5 concentrations de LPS (0.1  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  et 200  $\mu\text{g/mL}$ ). Des cellules cultivées avec du milieu de culture seul et des cellules stimulées avec 5  $\mu\text{g/L}$  de PMA ont respectivement été utilisées comme témoin négatif et témoin positif d'activation cellulaire.

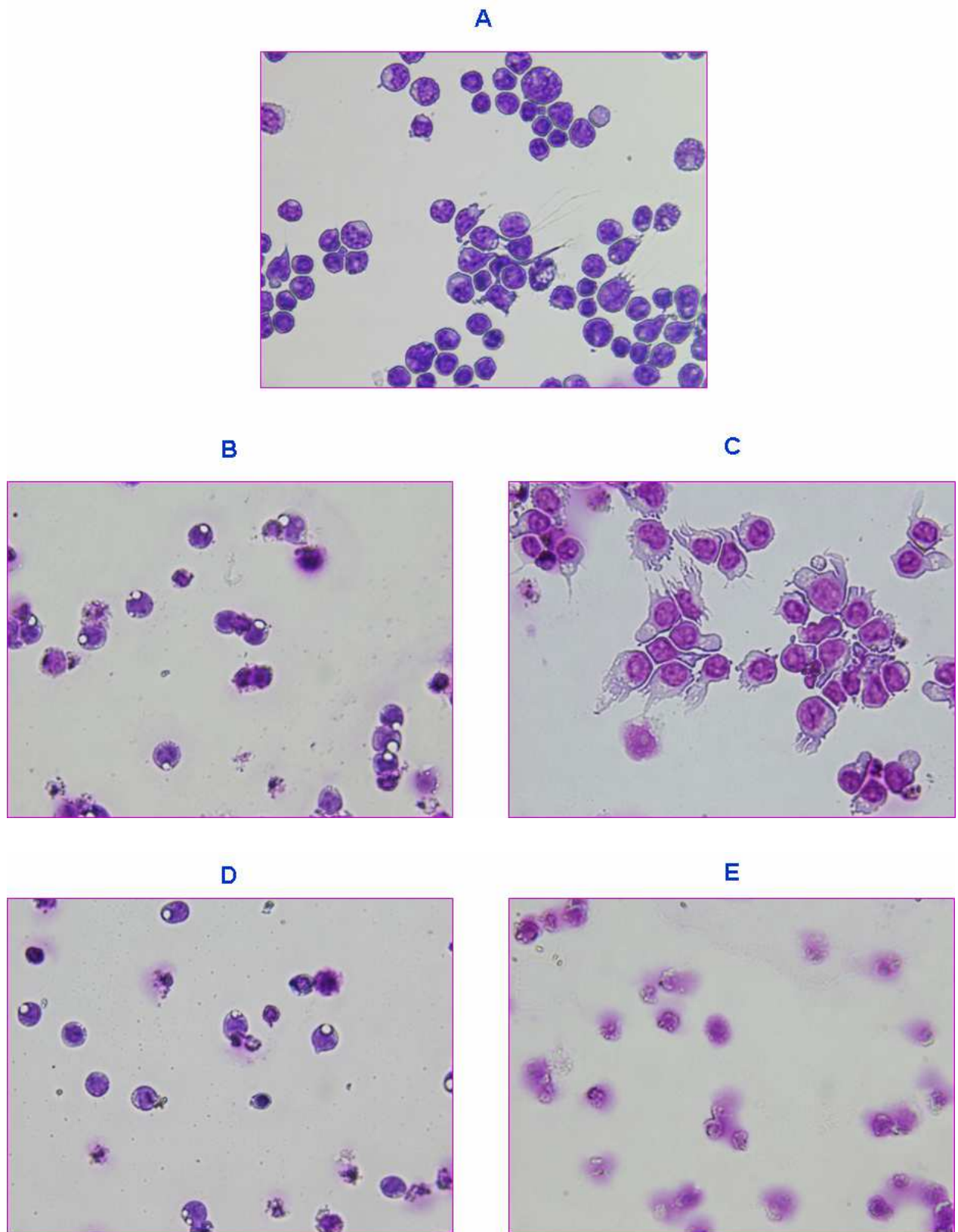
## II.1.1 - Etude morphologique

A J0, l'analyse cytologique montrait, pour tous les échantillons, une population hétérogène avec des cellules rondes de petite taille et de plus grande taille et quelques cellules avec des prolongements cytoplasmiques (figure 37A).

Après stimulation avec 5 µg/L de PMA et dès J1, les cellules étaient rondes de taille moyenne à grande, avec de longues expansions cytoplasmiques ressemblant à des dendrites et un noyau à chromatine fine (figure 37C), alors que des ombres de Gümprrecht étaient visibles pour les cellules sans stimulation traduisant ainsi l'apoptose de ces cellules (figure 37B). Après 2 jours de culture, les cytocentrifugats des suspensions cellulaires stimulées avec le PMA colorés au May Grünwald Giemsa montraient des cellules de même morphologie avec un nombre plus important de cellules présentant de longues expansions cytoplasmiques. Toutefois, à J3, des ombres de Gümprrecht apparaissaient.

L'examen des cellules stimulées pendant 48 heures avec 0.1, 1 et 10 µg/mL de LPS a mis en évidence des cellules de même morphologie que les cellules contrôles avec quasiment la moitié d'ombres de Gümprrecht (figure 37D).

Après culture pendant 48 heures avec 100 et 200 µg/mL de LPS, les cytocentrifugats des suspensions cellulaires colorés au May Grünwald Giemsa ne mettaient en évidence que des ombres de Gümprrecht (figure 37E).



**Figure 37** : Morphologie des cellules B amygdaliennes après stimulation ou non avec du PMA ou du LPS

Morphologie initiale des cellules d'amygdales palatines à J0 (A), après 48 heures de culture sans stimulation (B), après 48 heures de stimulation avec 5 µg/L de PMA (C), après 48 heures de stimulation avec 10 µg/mL de LPS (D), ou avec 100 µg/mL de LPS (E).

## II.1.2 - Etude immunophénotypique

L'effet de l'engagement de TLR-4 sur l'activation cellulaire a été étudié par la mesure de l'expression membranaire des molécules HLA-DR, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83 et CD86 impliquées dans la fonction de présentation antigénique. Nous nous sommes également intéressés à CD138, marqueur des plasmocytes et à CD38, marqueur des lymphocytes B précurseurs et des cellules plasmocytaires, afin de déterminer si la stimulation via TLR-4 induisait une différenciation de ces cellules B en plasmocytes. De plus, pour chaque suspension cellulaire stimulée ou non, nous avons vérifié l'absence de monocytes et de granulocytes par marquage avec des anticorps anti-CD13, anti-CD14 et anti-CD33.

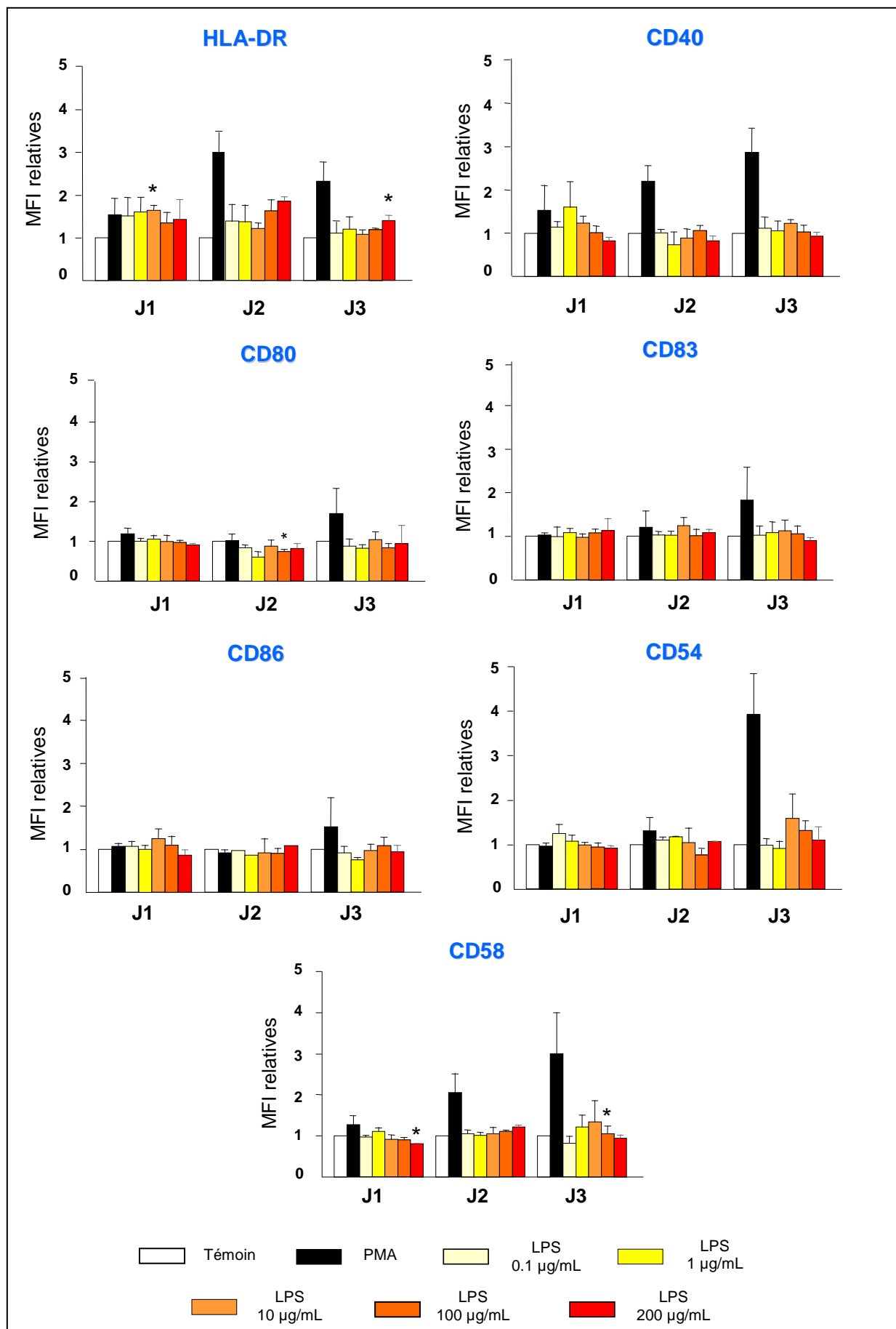
Les analyses immunophénotypiques présentés sur la figure 38 montrent que le PMA induit une surexpression d'environ 3 fois de HLA-DR, après 2 et 3 jours de stimulation, par rapport aux puits contrôles avec le milieu de culture seul. Nous avons également noté une augmentation de l'expression de CD40 qui était quasiment 3 fois plus importante à J3, de CD80 et CD83 (1.8 fois plus importante à J3), de CD86 (1.5 fois plus importante à J3), de CD54 (4 fois plus importante à J3) et de CD58 (jusqu'à 3 fois plus importante à J3).

HLA-DR est surexprimé dans un rapport d'environ 1.6 fois après 24 heures de culture avec le LPS par rapport aux cellules témoins sans stimulation et ce quelles que soient les concentrations testées. A J2, les résultats montrent une augmentation de l'expression de ce marqueur respectivement de 1.4, 1.5, 1.2, 1.7 et 1.9 fois pour les cellules stimulées avec 0.1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL et 200 µg/mL de LPS. Seule la stimulation des cellules amygdaliennes avec 200 µg/mL de LPS induit une légère surexpression significative de HLA-DR à J3 avec une augmentation d'environ 1.4 fois.

Une légère augmentation de l'expression de CD54 et CD58 d'environ 1.5 fois est observée uniquement après 72 heures de culture avec 10 µg/mL de LPS.

Aucune variation de l'expression des autres marqueurs étudiés n'a été notée.





**Figure 38** : Expression des molécules de présentation et de costimulation sur des cellules B amygdaliennes stimulées ou non par du PMA ou du LPS

Les cellules d'amygdales palatines ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 0.1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL et 200 µg/mL de LPS, ou avec 5 µg/L de PMA. L'expression de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD54 et CD58 a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI de chacun des marqueurs par rapport à leur expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus témoin.

## II.2 - Stimulation des cellules B de LLC-B via TLR-4

L'effet de la stimulation de TLR-4 via le LPS a été étudié au niveau des cellules B de LLC-B de 5 individus avec un score de Matutes de 4 ou 5 par une analyse immunophénotypique. Ces sujets atteints de LLC-B étaient âgés de 47 à 78 ans (moyenne d'âge de  $64.6 \pm 1.9$  ans). Dans cet échantillon de patients, les proportions de cellules leucémiques CD19+/CD5+ étaient comprises entre 75 et 99% (moyenne :  $86.5 \pm 3.7$ ). Les proportions de cellules T et de cellules B persistantes étaient respectivement comprises entre 1.5 et 8.9% (moyenne :  $3.4 \pm 1.1$ ) et entre 0.7 et 6% (moyenne :  $2.2 \pm 0.7$ ). Aucune expression de CD38 n'a été relevée et moins de 5% des cellules des suspensions cellulaires étudiées exprimaient CD14 (moyenne :  $1.6 \pm 0.8$ ).

### II.2.1 - Etude morphologique

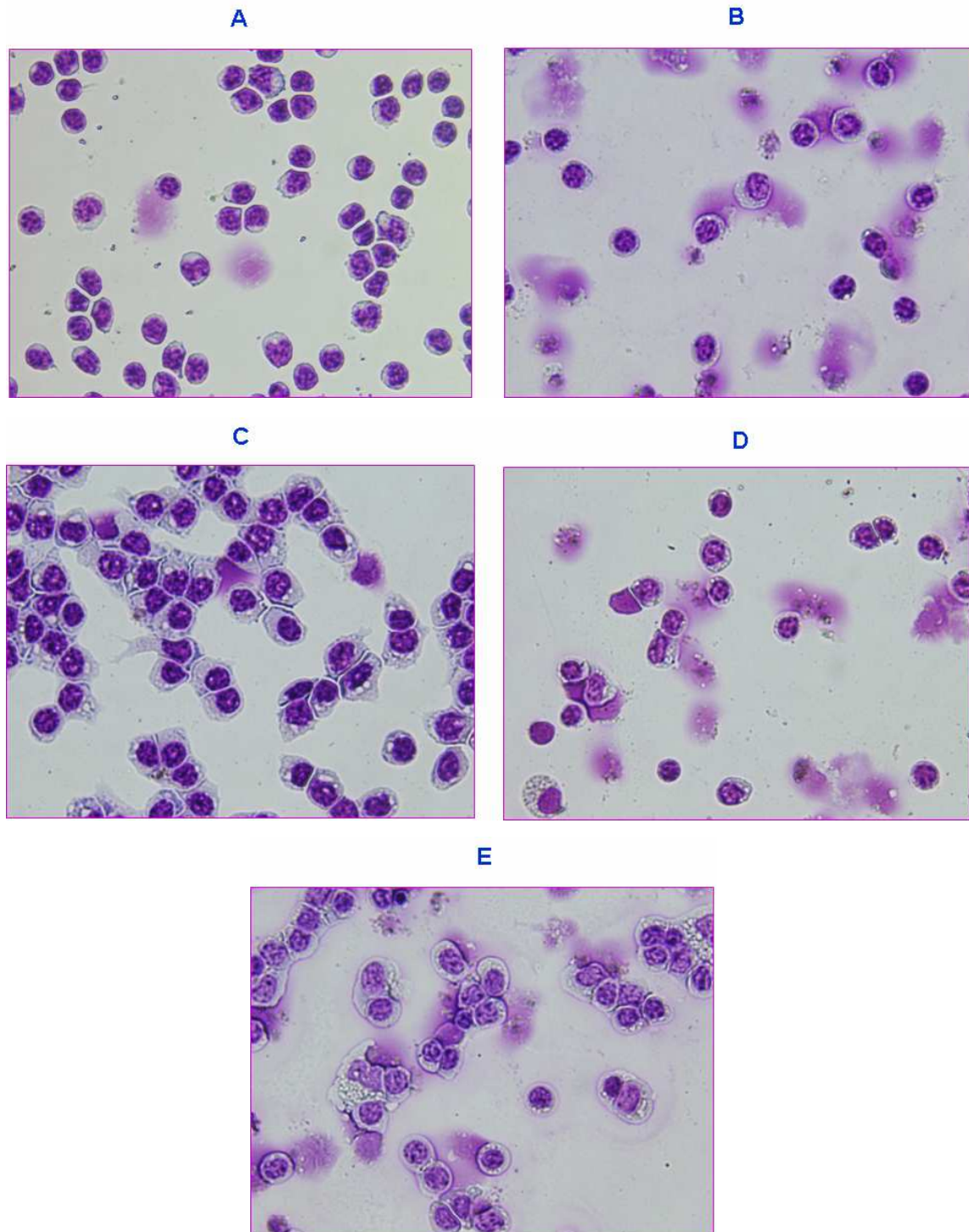
Les analyses cytomorphologiques des cellules tumorales à J0 révélèrent une population homogène avec de petites cellules rondes à rapport nucléo-cytoplasmique élevé (figure 39A). Dès J2, les cyto-centrifugats des suspensions cellulaires non stimulées colorés au May Grünwald Giemsa montraient des cellules de même morphologie avec quasiment la moitié d'ombres de Gümprécht caractéristiques des cellules apoptotiques (figure 39B).

Après stimulation avec le PMA, les cellules étaient plus grandes, avec un cytoplasme plus important, et de forme irrégulière. Quelques cellules présentaient de petits prolongements cytoplasmiques (figure 39C).

La morphologie des cellules stimulées pendant 48 heures avec 0.1, 1, 10 et 100 µg/mL de LPS était identique à celle des cellules cultivées avec le milieu de culture seul avec un

grand nombre d'ombres de Gümprrecht (figure 39D).

Après stimulation pendant 48 heures avec 200 µg/mL de LPS, les cytocentrifugats des suspensions cellulaires au May Grünwald Giemsa mettaient en évidence des cellules agrégées en amas volumineux et un cytoplasme plus abondant (figure 39E).



**Figure 39** : Morphologie des cellules tumorales de LLC-B après stimulation ou non avec du PMA ou du LPS

Morphologie initiale des cellules de LLC-B à J0 (**A**), après 48 heures de culture sans stimulation (**B**), après 48 heures de stimulation avec 5 µg/L de PMA (**C**), après 48 heures de stimulation avec 10 µg/mL de LPS (**D**), ou avec 200 µg/mL de LPS (**E**).

## II.2.2 - Etude immunophénotypique

Les marqueurs HLA-DR, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86, CD38, CD138, CD13, CD14 et CD33 ont été étudiés par cytométrie de flux comme pour les cellules B d'amygdales palatines.

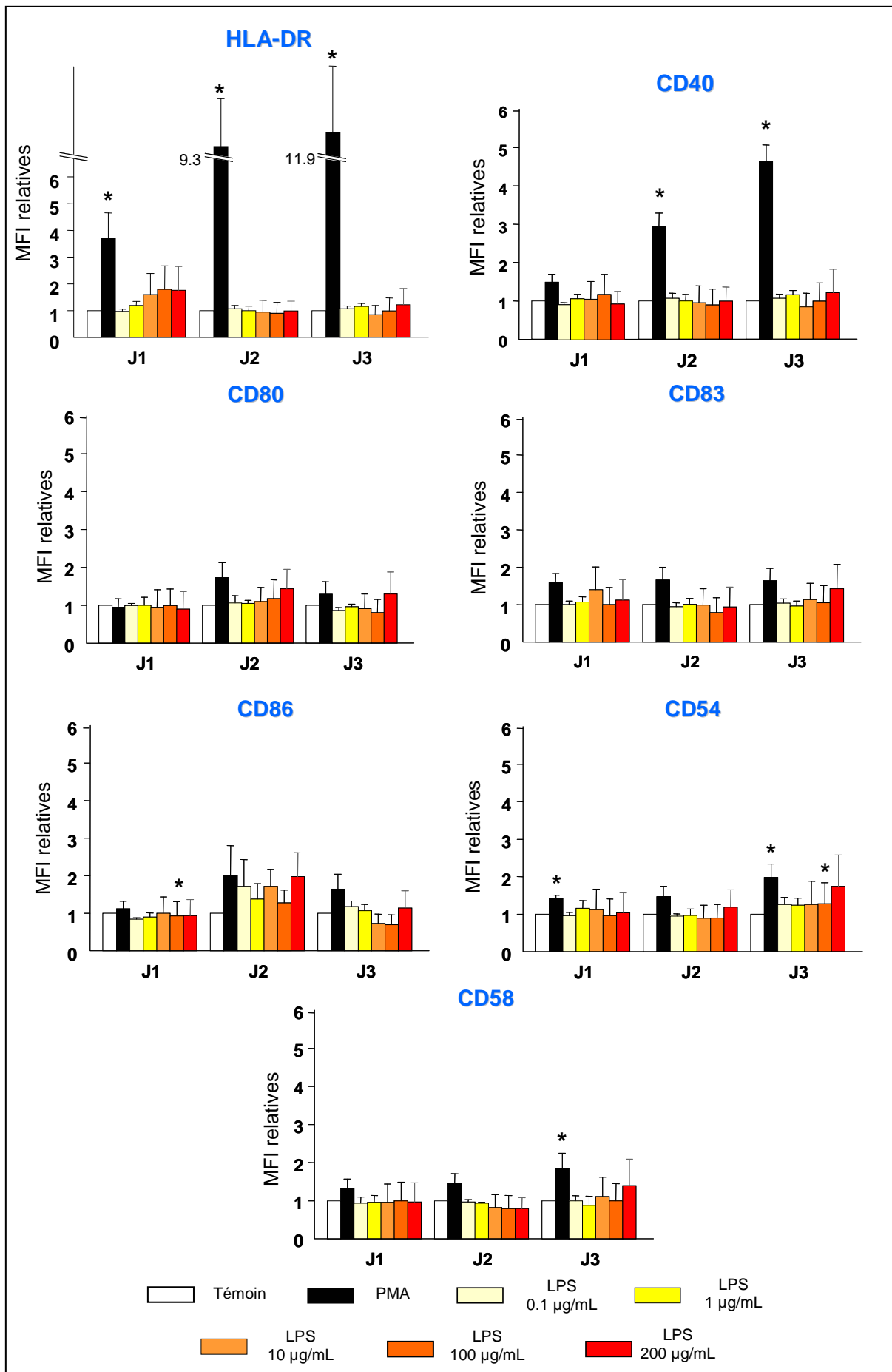
Aucune expression de CD38, CD138, CD13, CD14 et CD33 n'a été relevée dans les suspensions cellulaires stimulées ou non.

Les résultats présentés sur la figure 40 montrent qu'une stimulation des cellules de LLC-B avec le PMA induit une augmentation significative de l'expression de HLA-DR, jusqu'à 12 fois plus importante après 72 heures de culture que dans le cas des cellules non stimulées. De plus, CD40 est surexprimé dans un rapport de 5 fois à J3, CD54 3 fois dès J2 et CD58 3 fois à J3. Les cellules stimulées avec 5 µg/L de PMA présentent également une surexpression des marqueurs CD83 et CD86 à un moindre degré avec une augmentation respectivement de 2 fois à J2 et 1.5 fois dès J1. Par contre, aucune influence de cette stimulation par le PMA n'est observée pour CD80.

Une surexpression dose-dépendante de HLA-DR est visible à J1 dès 10 µg/mL de LPS. Les résultats montrent en effet une augmentation de l'expression de ce marqueur respectivement de 1.6, 1.7 et 1.8 fois pour les cellules de LLC-B stimulées avec 10, 100 et 200 µg/mL de LPS. Aucune variation de l'expression de ce marqueur n'a été mise en évidence après 48 et 72 heures de culture quelles que soient les concentrations de LPS testées.

Les résultats montrent également une surexpression de CD86, à J2 seulement, avec une augmentation respectivement augmentée de 1.7, 1.4, 1.7, 1.3 et 2 fois pour les cellules stimulées avec avec 0.1, 1, 10 et 100 µg/mL de LPS.

Les autres marqueurs de costimulation étudiés ne présentent aucune variation de leur expression.



**Figure 40** : Expression des molécules de présentation et de costimulation sur des cellules B de LLC stimulées ou non par du PMA ou du LPS

Les cellules de LLC-B ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837 ou avec 5 µg/L de PMA. L'expression de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD54 et CD58 a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI de chacun des marqueurs par rapport à leur expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus témoin.

### **III - EFFET DE LA STIMULATION DES CELLULES B SAINES ET TUMORALES VIA TLR-7**

#### **III.1 - Stimulation des cellules B amygdaliennes via TLR-7**

L'influence d'une stimulation de TLR-7 via l'imiquimod R837, qui correspond à un ligand synthétique appartenant à la famille des imidazoquinolines, a été évaluée au niveau de cellules B amygdaliennes.

Cette analyse a été réalisée au niveau de suspensions cellulaires de 15 amygdales palatines d'enfants âgés de 2 à 10 ans (moyenne d'âge de  $4.7 \pm 0.5$  ans) exprimant en moyenne 72% ( $\pm 2.7$ ) de cellules B, 8.4% ( $\pm 1.8$ ) de cellules CD19+/CD5+ et 20.6% ( $\pm 2.1$ ) de lymphocytes T. L'absence de CD14 et de CD33 a été vérifiée dans toutes les suspensions cellulaires.

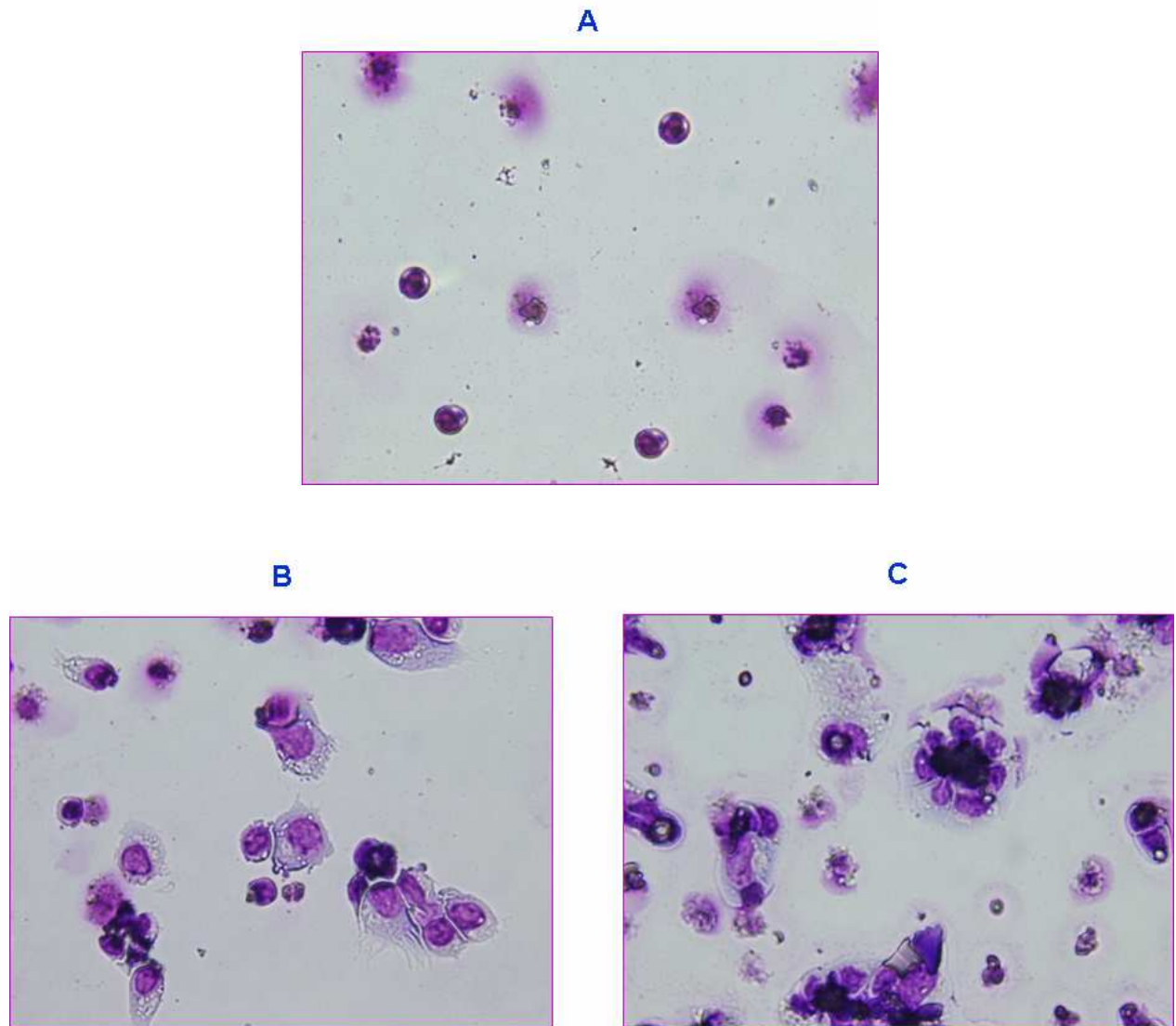
Les cellules B amygdaliennes ont été cultivées avec avec du milieu de culture seul, avec 4 concentrations d'imiquimod R837 (2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL et 20 µg/mL) ou avec 5 µg/L de PMA pendant 3 jours.

##### **III.1.1 - Etude morphologique**

Pour les suspensions amygdaliennes stimulées avec 2 et 5 µg/mL d'imiquimod R837, les études cytomorphologiques ont mis en évidence des cellules de plus grande taille que les

témoins sans stimulation. Quasiment la moitié de ces cellules présentaient des prolongements cytoplasmiques et des ombres de Gümprecht apparaissaient dès J2 (figures 41A et 41B).

Par contre, pour les doses les plus importantes testées (10 et 20  $\mu\text{g/mL}$ ), les cellules étaient agrégées en amas volumineux et, dès J1, nous avons observé un nombre important d'ombres de Gümprecht (figure 41C).



**Figure 41** : Morphologie des cellules B amygdaliennes après stimulation ou non via TLR-7

Morphologie initiale des cellules d'amygdales palatines après 48 heures de culture sans stimulation (A), après 48 heures de stimulation avec 5  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod R837 (B), ou avec 20  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod R837 (C).

### III.1.2 - Etude immunophénotypique

L'effet de l'engagement de TLR-7 sur l'activation cellulaire a été étudié par la mesure de l'expression membranaire des molécules HLA-DR, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD38, CD138, CD13, CD14 et CD33.

Aucune expression de CD38, CD138, CD13, CD14 et CD33 n'a été relevée dans les suspensions cellulaires amygdaliennes stimulées ou non.

Les résultats des analyses immunophénotypiques sont présentés sur la figure 42.

Après 24 heures de culture, une légère activation significative de l'expression de HLA-DR est observée après stimulation des cellules amygdaliennes avec 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod R837. Dès J2, la stimulation avec l'imiquimod R837 induit une surexpression significative de HLA-DR, 3 fois plus importante pour 2, 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$ , par rapport aux puits contrôles non stimulés, et 2 fois plus importante pour 20  $\mu\text{g/mL}$ . L'imiquimod entraîne également une augmentation de l'expression de HLA-DR, pour toutes les doses testées, après 72 heures de culture. Cette expression est jusqu'à 3.5 fois plus importante pour 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Les cellules d'amygdales palatines stimulées via TLR-7 présentent, à J1, une augmentation de l'expression de CD40 qui est 1.5 fois plus importante après stimulation avec 2 et 10  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod, et 2.3 fois plus importante pour la dose 5  $\mu\text{g/mL}$ . L'expression de CD40 est augmentée de façon similaire à J2 avec une expression jusqu'à 2.1 plus importante pour les cellules stimulées avec 10  $\mu\text{g/mL}$ . Après 72 heures de culture, on observe une augmentation de 1.6 fois pour les cellules stimulées avec 2 et 10  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod et de 1.8 fois après stimulation avec 5  $\mu\text{g/mL}$ . En revanche, aucune variation de CD40 n'a été notée pour les cellules stimulées avec 20  $\mu\text{g/mL}$ .

A J1, le marqueur CD54 présente une augmentation significative de 1.5 fois par rapport aux cellules témoins après stimulation avec 2, 10 et 20  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod et de 1.8 fois après stimulation avec 5  $\mu\text{g/mL}$ . Après 2 jours de culture, l'expression de CD54 est du même ordre avec une expression 1.4 fois plus importante après stimulation avec 2 et 5  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod R837 et 1.7 avec 10  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod. A J3, les résultats montrent une augmentation de l'expression similaire à celle notée à J2 pour les cellules stimulées avec 2, 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$  avec une augmentation de 1.4 fois. Aucune variation de l'expression de CD54 n'a été mise en évidence après stimulation des cellules avec 20  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod.



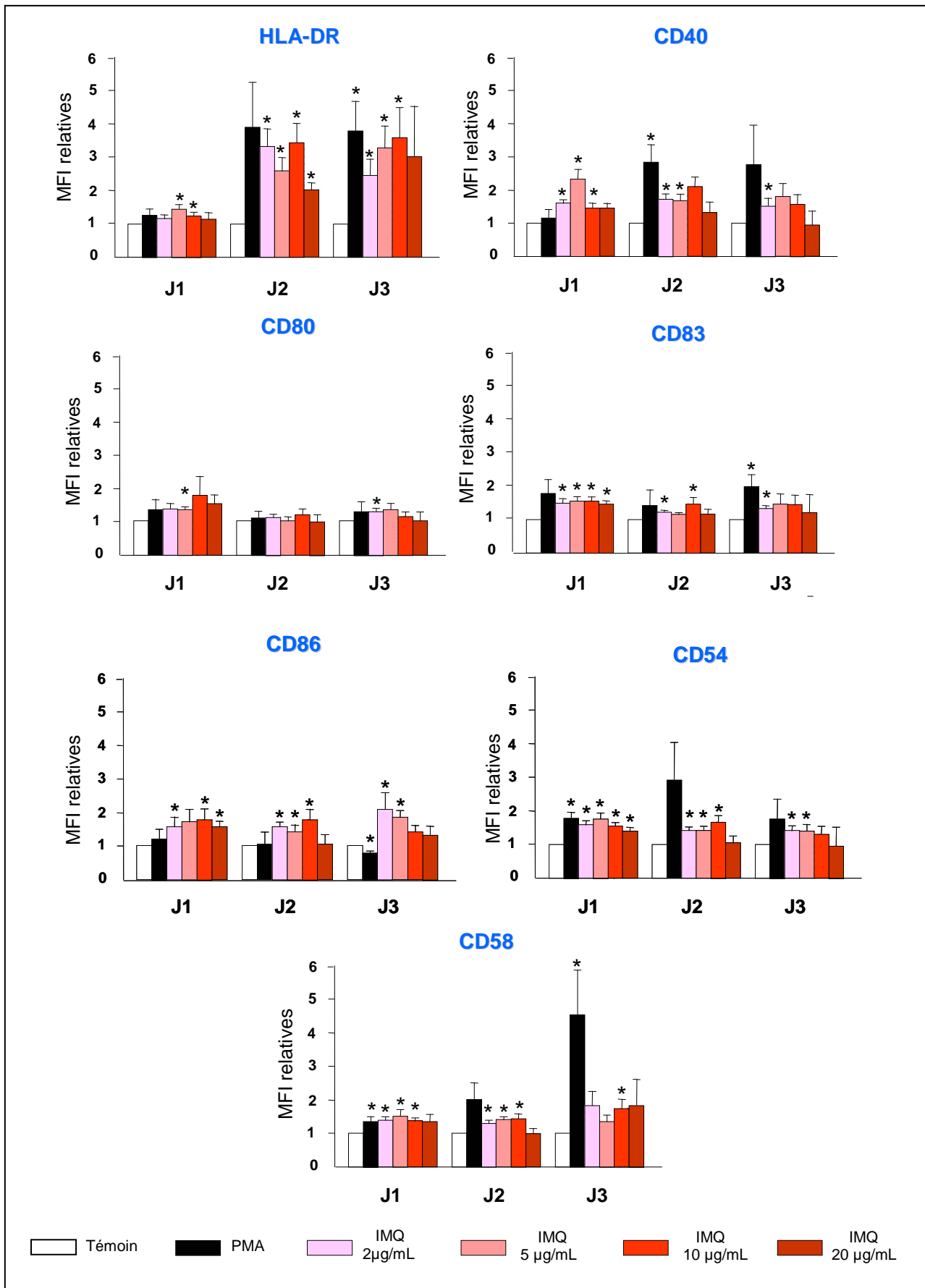
Les résultats ont également révélé une légère surexpression de CD58 qui est quasiment identique à J1 et J2 avec une surexpression d'environ 1.4 fois plus importante. Après 72 heures de culture, les cellules amygdaliennes stimulées avec 5 µg/mL présentent une surexpression similaire à celle observée à J1 et J2. Une légère augmentation de cette expression de 1.8 fois par rapport aux cellules témoins après stimulation est notée après stimulation avec 2, 10 et 20 µg/mL d'imiquimod..

L'expression de CD83 est augmentée significativement de 1.5 fois dès J1 pour toutes les doses d'imiquimod. A J2, cette expression est quasiment identique pour toutes les doses d'imiquimod testées à l'exception de 20 µg/mL qui n'induit aucune activation de ce marqueur. L'expression de CD83 est quasiment identique à J3 (jusqu'à 1.4 fois plus importante) pour les cellules stimulées avec 2, 5 et 10 µg/mL et de 1.2 fois plus importante après stimulation avec 20 µg/mL.

L'expression de CD86 est quasiment identique pour toutes les doses d'imiquimod testées avec une augmentation de presque 1.8 fois à J1 et J2. Un effet dose est visible après 3 jours de culture avec une surexpression significative de 2 fois pour les cellules stimulées avec 2 µg/mL d'imiquimod.

L'imiquimod induit une légère augmentation de l'expression de CD80 après 24 heures de culture surtout pour 10 et 20 µg/mL d'imiquimod, doses pour lesquelles on note respectivement une augmentation de 1.7 et 1.5 fois. Après 48 heures de culture, aucune variation de l'expression de ce marqueur n'est observée et après 72 heures, seules les doses 2 et 5 µg/mL induisent une légère augmentation de l'expression de CD80.

L'imiquimod R837 induit par conséquent une forte surexpression de HLA-DR et une augmentation, à un moindre degré, des autres marqueurs de costimulation étudiés au niveau des cellules B saines d'amygdales palatines.



**Figure 42** : Expression des molécules de présentation et de costimulation au niveau des cellules B amygdaliennes stimulées ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837

Les cellules amygdaliennes ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837 ou avec 5 µg/L de PMA. L'expression de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD54 et CD58 a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI de chacun des marqueurs par rapport à leur expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus témoin.

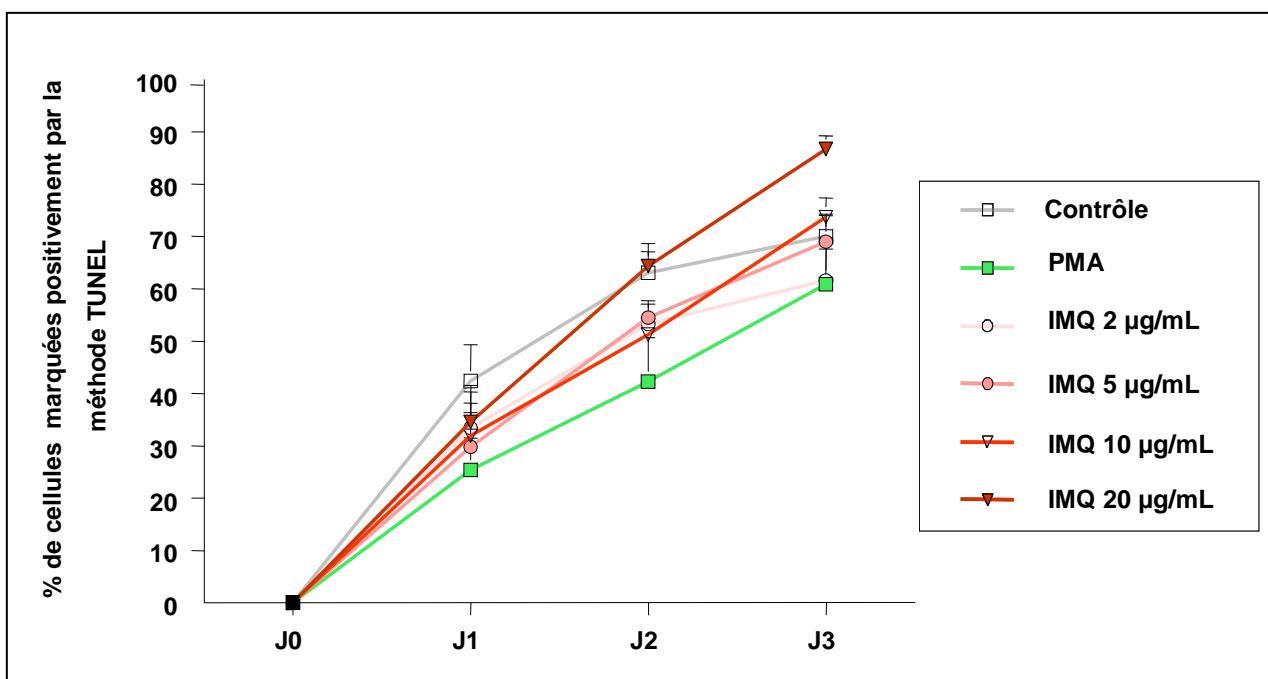
### III.1.3 - Etude de l'apoptose

L'analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL a été réalisée au niveau de suspensions cellulaires issues de 5 amygdales palatines (moyenne d'âge de  $5 \pm 0.5$  ans).

Les analyses par cytométrie de flux présentées sur la figure 43 montrent que les cellules B amygdaliennes stimulées par le PMA présentent une apoptose moins importante que les cellules témoins non stimulées, pour les 3 premiers jours de culture, avec une différence significative ( $p=0.04$ ) de 20% pour J1 et J2.

Les stimulations avec 2 µg/mL, 5 µg/mL et 10 µg/mL d'imiquimod R837 induisent une apoptose moins rapide que dans les puits témoins pour les deux premiers jours de culture avec une différence significative de 10%. A partir de J3, seule la stimulation avec 2 µg/mL induit une apoptose plus faible que pour les cellules des puits contrôles non stimulés, avec un pourcentage de cellules apoptotiques de 61%, identique à celui observé pour les cellules stimulées avec le PMA. Par contre, aucune différence significative ne persiste entre les cellules stimulées avec 5 et 10 µg/mL d'imiquimod et les cellules contrôles non stimulées. Pour 20 µg/mL, qui correspond à la dose la plus importante testée, les résultats ont montré une induction significative ( $p=0.04$ ) de l'apoptose dès J3 avec près de 87% de cellules apoptotiques alors 70% des cellules sans stimulation étaient apoptotiques.

Des analyses complémentaires réalisées par cytométrie de flux ont montré des taux d'apoptose approchant 97% à J6 et 100% à J7.



**Figure 43** : Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les cellules d'amygdales palatines stimulées ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837

Les cellules amygdaliennes stimulées ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837 ou avec 5 µg/L de PMA ont été marquées par la méthode TUNEL et analysées par cytométrie de flux de J1 à J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) de pourcentages de cellules TUNEL positives.

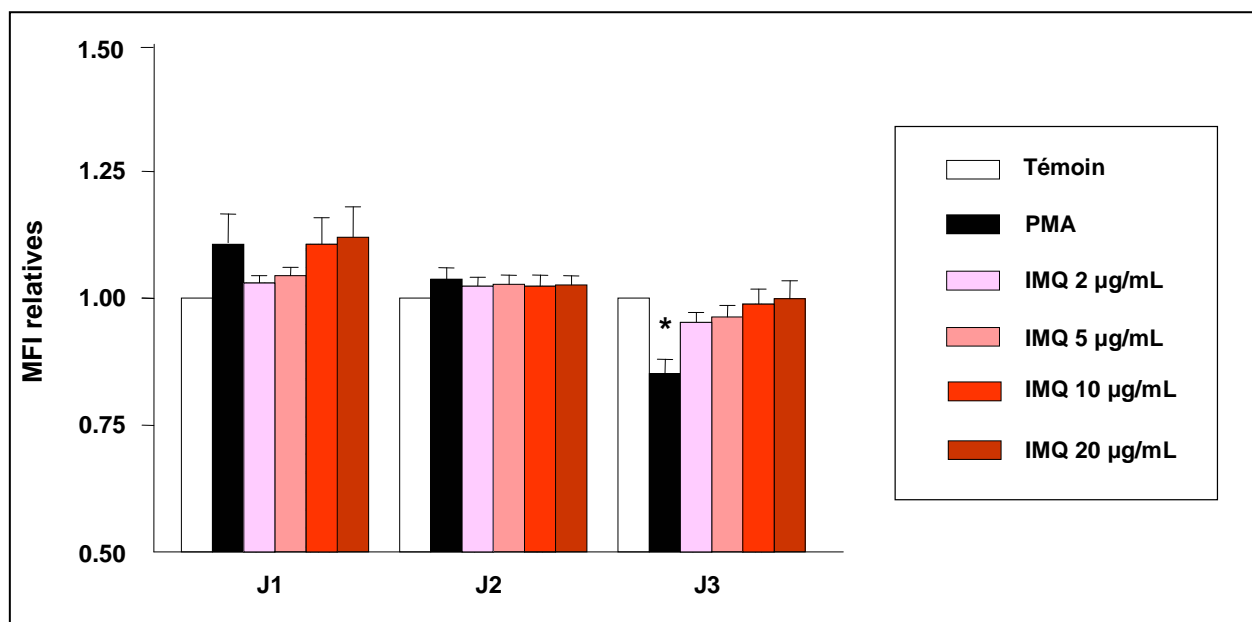
### III.1.4 - Etude de la prolifération

Les analyses de la prolifération ont été réalisées après marquage au CFSE au niveau de 8 prélèvements d'amygdales palatines (moyenne d'âge de  $5 \pm 0.1$  ans).

La fluorescence du CFSE se distribue de façon égale entre les cellules filles. Il est donc possible d'évaluer la prolifération cellulaire, par la décroissance du signal fluorescent, et donc par la diminution de la MFI, en cytométrie de flux.

Les résultats obtenus présentés sur la figure 44 montrent que le PMA induit une prolifération significative ( $p=0.0007$ ) dès J3.

Aucune variation de la prolifération des cellules amygdaliennes n'est observée après stimulation avec toutes les doses d'imiquimod testées après 24, 48 et 72 heures de culture.



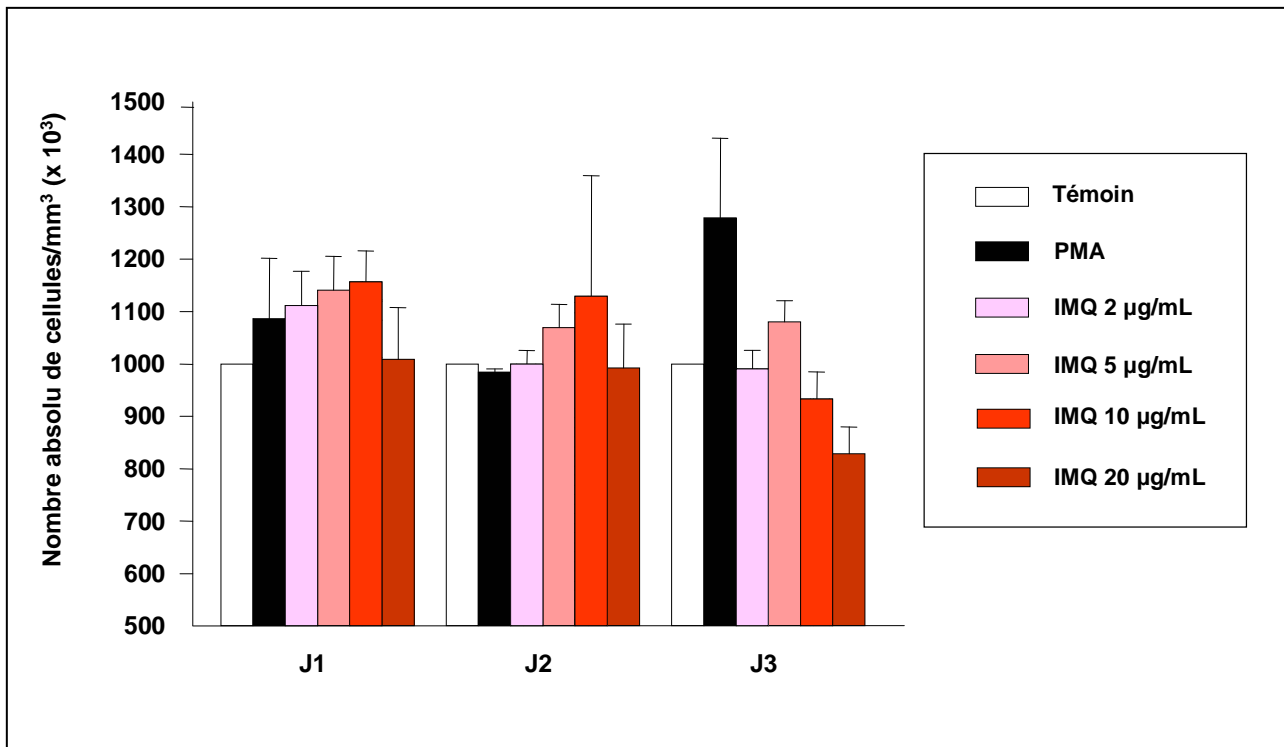
**Figure 44** : Etude de la prolifération des cellules B amygdaliennes stimulées ou non par du PMA ou avec l'imiquimod R837

Les cellules amygdaliennes marquées par le CFSE ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837 ou avec 5 µg/L de PMA. La fluorescence du CFSE a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI du CFSE par rapport à son expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus témoin.

Ces résultats concernant l'apoptose et la prolifération des cellules d'amygdales palatines étaient concordants avec l'analyse du nombre absolu de cellules mesuré avec des fluorosphères par cytométrie de flux. L'examen du nombre de cellules/mm<sup>3</sup> présentes dans les puits n'a en effet montré aucune différence significative entre les cellules stimulées et les cellules témoins, non stimulées après 24 et 48 heures de culture. Après 72 heures, une légère diminution du nombre absolu des cellules présentes dans les puits en présence de 20 µg/mL d'imiquimod R837 a été observée traduisant des taux d'apoptose plus importants que les cellules non stimulées (figure 45).

En présence de PMA, une légère augmentation du nombre de cellules a été observée surtout après 3 jours de culture, confirmant la prolifération identifiée par la diminution du marquage CFSE (figure 45).



**Figure 45** : Etude du nombre absolu de cellules amygdaliennes présentes dans les puits de culture après stimulation via TLR-7

Les cellules d'amygdales palatines ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837 ou avec 5 µg/L de PMA. Pour chaque échantillon, le nombre absolu de cellules a été déterminé en ajoutant 50 µL de fluorosphères à 50 µL de chaque suspension cellulaire stimulée ou non.

Des expériences complémentaires réalisées jusqu'à 7 jours de culture n'ont montré aucune variation de la prolifération des cellules amygdaliennes stimulées avec l'imiquimod R837 et une prolifération progressive des cellules traitées avec le PMA.

### III.2 - Stimulation des cellules B de LLC-B via TLR-7

Nous avons étudié l'effet de la stimulation de TLR-7 via l'imiquimod R837, sur des cellules B de LLC-B de 7 individus avec un score de Matutes de 4 ou 5 par une analyse immunophénotypique. Les individus inclus dans cette étude étaient âgés de 43 à 72 ans (moyenne d'âge de  $61.7 \pm 3.8$  ans). Dans cet échantillon de patients, les proportions de

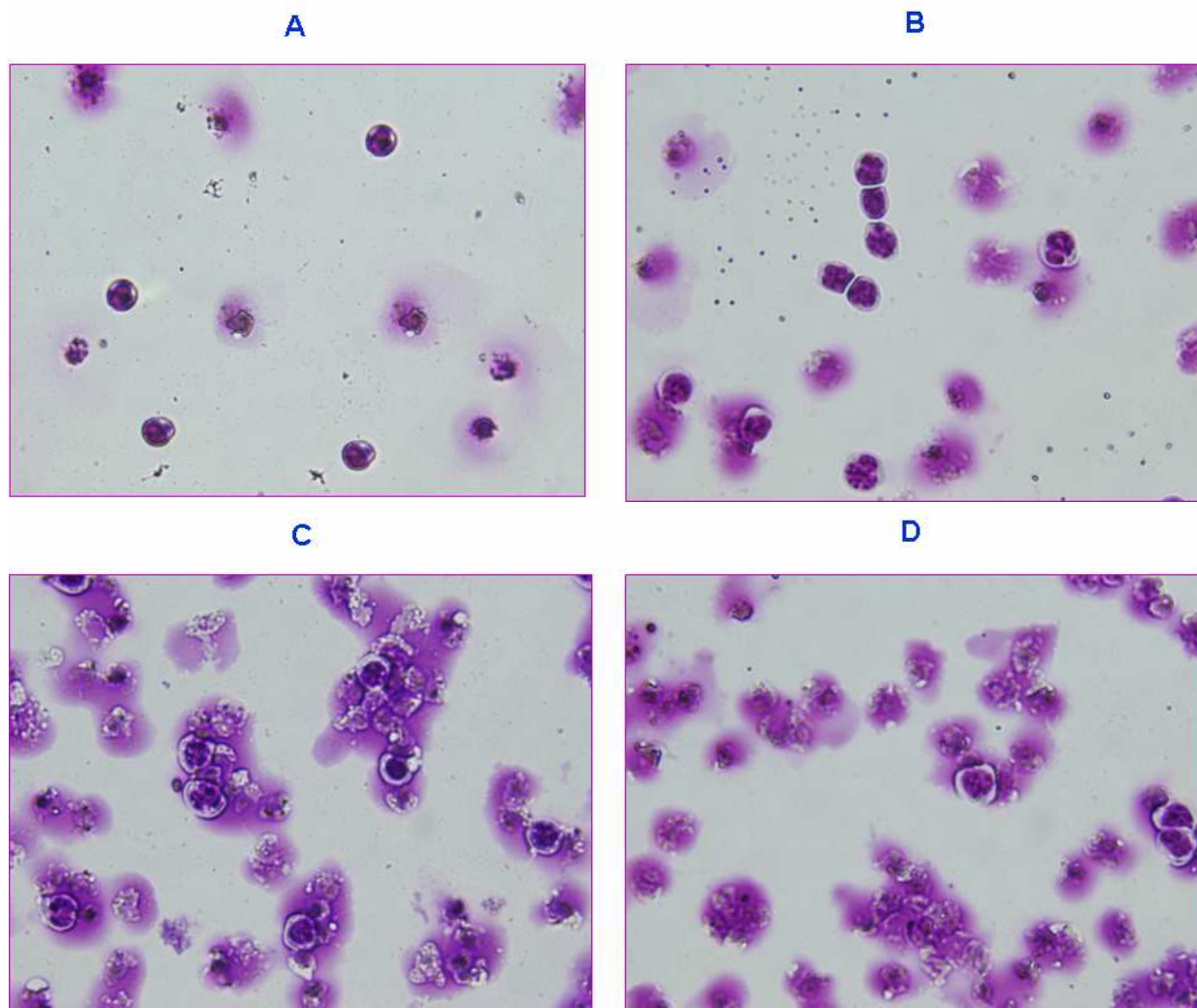
cellules leucémiques CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> étaient comprises entre 63 et 95% (moyenne :  $78.2 \pm 4.7$ ). De plus, les proportions de cellules T et B normales persistantes étaient respectivement comprises entre 1.2 et 20.8% (moyenne :  $6.6 \pm 2.7$ ) et 0 et 8% (moyenne :  $2.9 \pm 1.3$ ). Aucune expression de CD38 n'a été relevée et moins de 5% des cellules des suspensions cellulaires étudiées exprimaient CD14 (moyenne :  $1.9 \pm 0.7$ ).

### III.2.1 - Etude morphologique

L'examen des cellules stimulées pendant 48 heures avec 2 µg/mL d'imiquimod R837 a mis en évidence des cellules plus grosses que les cellules contrôles avec quelques petites cellules rondes et quasiment la moitié d'ombres de Gümprécht (figures 46A et 46B).

Après culture pendant 48 heures avec 5 µg/mL d'imiquimod R837, la quasi-totalité des cellules apparaissaient agrégées en amas volumineux, les noyaux apparaissaient fréquemment fragmentés et les cellules étaient de plus petite taille. Ces caractéristiques morphologiques sont fortement indicatrices de phénomènes d'apoptose (figure 46C).

Après stimulation avec 10 et 20 µg/mL d'imiquimod R837, les cyto centrifugats des suspensions cellulaires des cellules colorés au May Grünwald Giemsa ne mettaient en évidence que des ombres de Gümprécht (figure 46D).



**Figure 46** : Morphologie des cellules tumorales de LLC après stimulation ou non avec l'imiquimod R837

Morphologie des cellules de LLC-B après 48 heures de culture sans stimulation (A), après 48 heures avec 2 µg/mL d'imiquimod R837 (C), avec 5 µg/mL d'imiquimod R837 (D), ou avec 10 µg/mL d'imiquimod R837 (D).

### III.2.2 - Etude immunophénotypique

Les marqueurs HLA-DR, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86, CD38, CD138, CD13, CD14 et CD33 ont été étudiés par cytométrie de flux comme pour les cellules B d'amygdales palatines.

Aucune expression de CD38, CD138, CD13, CD14 et CD33 n'a été relevée dans les suspensions cellulaires stimulées ou non.

Les résultats présentés sur la figure 47 montrent que l'imiquimod R837 induit une



augmentation significative de 1.7 fois de l'expression de HLA-DR dès le premier jour de culture après stimulation avec 2 et 5 µg/mL. Par contre, aucune activation de ce marqueur n'est observée après stimulation avec 10 et 20 µg/mL d'imiquimod. A J2, les cellules présentent une surexpression significative de 2.5 fois de HLA-DR après stimulation avec 2 µg/mL d'imiquimod par rapport au contrôle sans stimulation et de 4.3 et 4.9 fois après stimulation avec 5 et 10 µg/mL. Un effet dose est visible après 3 jours de culture avec une surexpression significative de 2.6 fois pour 2 et 5 µg/mL d'imiquimod. L'absence d'activation de HLA-DR persiste après 48 et 72 heures de stimulation pour les cellules stimulées avec 20 µg/mL qui est la dose la plus importante que nous avons testée.

Après 24 heures, la stimulation des cellules B tumorales via TLR-7 induit également une légère augmentation de CD40 après stimulation avec 2, 5 et 10 µg/mL d'imiquimod avec une expression qui est jusqu'à 1.5 fois significativement plus importante après stimulation avec 5 µg/mL. De la même façon, CD40 est légèrement surexprimé à J2 dans un rapport de presque 2 fois pour les cellules stimulées avec 10 µg/mL. A J3, les résultats mettent en évidence un effet dose avec une surexpression respectivement de 2.6 fois, 1.9 et 1.3 fois pour les cellules stimulées avec 2, 5 et 10 µg/mL d'imiquimod. La stimulation des cellules avec 20 µg/mL d'imiquimod n'induit aucune variation de l'expression de ce marqueur.

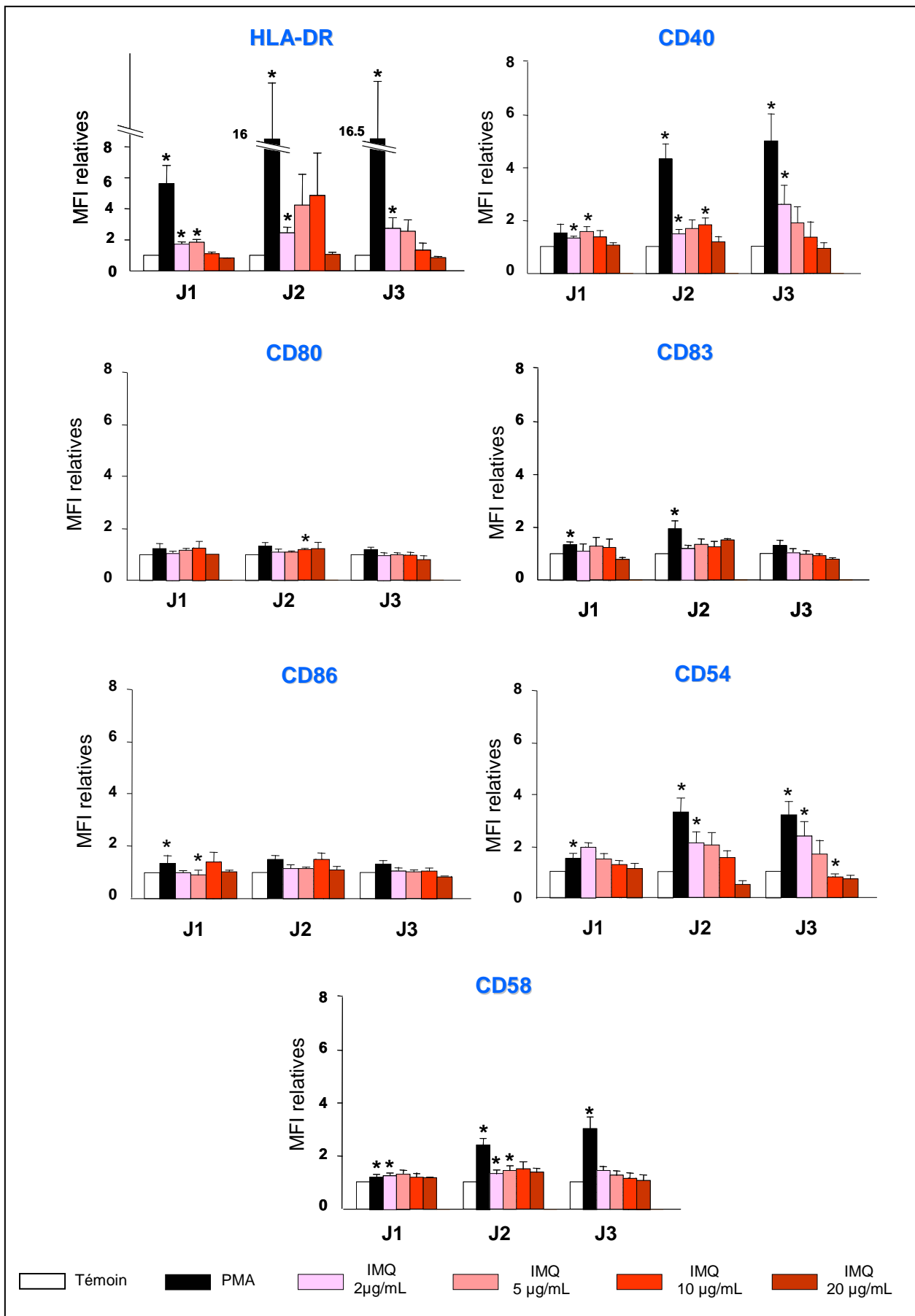
De même, nous avons mis en évidence une activation de CD54 avec un effet dose visible dès J1 avec une expression jusqu'à 2 fois plus importante après stimulation avec 2 µg/mL et jusqu'à 1.3 après stimulation avec 10 µg/mL. Après 48 heures de culture, la stimulation des cellules B de LLC avec 2 et 5 µg/mL induit une surexpression de 2 fois de CD54 et pour les cellules stimulées avec 10 µg/mL une surexpression de 1.6 fois. Seules les doses 2 et 5 µg/mL d'imiquimod entraînent respectivement une augmentation de l'expression dans un rapport de 2.3 fois et 1.5 fois. La plus forte dose testée qui est 20 µg/mL n'influence pas l'expression de CD54.

Une légère stimulation de CD58 est observée à J2 uniquement avec une augmentation de son expression atteignant 1.5 fois.

Aucune variation n'a été observée pour les autres marqueurs.

La figure 40 illustre les résultats obtenus par cytométrie pour les cellules stimulées avec l'imiquimod R837 et le PMA.

L'imiquimod R837 est donc capable d'induire une surexpression de HLA-DR et à un degré moindre de CD40 et CD54 au niveau des cellules B tumorales de LLC.



**Figure 47** : Expression des molécules de présentation et de costimulation au niveau des cellules B de LLC-B stimulées avec l'imiquimod R837

Les cellules de LLC-B ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837 ou avec 5 µg/L de PMA. L'expression de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD54 et CD58 a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI de chacun des marqueurs par rapport à leur expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus témoin.

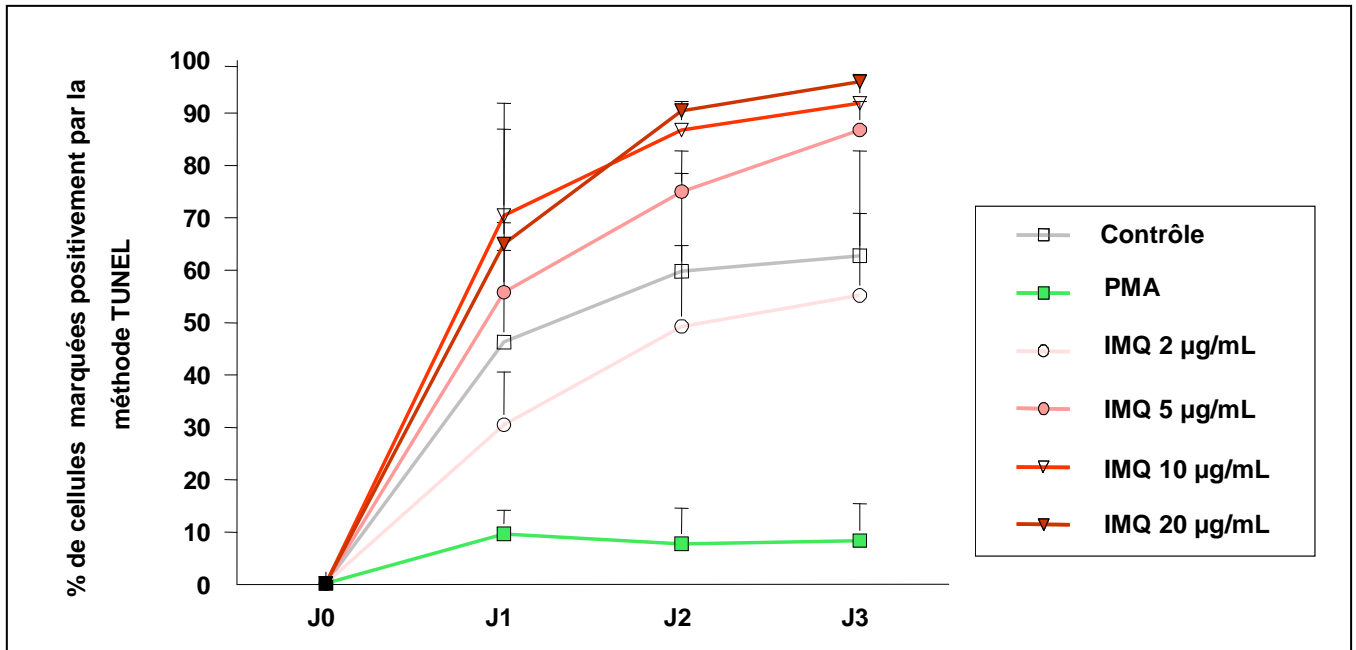
### III.2.3 - Etude de l'apoptose

L'apoptose des cellules B de LLC-B a été étudiée par la méthode TUNEL.

Les résultats présentés sur la figure 48 montrent que la stimulation avec 5 µg/L de PMA induit des taux d'apoptose significatifs de 10% dès le premier jour de culture et jusqu'à J3; alors que les cellules des puits contrôles non stimulés présentent des taux d'apoptose respectivement de 46, 60 et 63% à J1, J2, et J3.

De la même façon, la stimulation avec 2 µg/mL d'imiquimod R837, qui correspond à la dose la plus faible testée, protège les cellules de l'apoptose spontanée observée dans le cas de cellules non stimulées. Cette stimulation induit en effet une apoptose moins importante que celle observée dans les puits contrôles non stimulés avec des différences respectivement de 15%, 10% et 8% après 1, 2 et 3 jours de culture.

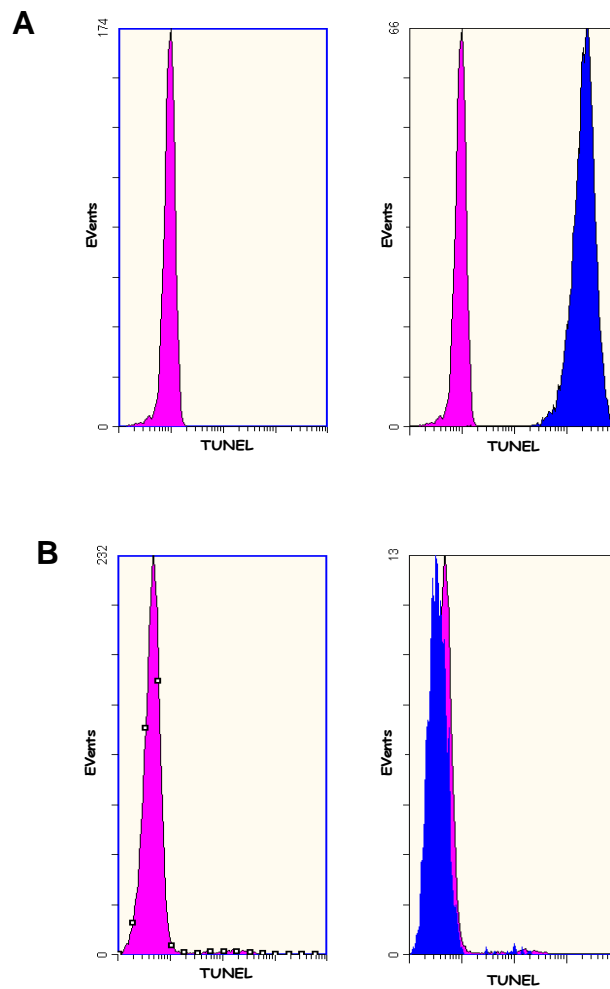
En revanche, une induction rapide et importante de l'apoptose a été mise en évidence pour les 3 doses les plus élevées d'imiquimod R837. Ainsi, la stimulation avec 5 µg/mL d'imiquimod induit des taux d'apoptose plus importants que pour les cellules non stimulées avec des différences de 10, 15 et 24% à J1, J2 et J3. La stimulation avec 10 et 20 µg/mL d'imiquimod entraîne une apoptose plus importante avec 70% de cellules apoptotiques à J1 et 95% à J3.



**Figure 48** : Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les cellules B de LLC-B stimulées ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837

Les cellules B de LLC-B stimulées ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837 ou avec 5 µg/L de PMA ont été marquées par la méthode TUNEL et analysées par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) de pourcentages de cellules TUNEL positives.

Pour trois suspensions cellulaires marquées par la méthode TUNEL, un marquage avec un anticorps anti-CD19-ECD spécifique des cellules B, et parallèlement avec un anticorps anti-CD3-ECD, spécifique des cellules T, nous a permis de vérifier que les cellules en apoptose correspondaient aux cellules B. Nous avons ainsi confirmé que 100% des cellules en apoptose étaient des cellules B (figure 49A) alors qu'aucune positivité TUNEL n'était notée pour les cellules T (figure 49B).



**Figure 49** : Comparaison de l'apoptose évaluée par la méthode TUNEL au niveau des lymphocytes B et des lymphocytes T

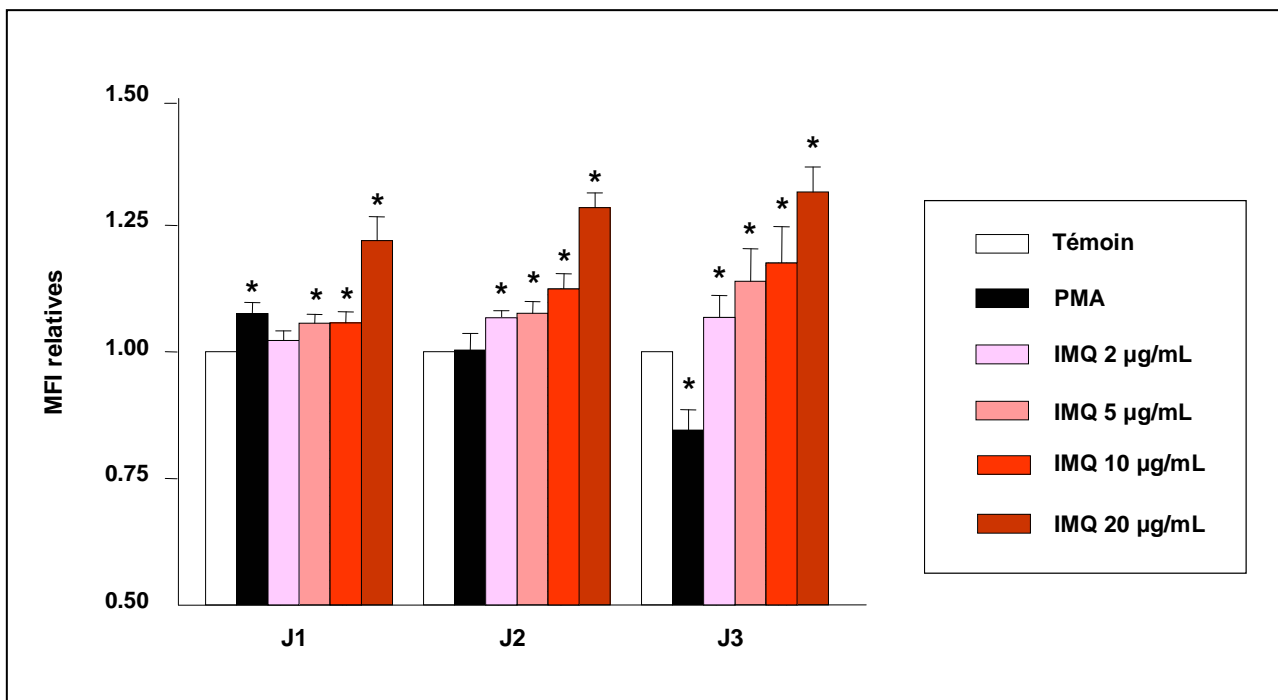
Les lymphocytes des suspensions cellulaires issues des patients atteints de LLC-B ont été incubés avec un anticorps CD19-ECD (**A**) ou avec un anticorps CD3-ECD (**B**) avant d'être marqués par la méthode TUNEL. Le contrôle négatif est représenté en rose et les cellules doublement marquées pour l'antigène membranaire et la fluorescence nucléaire TUNEL sont représentées en bleu.

### III.2.4 - Etude de la prolifération

L'étude de la prolifération des cellules a été réalisée après marquage au CFSE au niveau de suspensions cellulaires issues de 7 patients atteints de LLC-B.

La baisse d'intensité de fluorescence du CFSE, après normalisation par rapport aux témoins, était significativement plus importante après 3 jours de stimulation avec le PMA, traduisant une prolifération des cellules de LLC-B avec cet ester de phorbol.

Les ratios de MFI du CFSE normalisés après stimulation avec l'imiquimod R837 étaient plus importants que pour les témoins, surtout à J3. Ces résultats peuvent être expliqués par l'apoptose importante qui a été observée pour ces cellules, surtout pour les plus fortes concentrations testées (figure 50).



**Figure 50** : Etude de la prolifération des cellules B tumorales stimulées ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837

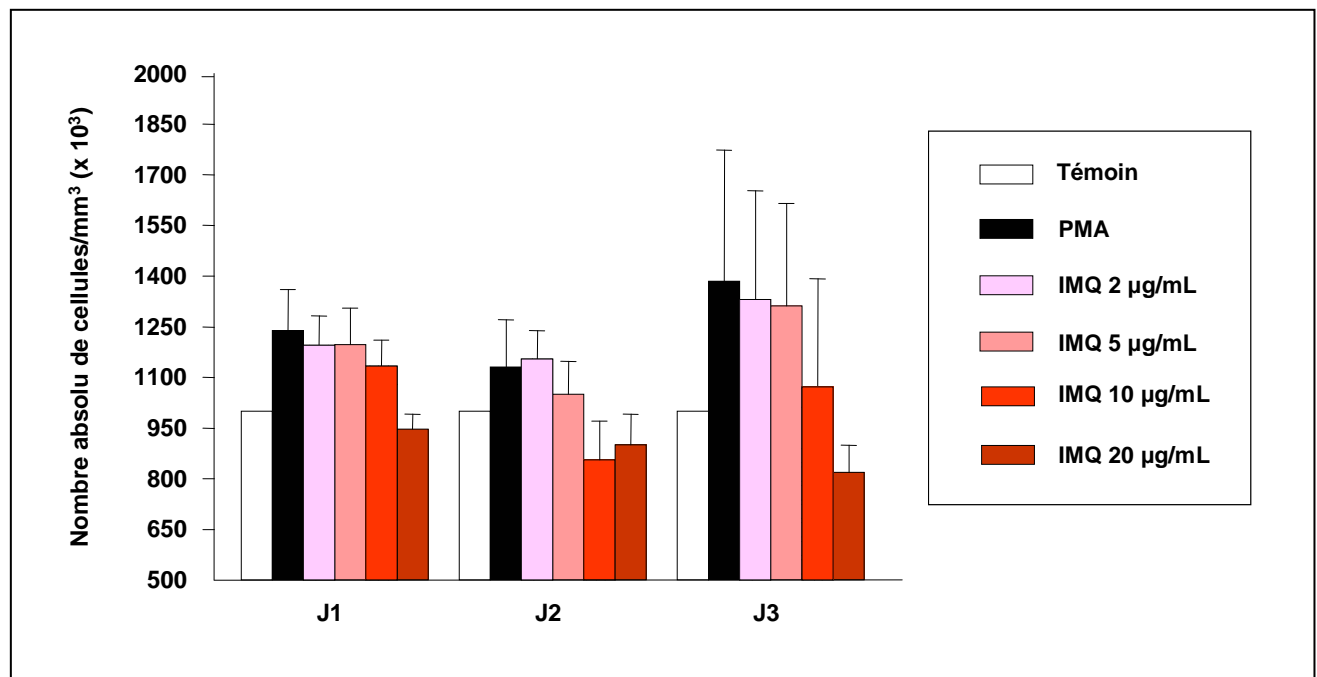
Les cellules de LLC-B marquées par le CFSE ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL d'imiquimod R837 ou avec 5 µg/L de PMA. La fluorescence du CFSE a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en ratios des moyennes de MFI du CFSE ( $\pm$  ES) par rapport à son expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus témoin.

Ces résultats concernant l'étude de l'apoptose et la prolifération des cellules B tumorales étaient concordants avec l'analyse du nombre absolu de cellules mesuré avec des fluorosphères par cytométrie de flux. Nous avons en effet montré une diminution dose-

dépendante du nombre absolu des cellules présentes dans les puits en présence d'imiquimod R837. L'effet le plus important a été observé après 3 jours de culture avec 10 et 20  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod R837 (figure 50).

L'examen du nombre absolu de cellules/ $\text{mm}^3$  présentes dans les puits a également montré une faible prolifération des cellules B stimulées avec l'imiquimod R837 surtout visible à J1 pour les concentrations de 2  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$  et 10  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod R837. Une légère prolifération a également été notée pour la plus faible dose d'imiquimod testée, à J2, et pour 2  $\mu\text{g/mL}$  et 5  $\mu\text{g/mL}$  à J3. Ces résultats mis en parallèle avec l'étude de la prolifération et de l'apoptose indiquent que l'apoptose l'emporte sur la prolifération observée après marquage des cellules par le CFSE. En présence de PMA, une légère augmentation du nombre de cellules a été observée dès J1, surtout visible à J3, confirmant la prolifération identifiée par la diminution du marquage CFSE (figure 51).



**Figure 51** : Etude du nombre absolu de cellules tumorales présentes dans les puits de culture après stimulation ou non avec du PMA ou avec l'imiquimod R837

Les cellules de LLC-B ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 2  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod R837 ou avec 5  $\mu\text{g/L}$  de PMA. Pour chaque échantillon, le nombre absolu de cellules a été déterminé en ajoutant 50  $\mu\text{L}$  de fluorosphères à 50  $\mu\text{L}$  de chaque suspension.

cellulaire stimulée ou non.

La comparaison des résultats obtenus pour les cellules amygdaliennes et les cellules de LLC-B stimulées via TLR-7 révèle une surexpression des marqueurs de costimulation et de coactivation de même ordre de grandeur. Par contre, alors que l'apoptose spontanée des cellules tumorales et des cellules saines est quasiment similaire, des résultats différents sont obtenus, au niveau de ces cellules, après stimulation avec l'imiquimod. En effet, les plus fortes concentrations d'imiquimod entraînent une apoptose rapide et importante des cellules tumorales alors que seule la stimulation avec 20 µg/mL d'imiquimod induit un effet pro-apoptotique tardif des cellules B saines.

## **IV - EFFET DE LA STIMULATION DES CELLULES B SAINES ET TUMORALES VIA TLR-9**

### **IV.1 - Stimulation des cellules B amygdaliennes via TLR-9**

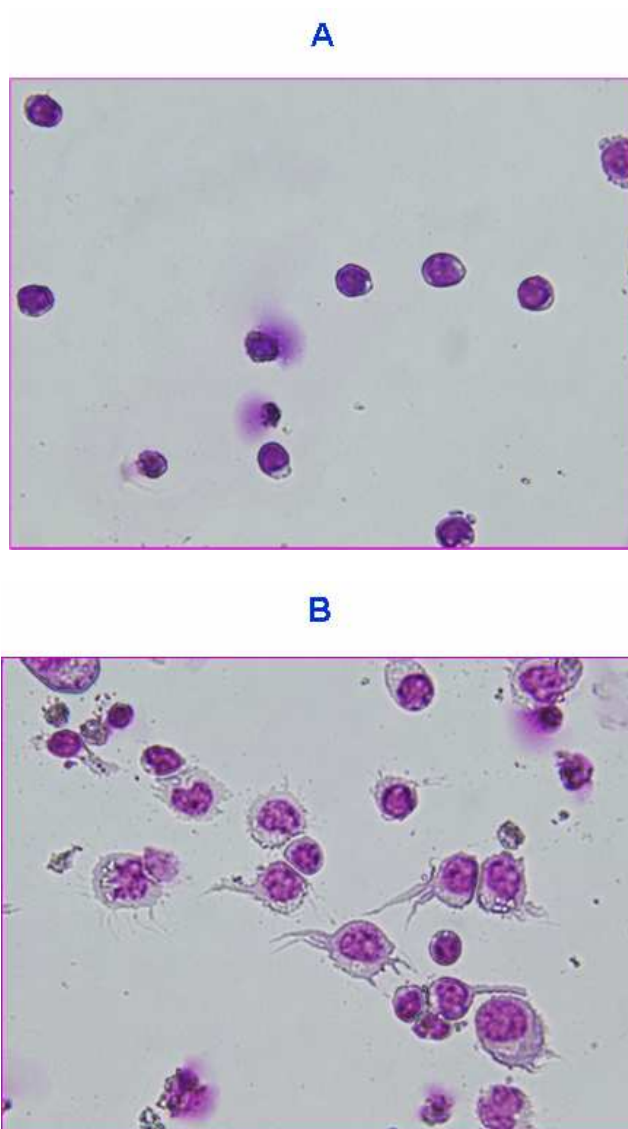
L'étude de la stimulation des cellules B saines a été réalisée au niveau de suspensions cellulaires de 10 amygdales palatines d'enfants âgés de 3 à 10 ans (moyenne d'âge de  $6.2 \pm 0.8$  ans exprimant en moyenne 66.8% ( $\pm 2.4$ ) de cellules CD19+, 6.5% ( $\pm 2.2$ ) de cellules CD19+/CD5+ et 22.8 % ( $\pm 2$ ) de lymphocytes T.

Des oligonucléotides synthétiques contenant des motifs CpG non méthylés ont été utilisés comme ligands de TLR-9, à trois concentrations, 0.25 µM, 0.5 µM et 1 µM, sur 3 jours. L'effet de la stimulation avec ces ODN CpG a été comparé avec les résultats obtenus sans stimulation et avec le PMA comme témoin positif.



## IV.1.1 - Etude morphologique

L'examen des cellules B amygdaliennes après stimulation avec toutes les concentrations d'ODN CpG testées montrait, dès le premier jour de culture, de grosses cellules avec un gros noyau et un cytoplasme plus abondant que pour les cellules sans stimulation (figures 52A et 52B). La plupart de ces cellules présentaient des prolongements cytoplasmiques pseudo-dendritiques de taille variable.



**Figure 52** : Morphologie des cellules amygdaliennes après stimulation via TLR-9

Morphologie initiale des cellules d'amygdales palatines après deux jours de culture sans stimulation

(A), ou après deux jours de culture avec 0.5 µg/mL d'ODN CpG (B).

## IV.1.2 - Etude immunophénotypique

Aucune expression de CD38 et CD138 n'a été relevée dans les suspensions cellulaires stimulées ou non. L'absence de CD14 et de CD33 a également été vérifiée dans toutes les suspensions cellulaires.

Les études immunophénotypiques présentées sur la figure 53 ont permis de montrer une surexpression dose-dépendante de HLA-DR à J1 avec une augmentation de 2.2 fois et 1.3 fois après activation avec 0.25 et 0.5 µM d'ODN CpG. Une augmentation plus importante de son expression est observée après 24 heures dans un rapport de 3 fois pour les 3 concentrations d'ODN utilisées. La stimulation avec les ODN CpG induit une surexpression de HLA-DR de façon similaire après 72 heures de culture avec une augmentation respectivement de 3, 2.9 et 3.4 fois après stimulation avec 0.25, 0.5 et 1 µM d'ODN CpG.

Les ODN CpG induisent par ailleurs une surexpression de CD40 de presque 2 fois par rapport aux cellules non stimulées, pour les 3 concentrations d'ODN testées, après 24 heures de culture. A J2, l'activation de ce marqueur est identique après stimulation avec 0.25, 0.5 et 1 µM d'ODN CpG avec une augmentation de son expression de 2.3 fois. La stimulation avec 0.5 µM d'ODN CpG n'entraîne aucune variation de l'expression de CD40 après 72 heures de culture. Par contre, les cellules stimulées avec 0.25 et 0.1 µM d'ODN CpG présentent une expression de CD40 augmentée d'environ 2 fois.

L'augmentation de l'expression de CD54 est quasiment identique à J1, J2 et J3 avec une surexpression maximum de 2 fois après stimulation pendant 48 heures avec 0.1 µM d'ODN CpG par rapport aux cellules amygdaliennes non stimulées.

Une surexpression dose-dépendante de CD58 est visible à J1 avec une augmentation respectivement de 2, 1.4 et 1.3 fois pour les cellules stimulées avec 0.25, 0.5 et 1 µM d'ODN CpG. A J2 et J3, l'activation de CD58 est du même ordre de grandeur avec une augmentation d'environ 2 fois pour les 3 doses testées.

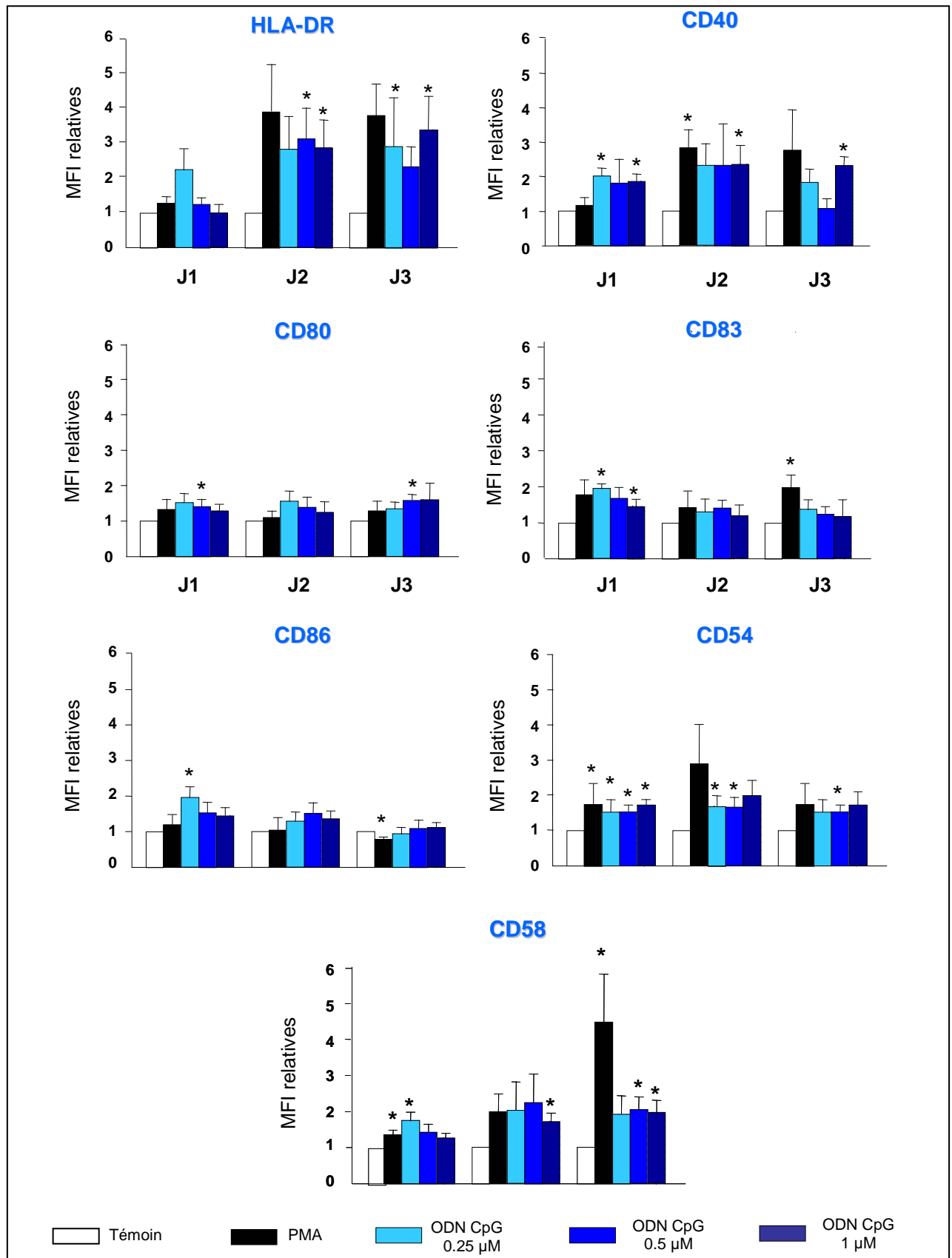
Une légère augmentation dose-dépendante de l'expression de CD80 est mise en évidence à J1 et J2 avec une expression maximum de 1.5 fois obtenue après stimulation avec 0.25 µM d'ODN CpG. A J3, cette expression est augmentée de la même façon respectivement

dans un rapport 1.3, 1.6 et 1.7 pour les cellules stimulées avec 0.25, 0.5 et 1  $\mu$ M d'ODN CpG.

Le marqueur CD86 est surexprimé dans un rapport de 2 fois après stimulation avec 0.25 et 0.5  $\mu$ M d'ODN CpG et de 1.5 fois avec 1  $\mu$ M d'ODN CpG. Son expression est quasiment identique pour les 3 concentrations testées avec une expression jusqu'à 1.5 fois plus importante que pour les cellules contrôles non stimulées. A J3, aucune activation de CD86 n'a été relevée.

Les résultats montrent également une légère activation de CD83 avec un effet dose visible à J1 et J3. Cette activation est plus importante après 24 heures de culture avec une surexpression respectivement de 2, 1.7 et 1.5 fois après stimulation avec 0.25, 0.5 et 1  $\mu$ M d'ODN CpG. A J2 et J3, l'expression de CD83 est augmentée d'environ 1.4 fois.

Les ODN CpG M362 induisent donc une forte surexpression de HLA-DR et de CD40 et une plus faible surexpression des autres marqueurs de costimulation étudiés, au niveau des lymphocytes B sains.



**Figure 53** : Expression des molécules de présentation et de costimulation au niveau des cellules amygdaliennes stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG

Les cellules amygdaliennes ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M d'ODN M362 ou avec 5  $\mu$ g/L de PMA. L'expression de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD54 et CD58 a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI de chacun des marqueurs par rapport à leur expression basale.

\* = P < 0.05 versus témoin.

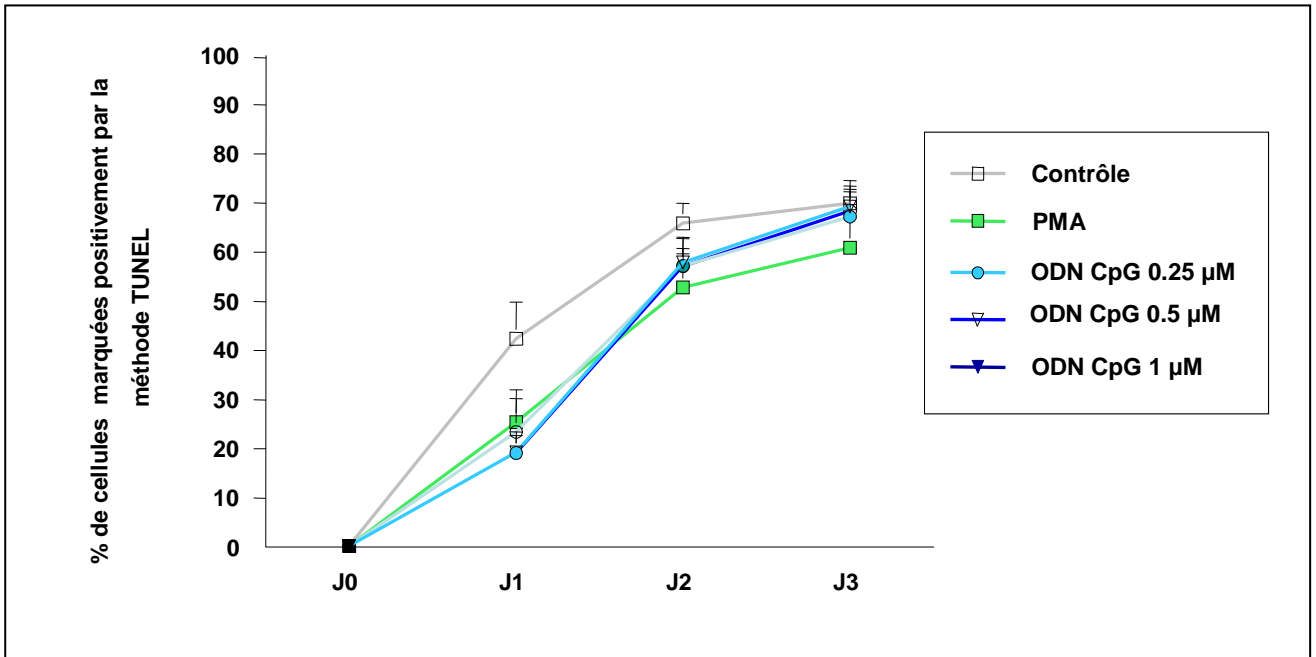
### IV.1.3 - Etude de l'apoptose

L'analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL a été réalisée au niveau de suspensions cellulaires issues de 5 amygdales palatines (moyenne d'âge de  $5 \pm 0.5$  ans).

Les résultats présentés sur la figure 54 indiquent qu'après 24 et 48 heures de culture, les cellules B amygdaliennes stimulées par le PMA présentent un pourcentage de cellules apoptotiques de l'ordre de 20%. Ce pourcentage est significativement moins important que celui relevé pour les cellules non stimulées qui est de 40%. A J3, la stimulation avec 5  $\mu$ g/mL de PMA induit une apoptose moins importante que pour les témoins non stimulés avec une différence de 10%.

Les 3 doses d'ODN CpG testées entraînent des taux d'apoptose similaires après stimulation pendant 24, 48 et 72 heures. A J1, comme pour le PMA, ces ODN semblent protéger les cellules B amygdaliennes de l'apoptose avec une différence de 20% par rapport aux puits contrôles non stimulés. A J2, cette différence n'est plus que de 13% et dès J3, aucune différence n'a été mise en évidence par rapport aux contrôles sans stimulation. Des expériences complémentaires ont montré le pourcentage de cellules apoptotiques étaient de 90% dans les suspensions cellulaires stimulées ou non.

Par contre, dès J2, ce pourcentage augmente de façon significative pour atteindre 60%, se stabiliser à J3 puis augmenter progressivement jusqu'à atteindre 90% à J7.



**Figure 54** : Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les cellules B d'amygdales palatines stimulées ou non avec du PMA ou les ODN CpG M362

Les cellules amygdaliennes stimulées ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 0.25 µM, 0.5 µM, 1 µM d'ODN M362 ou avec 5 µg/L de PMA ont été marquées par la méthode TUNEL et analysées par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) de pourcentages de cellules TUNEL positives.

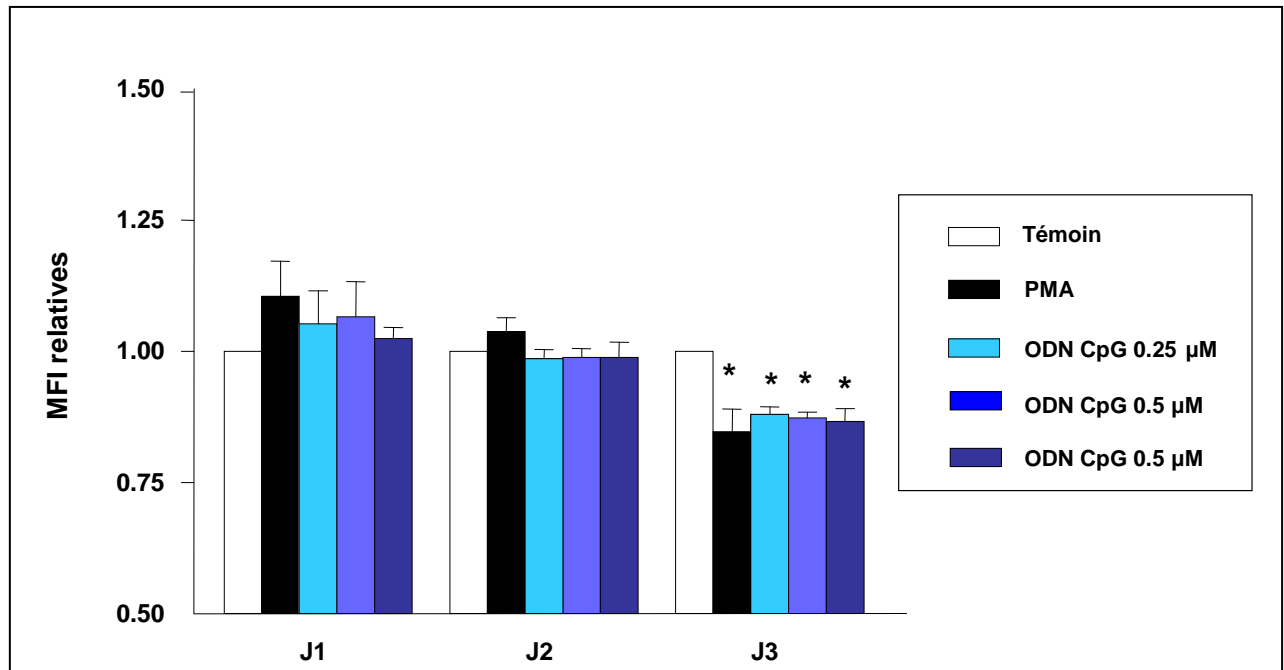
#### IV.1.4 - Etude de la prolifération

Les analyses de la prolifération ont été réalisées après marquage au CFSE au niveau de 8 prélèvements d'amygdales palatines (moyenne d'âge de  $5 \pm 0.1$  ans).

Les résultats obtenus, représentés sur la figure 55, indiquent que le PMA n'induit aucune prolifération des cellules amygdaliennes à J1 et J2. Toutefois, après 3 jours de culture, on peut observer une diminution significative de la MFI du CFSE des cellules d'amygdales palatines stimulées avec le PMA ( $p=0.03$ ), par rapport au témoin sans stimulation, ce qui suggère une prolifération de ces cellules.

De la même façon, les ODN CpG induisent une légère prolifération des cellules

amygdaliennes après 72 heures de culture.



**Figure 55** : Etude de la prolifération des cellules B d'amygdales palatines stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG M362

Les cellules amygdaliennes marquées par le CFSE ont été incubées avec du milieu de culture seul, 0.25 µM, 0.5 µM, 1 µM d'ODN M362 ou avec 5 µg/L de PMA. La fluorescence du CFSE a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI du CFSE par rapport à son expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus témoin.

Pour certains échantillons, la poursuite de la culture jusqu'à J7, a montré que cette prolifération ne variait pas jusqu'à J7, alors que la MFI du CFSE des cellules traitées avec le PMA diminuait de façon progressive et significative.

## IV.2 - Stimulation des cellules B de LLC-B via TLR-9

L'effet de la stimulation des cellules B de LLC-B via TLR-9 a été étudié au niveau de 6 individus avec un score de Matutes de 4 ou 5 par une analyse immunophénotypique. Ces individus étaient âgés de 41 à 72 ans (moyenne d'âge de  $60.5 \pm 5.1$ ).

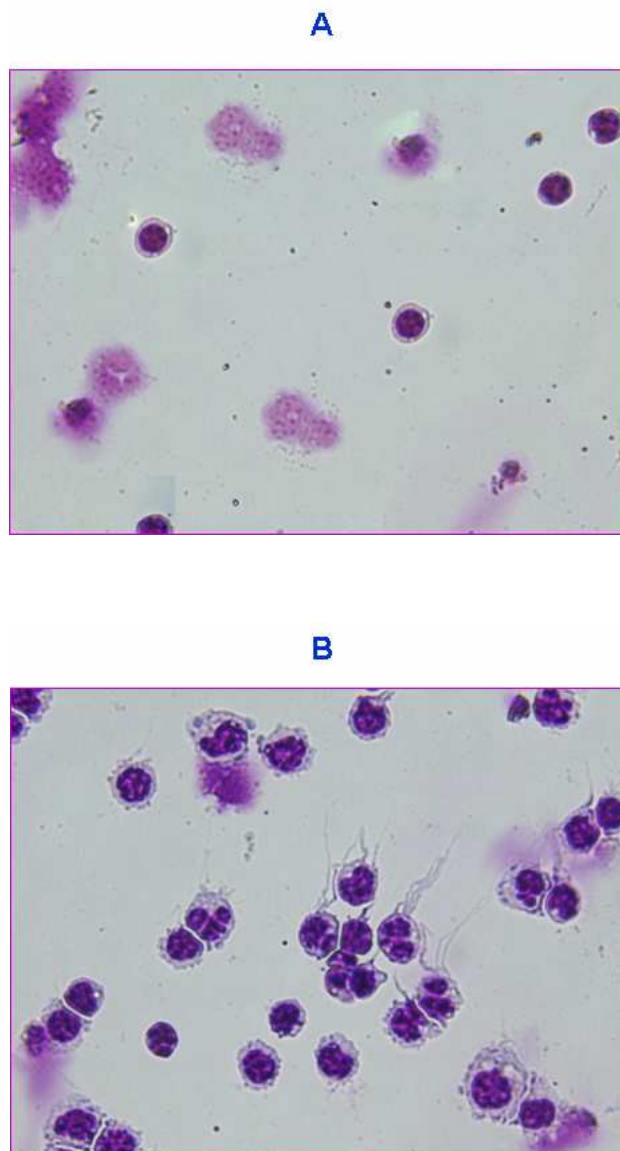
Dans ces échantillons, les proportions de cellules leucémiques CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> étaient comprises entre 70.5 et 98% (moyenne :  $84.5 \pm 4.1$ ). De plus, les proportions de cellules T et B normales persistantes étaient respectivement comprises entre 1.2 et 20.8% (moyenne :  $6.3 \pm 2.9$ ) et 0.5 et 4.5% (moyenne :  $2 \pm 0.5$ ).

Comme précédemment, des ODN CpG ont été utilisés comme ligands de TLR-9, à trois concentrations, 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M et 1  $\mu$ M, sur 3 jours. L'effet de la stimulation avec ces ODN CpG a été comparé avec les résultats obtenus sans stimulation, avec des ODN GpC contrôles et avec le PMA comme témoin positif.

### IV.2.1 - Etude morphologique

Les cellules B de LLC-B stimulées avec les ODN CpG étaient de plus grande taille que les cellules non stimulées, avec un gros noyau fragmenté. Certaines de ces cellules présentaient des prolongements cytoplasmiques pseudo-dendritiques de taille variable et d'autres de volumineuses vacuoles (figures 56A et 56B).





**Figure 56** : Morphologie des cellules amygdaliennes après stimulation via TLR-9

Morphologie initiale des cellules de cellules de LLC-B après deux jours de culture sans stimulation (A), ou après deux jours de culture avec 0.5 µg/mL d'ODN CpG (B).

## IV.2.2 - Etude immunophénotypique

Aucune expression de CD38 et CD138 ni de CD13, CD14 et CD33 n'a été notée dans les suspensions cellulaires stimulées ou non.

Les résultats présentés sur la figure 57 indiquent qu'en présence d'ODN GpC, on note une augmentation de l'expression des marqueurs de coactivation et de présentation dont l'expression est respectivement jusqu'à 4 fois plus importante pour HLA-DR. Les ODN contrôles GpC sont donc capables d'induire la stimulation des cellules B de LLC-B.

Dans le cas des cellules stimulées avec les ODN CpG, les résultats mettent en évidence une forte augmentation significative de l'expression de HLA-DR pour 3 doses testées. Un effet dose est visible dès J1 avec une surexpression de 2 fois pour les cellules stimulées avec 0.25 et de 2.6 fois pour les cellules stimulées avec 0.5 et 1  $\mu$ M d'ODN CpG. Après 48 heures de culture, les ODN CpG induisent une plus forte surexpression de HLA-DR respectivement de 3.4, 5.5 et 6 fois après stimulation avec 0.25, 0.5 et 1  $\mu$ M d'ODN CpG. A J3, cette stimulation est du même ordre de grandeur avec une expression jusqu'à 5.5 fois plus importante que les puits contrôles sans stimulation.

Une très forte augmentation de l'expression de CD40 est également observée avec un effet dose visible après 24, 48 et 72 heures. A J1, la stimulation via TLR-9 induit une surexpression de CD40 dans un rapport respectivement de 1.8, 2.7 et 3.3 pour les cellules stimulées avec 0.25, 0.5 et 1  $\mu$ M d'ODN CpG. La surexpression la plus importante de ce marqueur est visible à J2, avec une augmentation de plus de 6 fois après stimulation avec 1  $\mu$ M d'ODN CpG. Après 72 heures de culture, CD40 présente une expression augmentée de 3.2 fois après stimulation avec 0.25  $\mu$ M ODN CpG et de 5 fois avec 1  $\mu$ M d'ODN CpG.

Les ODN CpG entraînent une augmentation significative de l'expression de CD54 avec un effet dose surtout visible après 3 jours de culture. A J1, cette surexpression est de l'ordre de 3 fois pour les 3 doses d'ODN CpG testées. Après 48 heures, l'expression de CD54 est augmentée respectivement de 2.5, 4.7 et 3.7 fois avec 0.25, 0.5 et 1  $\mu$ M par rapport aux puits contrôles non stimulés. Les ODN CpG induisent également une augmentation de l'expression de CD54 comprise entre 3 et 4 fois à J3.

En ce qui concerne CD58, une surexpression dépendante du temps est mise en évidence avec une expression maximum observée à J3. Une augmentation respectivement de

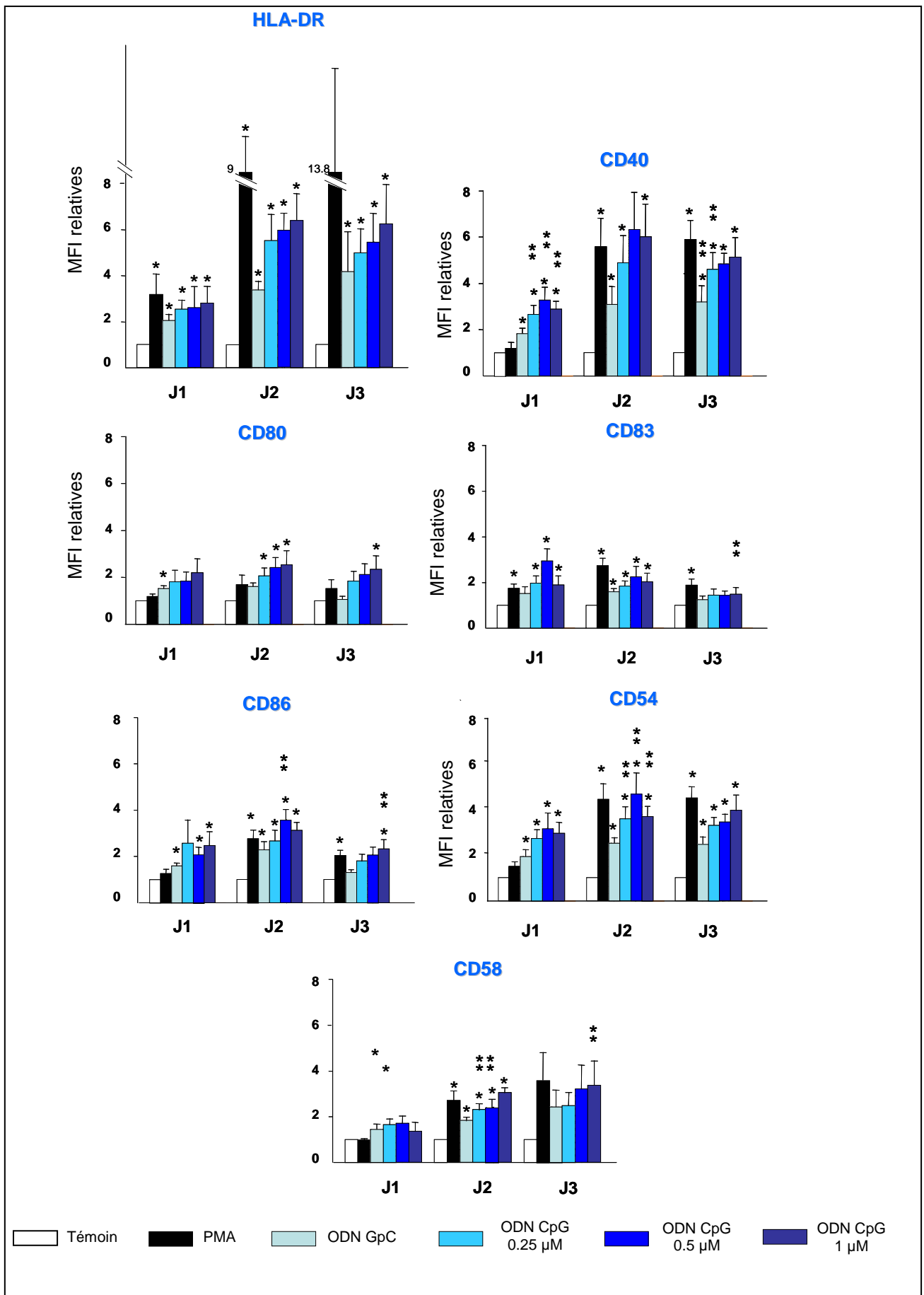
1.6, 1.7 et 1.4 fois est notée pour les cellules stimulées avec 0.25, 0.5 et 1  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG après un jour de culture. Dès J2, les résultats indiquent une surexpression plus importante et dose-dépendante de 2.3 fois pour la stimulation avec 0.25  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG et de 3 fois pour la concentration la plus forte testée, autrement dit 1  $\mu\text{M}$ . De la même manière, à J3, CD58 est surexprimé de façon importante. En effet, la stimulation avec 0.25  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG induit une augmentation de l'expression de CD58 de 2.5 fois et la stimulation avec 0.5  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG entraîne une augmentation de l'ordre de 3.3 fois par rapport aux contrôles non stimulés.

CD80 est surexprimé de façon dose-dépendante à un degré moindre, dans un rapport d'environ 2 fois à J1. Après 48 heures de culture, une augmentation significative respectivement de 2.1, 2.4 et 2.5 est mise en évidence pour les cellules stimulées avec 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG M362. La surexpression de CD58 est du même ordre de grandeur après 3 jours de culture : les cellules stimulées avec 0.25, 0.5 et 1  $\mu\text{M}$  présentent respectivement une augmentation de 1.8, 2.1 et 2.4 fois.

Les résultats montrent également une surexpression du marqueur de surface CD83 qui est maximale à J1. CD83 est en effet surexprimé dans un rapport de 2 fois après stimulation avec 0.25 et 1  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG et dans un rapport de 3 fois après stimulation avec 0.5  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG. Après 48 heures, l'augmentation de CD83 est de l'ordre de 2 fois avec une surexpression maximale pour les cellules de LLC-B stimulées avec 1.5  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG. L'engagement de TLR-9 induit, à J3, une plus faible augmentation de l'expression de ce marqueur qui est d'environ 1.5 fois.

Une forte surexpression de CD86 est observée après stimulation avec les ODN CpG. CD86 est augmenté dans un rapport de 2.6 fois pour les cellules stimulées avec 0.25 et 1  $\mu\text{M}$  d'ODN et dans un rapport de 2.1 pour les cellules stimulées avec 0.5  $\mu\text{M}$ . Les cellules stimulées présentent la plus forte surexpression de CD86 après 2 jours de culture : l'augmentation de CD86 est dose-dépendante avec une augmentation respectivement de 2.7, 3.6 et 3.1 pour les cellules stimulées avec 0.25, 0.5 et 1  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG. A J3, l'expression de ce marqueur est augmentée respectivement de 1.8, 2.1 et 2.3 fois pour les cellules stimulées avec 0.25, 0.5 et 1  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG.

Ces résultats indiquent donc que les cellules de LLC-B stimulées avec des ODN CpG présentent une surexpression des marqueurs de coactivation et de costimulation étudiés.



**Figure 57** : Expression des molécules de présentation et de costimulation sur des cellules B de LLC-B stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG et GpC M362

Les cellules de LLC-B ont été incubées avec du milieu de culture seul, avec 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  d'ODN M362, 1  $\mu\text{M}$  d'ODN M362 contrôle ou avec 5  $\mu\text{g/L}$  de PMA. L'expression de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD54 et CD58 a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI de chacun des marqueurs par rapport à leur expression basale.

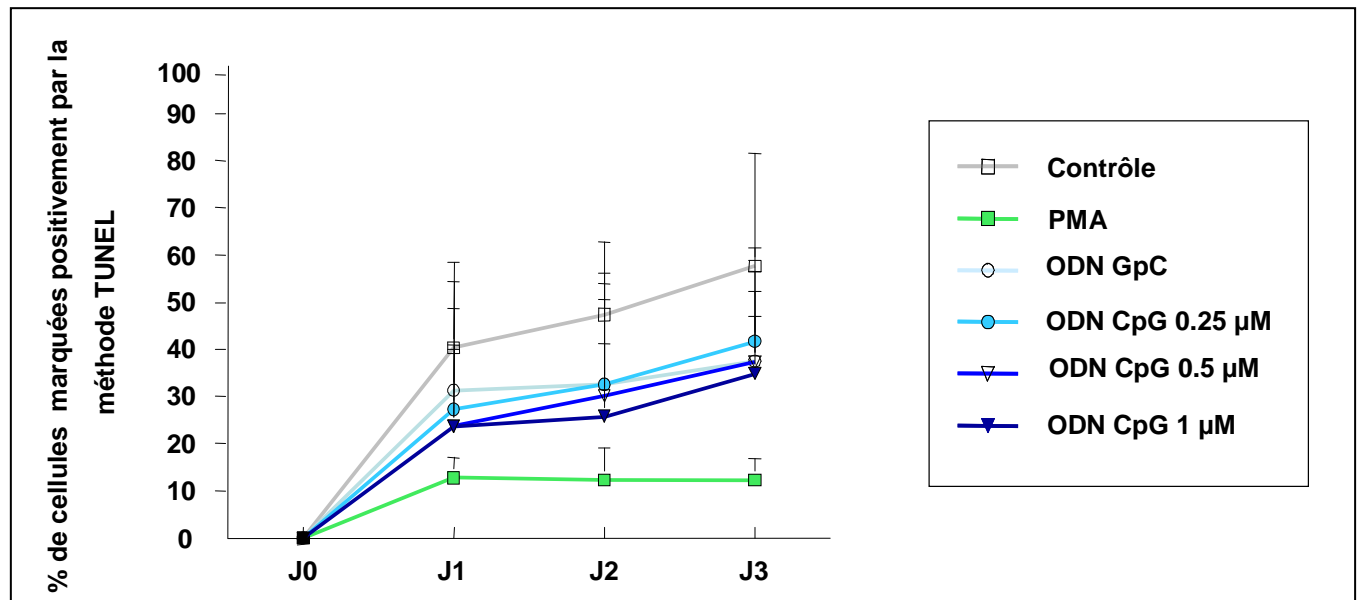
\* =  $P < 0.05$  versus témoin ; \*\* =  $P < 0.05$  versus ODN GpC contrôles.

### IV.2.3 - Etude de l'apoptose

Il est apparu qu'une stimulation avec 5  $\mu\text{g/L}$  de PMA induisait jusqu'à 12% d'apoptose à J3 alors que les cellules seules, sans stimulation, présentaient un taux d'apoptose de 58%.

De même, pour les cellules stimulées avec les ODN CpG et GpC, les taux d'apoptose observés étaient inférieurs à ceux des cellules non stimulées dès J1, et ce, quelque soit la concentration testée. En effet, alors que 58% des cellules témoins les cellules seules étaient apoptotiques, ce pourcentage s'élevait à 40% pour toutes les concentrations testées.

Les différentes concentrations d'ODN CpG et le PMA protégeaient donc les cellules B de LLC-B de l'apoptose spontanée observée avec le milieu de culture seul dès J1 (figure 58).

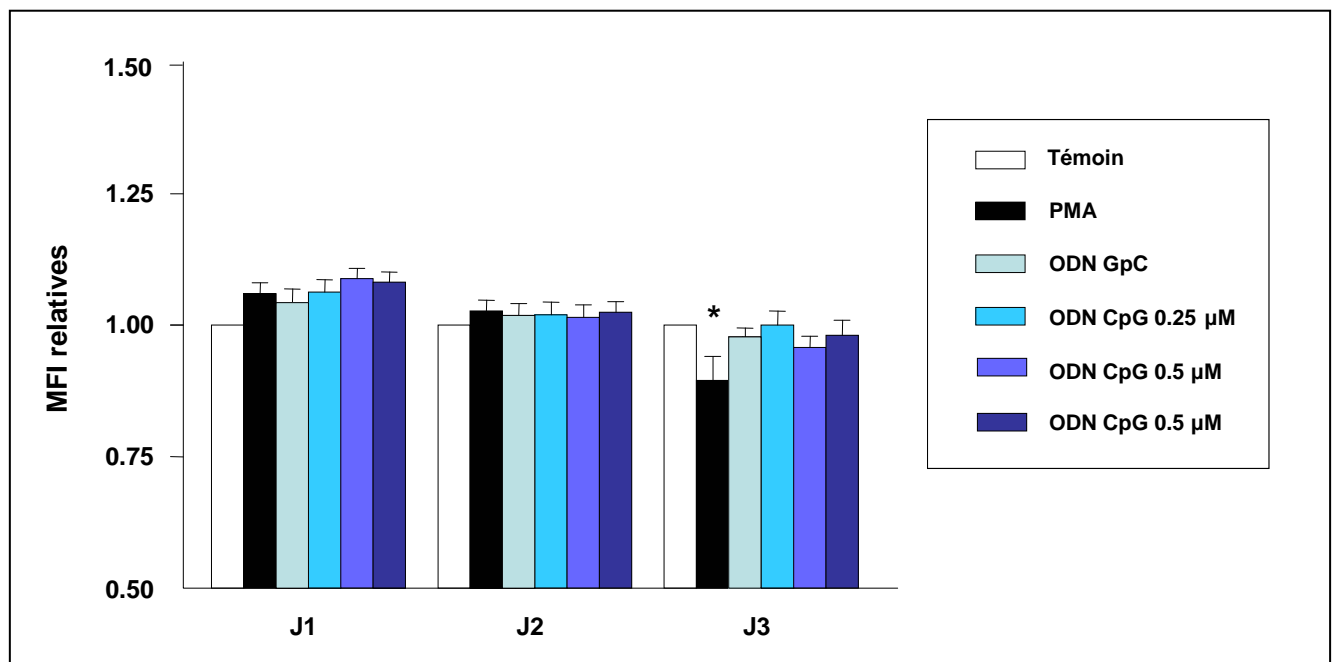


**Figure 58** : Analyse de l'apoptose par la méthode TUNEL dans les cellules B tumorales stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG et GpC M362

Les cellules B de LLC-B stimulées ou non pendant 24, 48, et 72 heures avec 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M d'ODN M362, 1  $\mu$ M d'ODN M362 contrôle ou avec 5  $\mu$ g/L de PMA ont été marquées par la méthode TUNEL et analysées par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en moyennes de pourcentages de cellules TUNEL positives ( $\pm$  ES).

#### IV.2.4 - Etude de la prolifération

L'analyse de la prolifération après marquage des cellules par le CFSE (figure 59) montre l'absence totale de prolifération en présence d'ODN CpG, de J1 à J3. Par contre, on retrouve avec le PMA la prolifération cellulaire observée dans les séries précédentes, avec une diminution significative ( $P=0.04$ ) de la fluorescence liée à l'incorporation du CFSE.

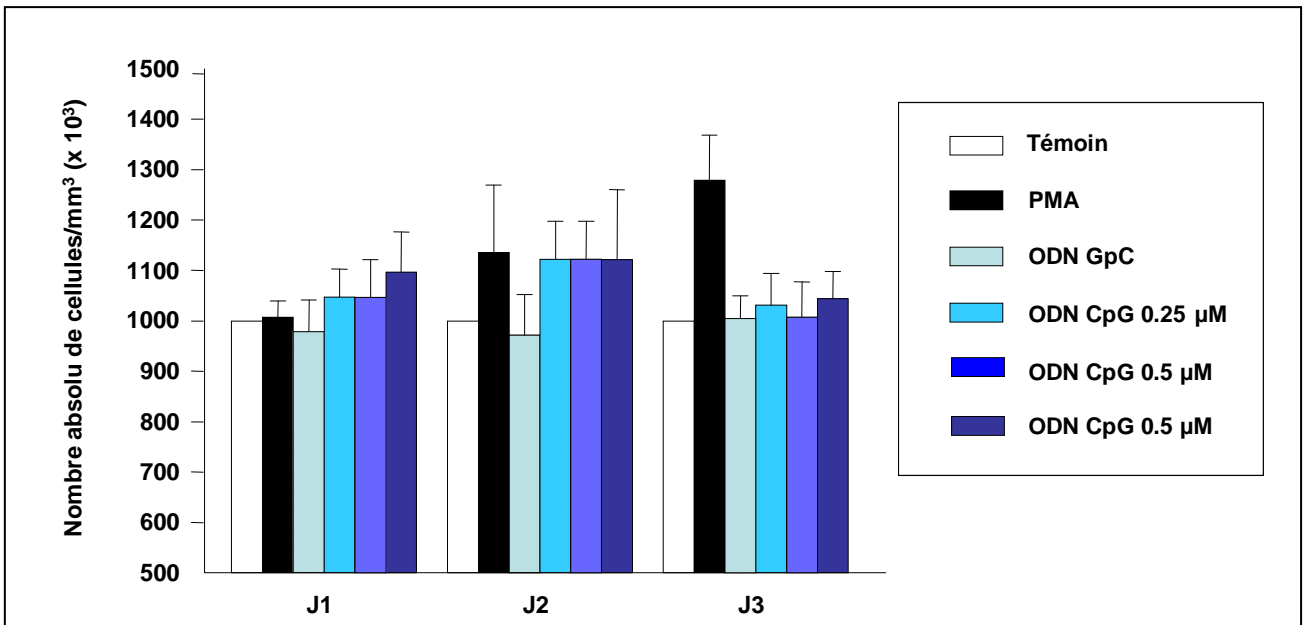


**Figure 59** : Etude de la prolifération des cellules B de LLC-B stimulées ou non avec du PMA ou avec les ODN CpG M362

Les cellules de LLC-B marquées par le CFSE ont été incubées avec du milieu de culture seul, 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M d'ODN M362, 1  $\mu$ M d'ODN M362 contrôle ou avec 5  $\mu$ g/L de PMA. La fluorescence du CFSE a été mesurée par cytométrie de flux à J1, J2 et J3. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de MFI du CFSE par rapport à son expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus témoin.

L'étude du nombre absolu de cellules présentes dans les puits de culture a confirmé ces résultats puisque aucune différence significative entre les cellules stimulées par les ODN CpG ou non n'a été observée (figure 60).



**Figure 60** : Analyse du nombre absolu de cellules présentes dans les puits après stimulation des cellules B tumorales via TLR-9

Les cellules de LLC-B marquées par le CFSE ont été incubées avec du milieu de culture seul, 0.25 µM, 0.5 µM, 1 µM d'ODN M362, 1 µM d'ODN M362 contrôle ou avec 5 µg/L de PMA. Pour chaque échantillon, le nombre absolu de cellules a été déterminé en ajoutant 50 µL de fluorosphères à 50 µL de chaque suspension cellulaire stimulée ou non.

\* =  $P < 0.05$  versus témoin.

Toutefois, pour certains échantillons, la poursuite de la culture jusqu'à J7, a permis de mettre en évidence une diminution du ratio de la fluorescence du CFSE traduisant une prolifération tardive, qui augmente progressivement jusqu'à J7.

La stimulation de TLR-9 via les ODN CpG induit, au niveau des cellules B tumorales, une augmentation de la survie cellulaire et de l'expression des marqueurs étudiés plus importantes que pour les cellules B saines.

## **V - EVALUATION DE LA SECRETION DE CYTOKINES**

Suite aux résultats obtenus qui ont mis en évidence une activation des cellules de LLC-B en présence d'ODN CpG et avec la plus faible dose d'imiquimod testée, nous avons choisi d'étudier la sécrétion de cytokines au niveau des surnageants de culture de ces suspensions cellulaires afin de caractériser l'influence de ces ligands de TLRs sur la production cytokinique des cellules B de LLC-B. Nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus en testant des surnageants de cellules B tumorales stimulées avec le PMA et des surnageants de culture d'amygdales palatines stimulées ou non. Les dosages ont été réalisés dans les surnageants de cellules B non stimulées ou incubées avec 0.5  $\mu$ M d'ODN CpG M362, 2  $\mu$ g/mL d'imiquimod R837 ou 5  $\mu$ g/L de PMA pendant 48 heures.

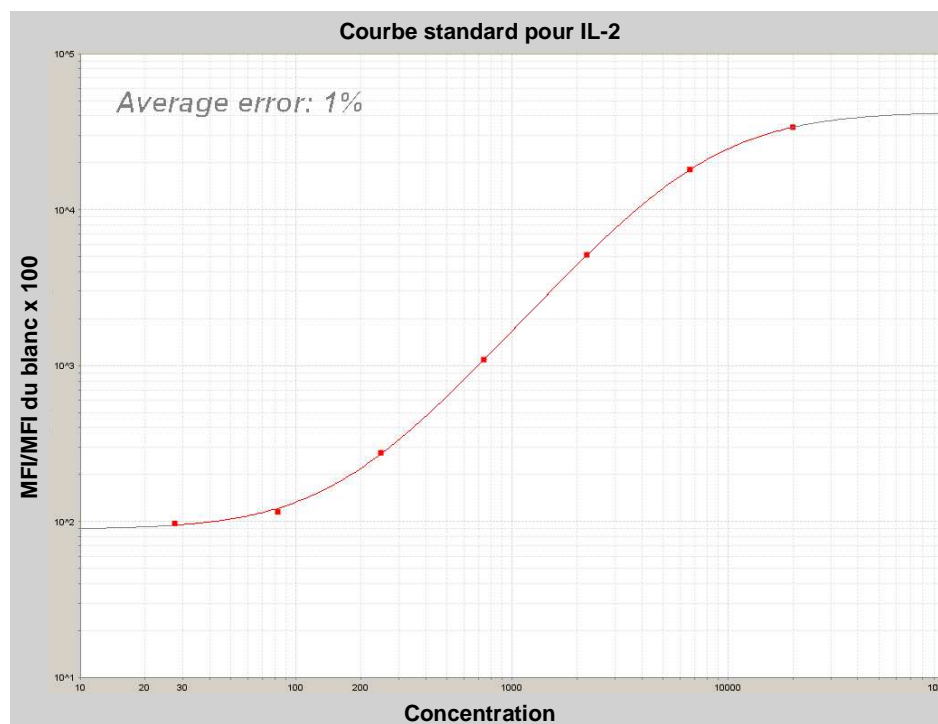
Le panel des cytokines dosées concomitamment avec la technique de billes CBA a permis l'évaluation quantitative des cytokines suivantes : IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$ .

Une gamme étalon a été réalisée pour chaque cytokine étudiée à partir de 50  $\mu$ L de chaque standard. Le tableau 10 et la figure 61 présentent un exemple de courbe de titration obtenue.



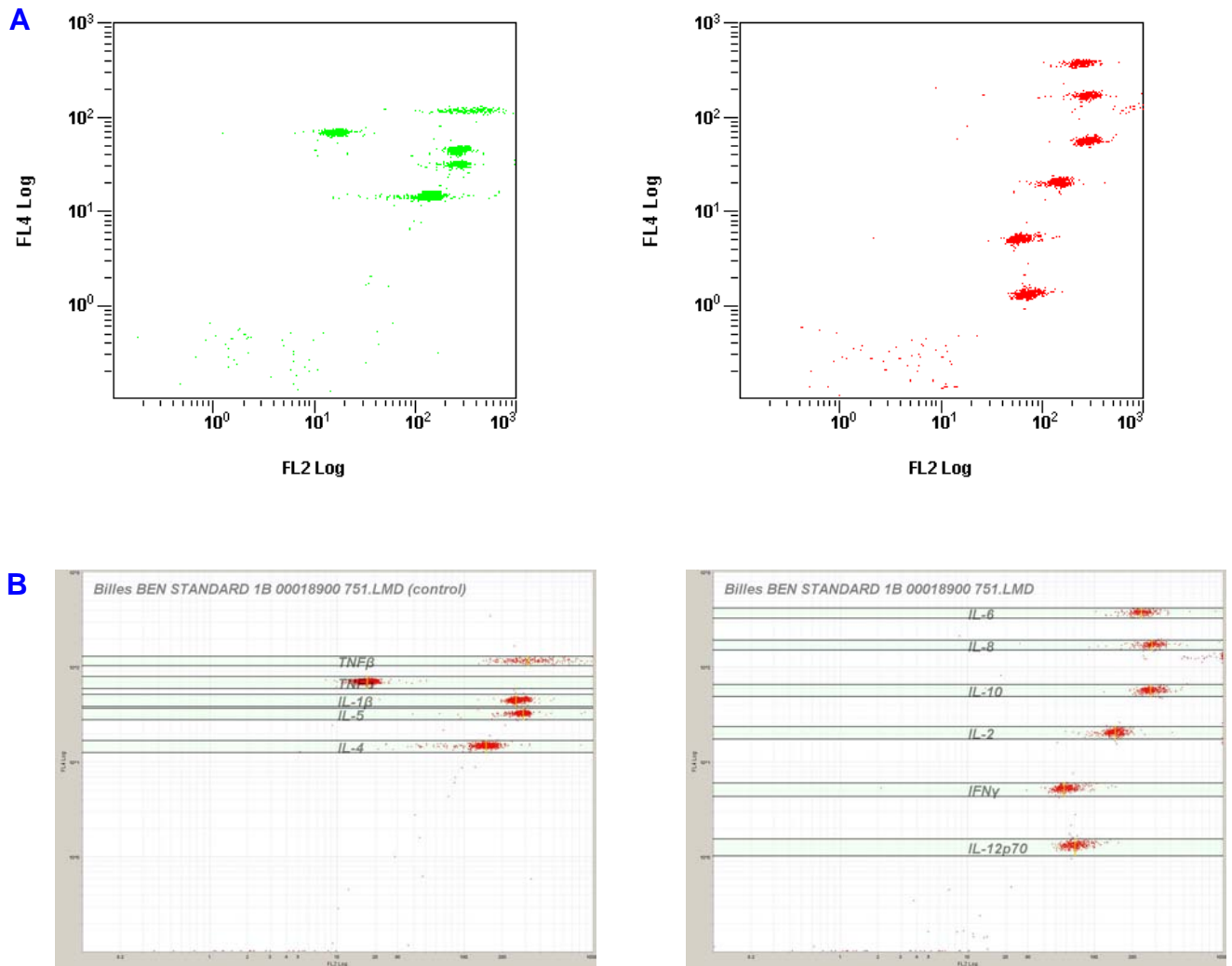
**Tableau 10** Exemple de courbe étalon obtenue pour l'interleukine-2

Concentration standard en pg/ml	MFI	MFI/MFI du blanc x 100
0.00	0.64	100.00
27.44	0.62	97.34
82.30	0.74	115.48
246.91	1.77	276.32
740.74	7.02	1 094.11
2 222.22	32.97	5 139.70
6 666.67	116.14	18 105.58
20 000.00	217.01	33 829.9



**Figure 61** : Exemple de gamme standard de dilution obtenue pour l'interleukine-2

Les figures 62A et 62B illustrent un exemple de la distribution des 11 cytokines étudiées obtenue respectivement après analyse par cytométrie de flux et après analyse par le logiciel "FlowCytometric Pro 2.1 Software".



**Figure 62** : Exemple de profil de distribution des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture

## V.1 - Dosage des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales palatines

La figure 63 présente les niveaux de sécrétion des différentes cytokines dans les surnageants de culture de cellules B de LLC-B stimulées ou non avec les ODN CpG,

l'imiquimod et le PMA.

La stimulation des cellules n'induit pas d'augmentation de la sécrétion d'IL-12 par les lymphocytes B amygdaliens, négligeable à l'état de base. Par contre, il existe une synthèse spontanée d'IFN- $\gamma$ , augmentée après traitement avec le PMA, les ODN CpG ou l'imiquimod.

L'IL-2 a été retrouvée dans tous les surnageants de culture avec et sans stimulation. Sa concentration était légèrement augmentée après culture avec le PMA, les ODN CpG et l'imiquimod.

De même, une production d'IL-10 a été observée à l'état de base, légèrement augmentée après stimulation avec le PMA et de façon plus importante et significative dans les surnageants de culture des cellules B amygdaliennes stimulées avec les ODN CpG ( $p=0.008$ ) et avec l'imiquimod ( $p=0.04$ ).

L'IL-4 était produite à un degré moindre à l'état basal et cette expression était inchangée quelles que soient les conditions de stimulation utilisées.

La sécrétion de l'IL-5 était absente quelles que soient les conditions testées.

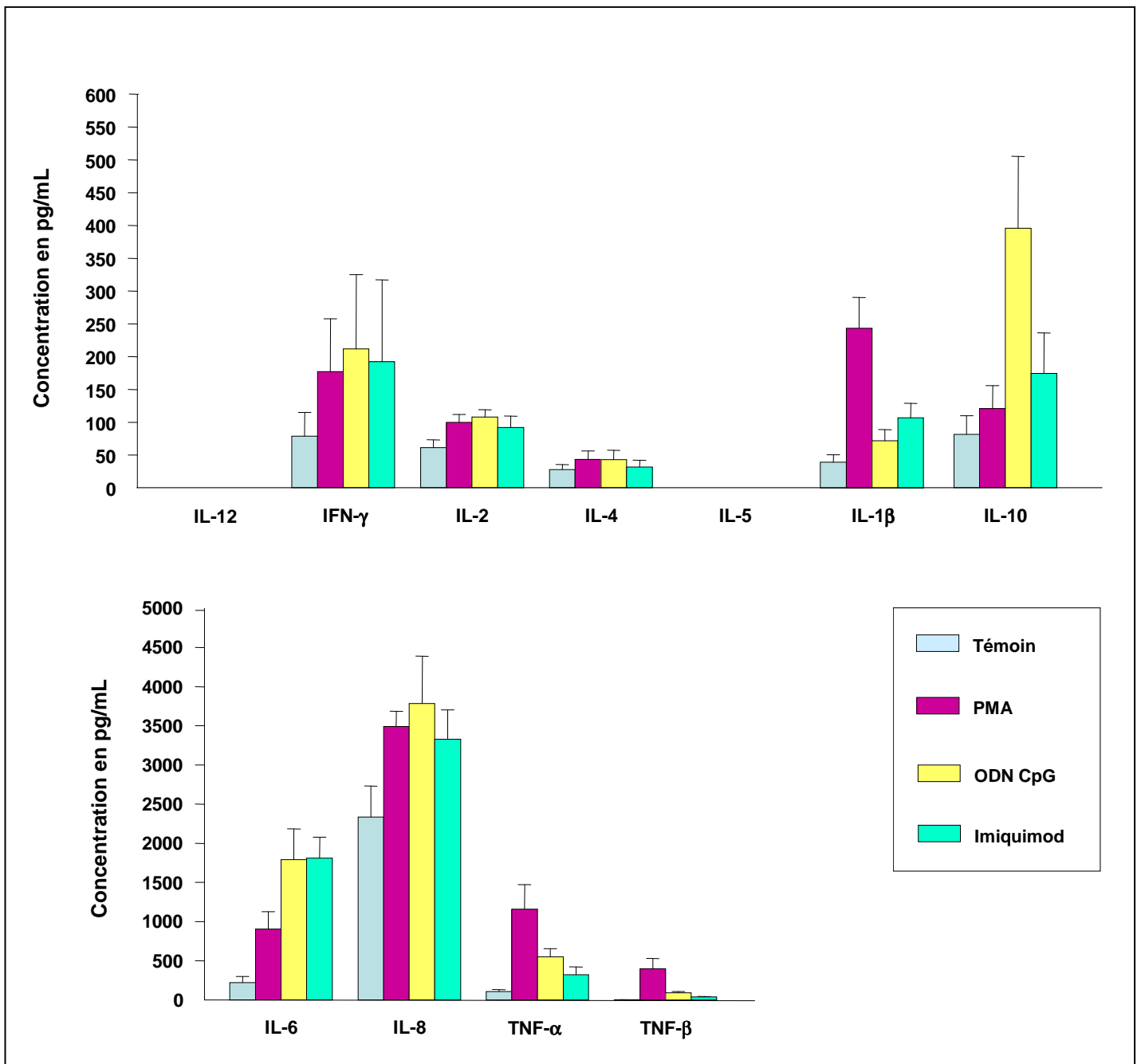
La production d'IL-1 $\beta$ , détectable à l'état de base, était induite de façon significative et considérable après stimulation avec le PMA ( $p=0.0002$ ) et à un degré moindre après stimulation avec l'imiquimod ( $p=0.013$ ). Les ODN CpG entraînaient également une légère augmentation de cette stimulation.

En ce qui concerne IL-6, son expression était augmentée de façon significative avec le PMA ( $p=0.013$ ), les ODN CpG ( $p=0.002$ ), et l'imiquimod ( $p=0.001$ ).

Une forte concentration d'IL-8 a été détectée dans toutes les conditions testées, avec ou sans stimulation.

A l'état basal, nous avons détecté une concentration de TNF- $\alpha$  de 80 pg/mL. Cette concentration était augmentée de façon significative avec le PMA ( $p=0.003$ ) et les ODN CpG ( $p=0.0006$ ). La stimulation avec l'imiquimod entraînait également une augmentation de la sécrétion de cette cytokine.

La sécrétion de TNF- $\beta$  était induite de façon significative dans le cas des cellules B saines stimulées avec le PMA ( $p=0.002$ ) et à un degré moindre après stimulation avec les ODN CpG. Toutefois, cette sécrétion était négligeable pour les autres conditions.



**Figure 63** : Expression des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales palatines

Les résultats sont exprimés en moyennes des concentrations de cytokines dosées dans les surnageants de culture de suspensions cellulaires d'amygdales palatines, ajustées à une concentration de  $5 \times 10^6$  dans un volume total de 1.5 mL, et stimulées ou non pendant 48 heures avec 5  $\mu\text{g/L}$  de PMA, 0.5  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG M362 ou 2  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod R837.

## V.2 - Dosage des cytokines dans les surnageants de culture de cellules B de LLC

La figure 64 présente les niveaux de sécrétion des différentes cytokines dans les surnageants de culture de cellules B de LLC-B stimulées ou non avec les ODN CpG, l'imiquimod et le PMA.

Les sécrétions d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  étaient absentes ou négligeables quelles que soient les conditions de culture pour tous les patients à l'exception d'un seul pour lequel nous avons relevé une expression de ces cytokines à l'état basal. L'échantillon de ce patient présentait 17.6% de lymphocytes T alors que le taux de lymphocytes T des autres patients variait entre 2.4 et 5.8% ce qui peut expliquer la production plus importante d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  par rapport aux autres patients.

Le dosage de l'IL-2 a montré une expression de cette cytokine pour les surnageants de culture de cellules B tumorales non stimulées pour 5 patients sur 20. Aucune variation significative de la sécrétion de cette cytokine n'a été observée après stimulation avec les ODN CpG ou avec l'imiquimod. Le PMA était par contre capable d'induire la production de cette cytokine au niveau des cellules qui ne l'exprimaient pas à l'état basal.

La sécrétion d'IL-10 dans les surnageants de culture des cellules B tumorales non stimulées ou stimulées avec l'imiquimod était négligeable. Cette sécrétion était par contre augmentée de façon significative et importante dans les surnageants de culture des cellules B amygdaliennes stimulées avec le PMA ( $p=0.007$ ). Les ODN CpG induisaient également une augmentation de l'expression de cette cytokine à un degré moindre.

Une faible production d'IL-4 a été notée à l'état basal et aucune variation significative n'a été observée après stimulation avec le PMA, les ODN CpG et l'imiquimod.

La stimulation des cellules B tumorales n'affectait pas la production d'IL-5 qui restait négligeable quelles que soient les conditions de stimulation.

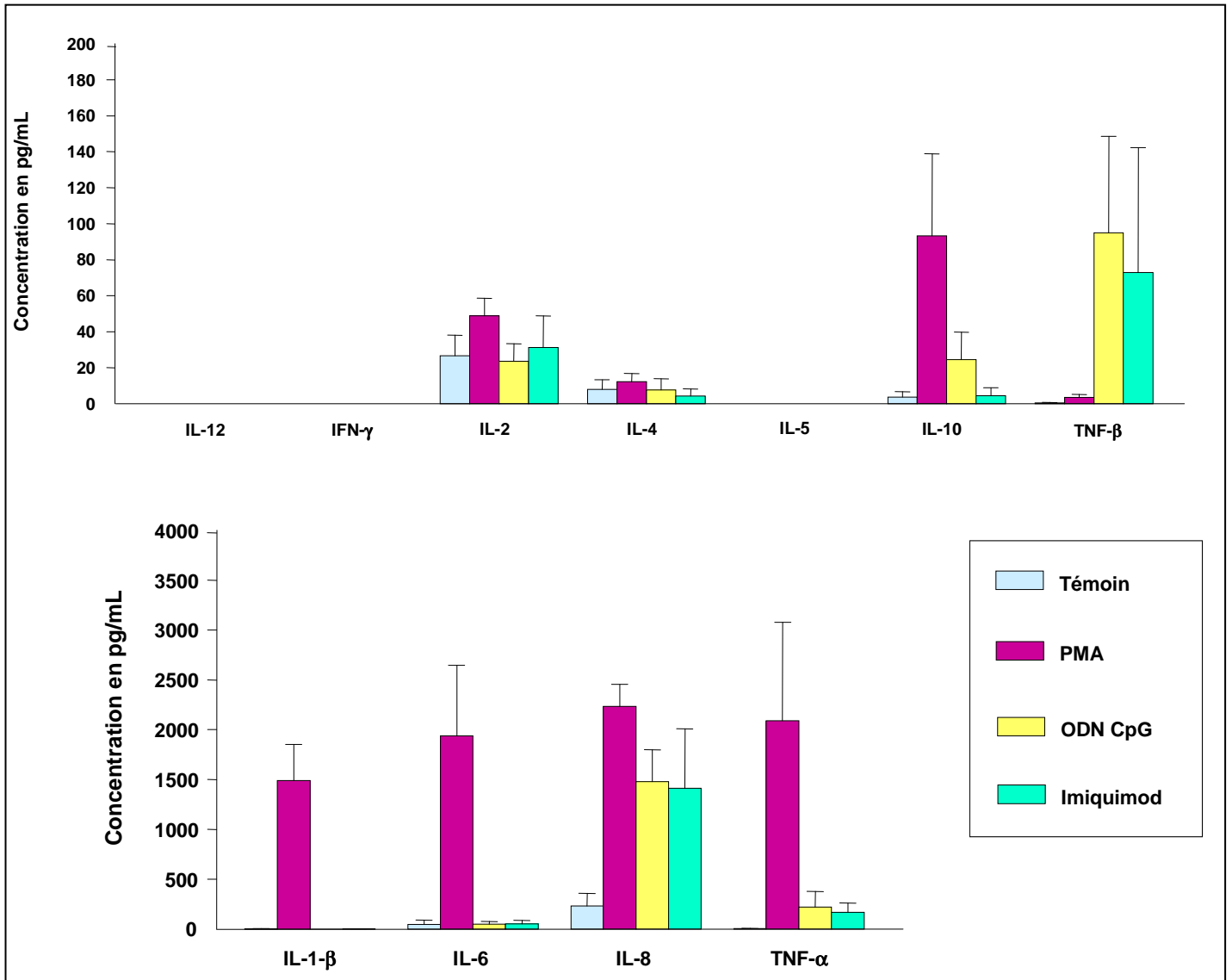
L'expression d'IL-1 $\beta$  était négligeable pour les cellules B tumorales contrôles ainsi que pour les cellules B stimulées avec les ODN CpG et l'imiquimod, mais était induite par le PMA ( $p<0.0001$ ).

A l'état basal et après stimulation avec les ODN CpG et l'imiquimod, la sécrétion d'IL-

6 était négligeable. Toutefois, cette cytokine était synthétisée de façon importante après stimulation avec le PMA ( $p=0.001$ ).

L'IL-8 a été retrouvée dans les surnageants de culture sans stimulation. Cette expression était fortement augmentée de façon significative dans les cellules stimulées avec PMA ( $p=0.0001$ ), ODN ( $p=0.002$ ) et imiquimod ( $p=0.006$ ).

Aucune production de TNF- $\alpha$  n'a été détectée dans les surnageants de cellules B de LLC-B non stimulées. Par contre, elle était augmentée de façon significative et importante après stimulation avec le PMA ( $p=0.0003$ ). Une plus faible augmentation a également été observée après traitement des cellules avec les ODN CpG et l'imiquimod. De plus, nous avons noté que la sécrétion de TNF- $\beta$  était induite dans les surnageants de culture des cellules stimulées avec les ODN CpG ( $p=0.03$ ) et avec l'imiquimod mais pas pour les autres conditions.



**Figure 64** : Expression des cytokines dans les surnageants de culture de LLC-B

Les résultats sont exprimés en moyennes des concentrations de cytokines dosées dans les surnageants de culture de suspensions cellulaires de LLC-B, ajustées à une concentration de  $5 \times 10^6$  dans un volume total de 1.5 mL, stimulées ou non pendant 48 heures avec 5  $\mu\text{g/L}$  de PMA, 0.5  $\mu\text{M}$  d'ODN CpG M362 ou 2  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod R837.

### **V.3 - Comparaison des sécrétions de cytokines obtenues dans les surnageants de culture de cellules B saines et tumorales**

Nous avons comparé les effets respectifs du PMA, des ODN CpG et de l'imiquimod au niveau des suspensions cellulaires saines et tumorales. Pour ce faire, nous avons calculé les concentrations relatives de chaque cytokine par le calcul d'un ratio cellules stimulées/cellules non stimulées, pour chaque type de suspension et chaque type de stimulation. Ceci permet une comparaison plus exacte des effets induits sur les cellules tumorales par rapport aux cellules normales.

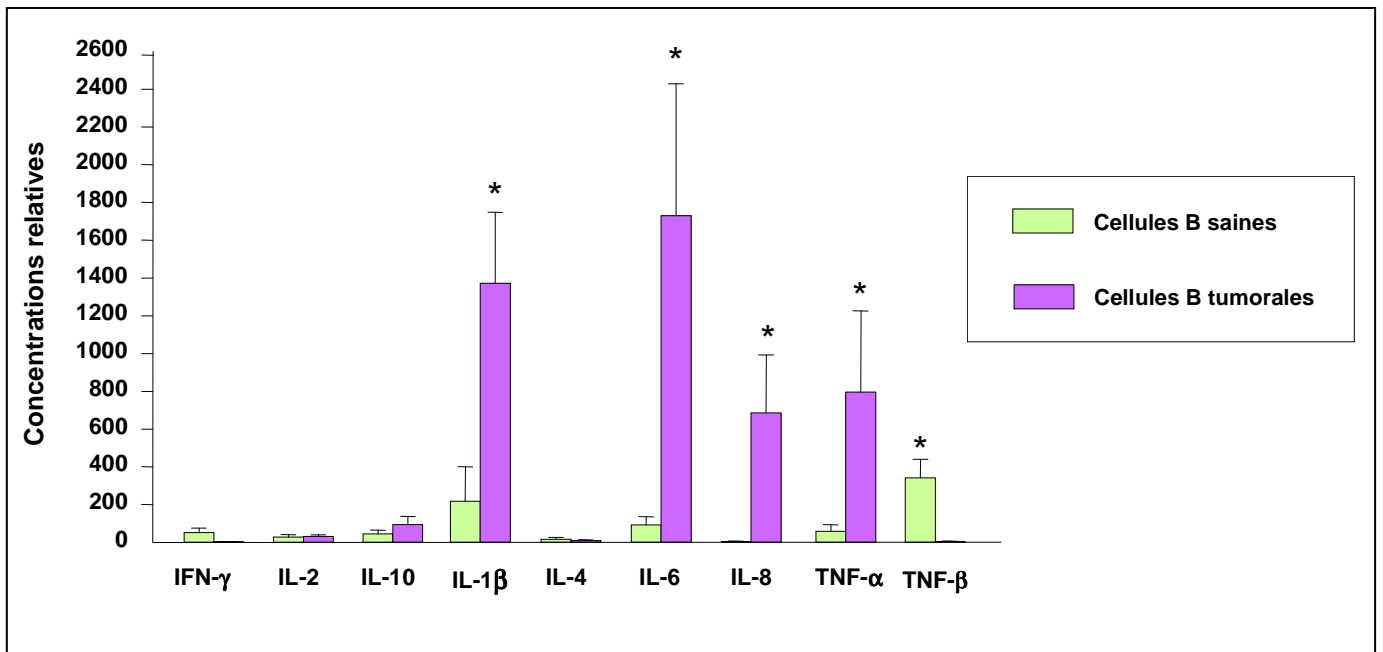
La figure 65 présente les concentrations relatives des différentes cytokines d'une part dans les surnageants de culture d'amygdales palatines et d'autre part dans les surnageants de culture de LLC-B, après stimulation avec le PMA, par rapport à leur concentration basale.

Ces résultats montrent que le PMA est capable d'induire une sécrétion significativement plus importante de l'IL-1 $\beta$  (p=0.0008), de l'IL-6 (p=0.005), de l'IL-8 (p<0.001) et du TNF- $\alpha$  (p=0.01), dans les suspensions cellulaires issues de LLC-B par rapport aux suspensions cellulaires éluées d'amygdales palatines. Cet ester de phorbol entraîne également, à un moindre degré, une production d'IL-10 plus importante dans les suspensions cellulaires de LLC-B par rapport aux suspensions cellulaires amygdaliennes.

Les concentrations d'IL-2 et d'IL-4 sont augmentées dans un même rapport pour les cellules saines et les cellules tumorales.

Comme décrit plus haut, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  n'a été détectée que dans les suspensions amygdaliennes.





**Figure 65** : Concentrations relatives des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales et de LLC stimulés avec du PMA

Les suspensions cellulaires de LLC-B et d'amygdales palatines, ajustées à une concentration de  $5 \times 10^6$  dans un volume total de 1.5 mL, ont été stimulées ou non pendant 48 heures avec 5  $\mu\text{g/L}$  de PMA. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de concentrations de chacune des cytokines par rapport à leur expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus cellules B saines.

La figure 66 illustre les concentrations relatives des différentes cytokines dans les surnageants cellulaires d'amygdales palatines et de LLC-B, après stimulation avec 2  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod, par rapport à leurs concentrations basales.

La production d'IL-8 apparaît fortement augmentée dans les suspensions cellulaires saines et tumorales.

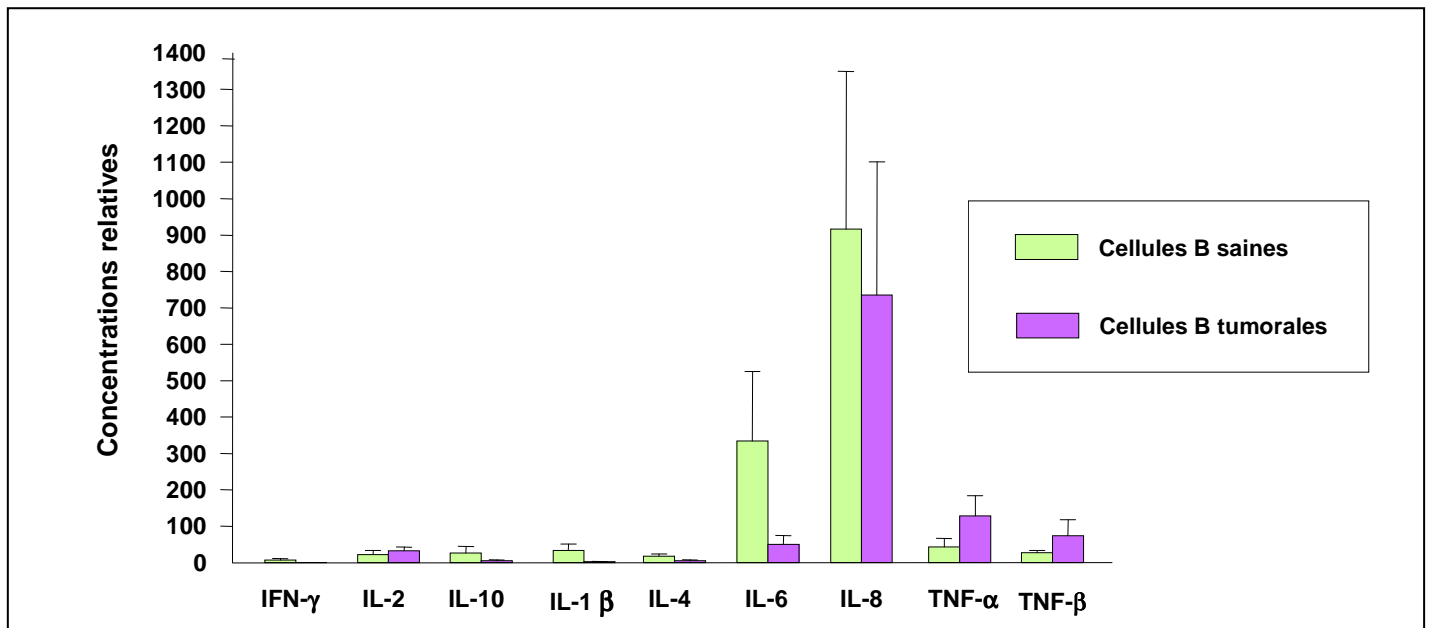
La stimulation avec l'imiquimod entraîne une sécrétion d'IL-6 jusqu'à 6 fois plus importante dans les suspensions cellulaires d'amygdales palatines par rapport aux suspensions cellulaires de LLC-B. Les productions d'IL-10, d'IL-1 $\beta$  et d'IL-4 sont également induites de façon plus importante dans les surnageants de culture des cellules amygdaliennes.

La sécrétion d'IL-2 était augmentée dans un même rapport après stimulation des cellules

amygdaliennes et tumorales avec l'imiquimod.

Par contre, l'imiquimod induit une sécrétion plus importante de TNF- $\alpha$  et de TNF- $\beta$  dans les suspensions cellulaires tumorales.

Enfin, l'imiquimod entraîne une sécrétion d'IFN- $\gamma$  uniquement dans les suspensions cellulaires amygdaliennes.



**Figure 66** : Concentrations relatives des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales et de LLC stimulés avec l'imiquimod R837

Les suspensions cellulaires de LLC-B et d'amygdales palatines, ajustées à une concentration de  $5 \times 10^6$  dans un volume total de 1.5 mL, ont été stimulées ou non pendant 48 heures avec 2  $\mu\text{g/mL}$  d'imiquimod. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de concentrations de chacune des cytokines par rapport à leur expression basale.

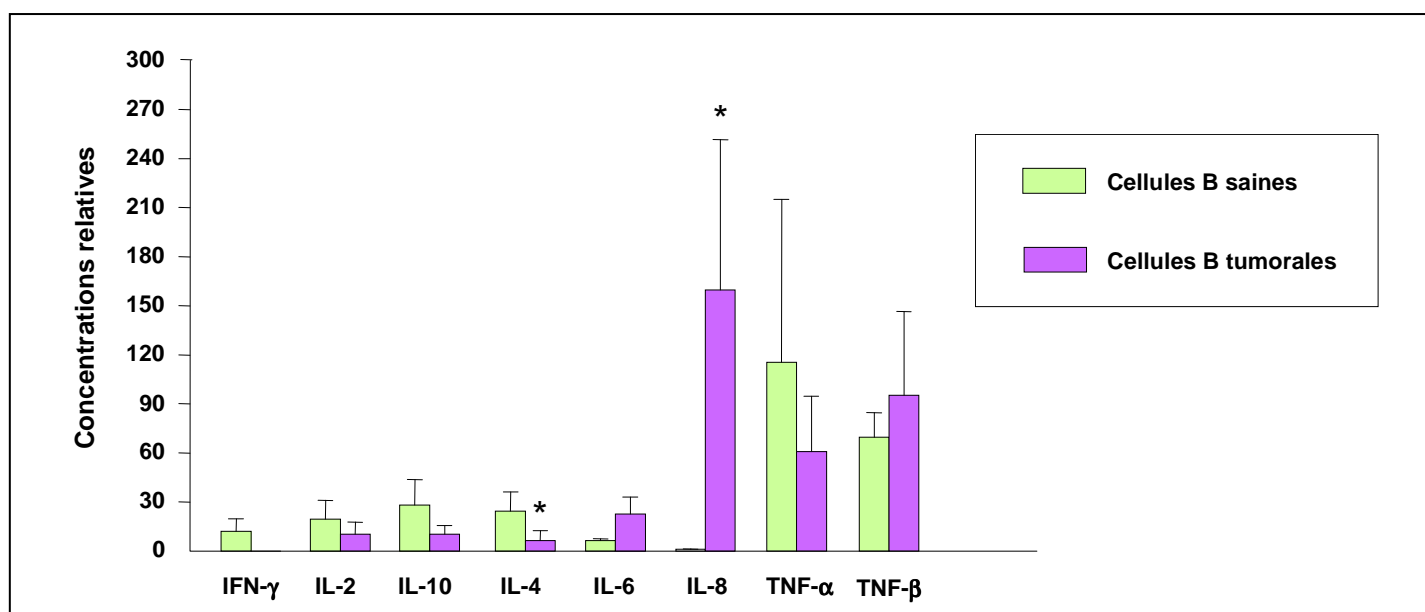
La figure 67 illustre la comparaison du comportement des cellules tumorales par rapport aux cellules B saines après stimulation avec les ODN CpG.

Après stimulation avec les ODN CpG, la sécrétion d'IL-8 est significativement augmentée de façon beaucoup plus importante dans les surnageants de culture de LLC-B par rapport aux surnageants de culture de cellules saines ( $p=0.0186$ ). La production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  est également induite de façon plus importante dans les suspensions cellulaires de

LLC-B.

Les ODN CpG entraînent une plus forte sécrétion d'IL-2, d'IL-10 et de TNF- $\alpha$  dans les suspensions cellulaires amygdaliennes. De la même façon, l'IL-4 est produite de façon significativement plus importante dans les surnageants de culture de cellules B saines ( $p=0.03$ ).

Les ODN CpG n'induisaient une sécrétion d'IFN- $\gamma$  uniquement dans les suspensions cellulaires amygdaliennes.



**Figure 67** : Concentrations relatives des cytokines dans les surnageants de culture d'amygdales et de LLC stimulés avec les ODN CpG M362

Les suspensions cellulaires de LLC-B et d'amygdales palatines, ajustées à une concentration de  $5 \times 10^6$  dans un volume total de 1.5 mL, ont été stimulées ou non pendant 48 heures avec 0.5  $\mu$ M d'ODN CpG. Les résultats sont exprimés en moyennes ( $\pm$  ES) des ratios de concentrations de chacune des cytokines par rapport à leur expression basale.

\* =  $P < 0.05$  versus cellules B saines.

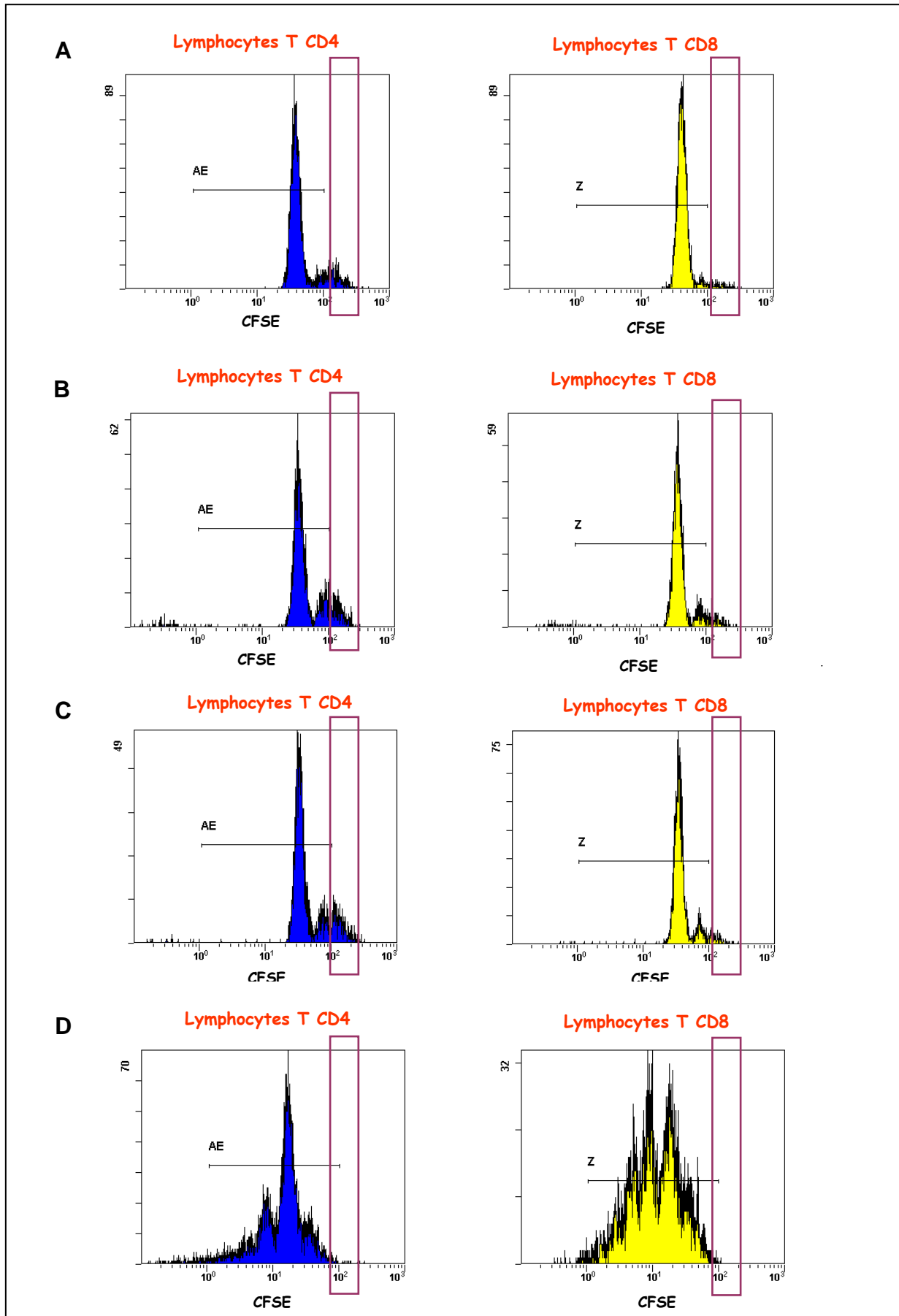
## **VI - ETUDE FONCTIONNELLE : REACTION MIXTE LEUCOCYTAIRE**

Nous avons montré que les ODN CpG et le PMA induisaient une activation des cellules B de LLC-B se traduisant par une augmentation importante du niveau d'expression des molécules de coactivation et de costimulation. Sur la base de ces résultats, nous avons voulu déterminer si ces cellules pouvaient être utilisées pour induire la prolifération de lymphocytes T allogéniques. Dans ce but, une analyse fonctionnelle des cellules B tumorales activées avec les ODN CpG et le PMA a été réalisée dans un modèle de stimulation allogénique afin de mesurer leur capacité à activer des lymphocytes T naïfs et a été comparée avec les résultats obtenus avec des cellules B saines d'amygdales palatines. Nous avons choisi de stimuler les cellules B avec 0.5  $\mu$ M d'ODN CpG M362 et avec 5  $\mu$ g/L de PMA pendant 48 heures.

### **VI.1 - Etude de la prolifération de lymphocytes T naïfs allogéniques en culture mixte avec les cellules B amygdaliennes**

Six suspensions cellulaires amygdaliennes stimulées ou non provenant d'enfants âgés de 3 à 7 ans (moyenne d'âge de 5  $\pm$  0.6 ans) ont été utilisées pour évaluer leur capacité à activer des lymphocytes T .

Un exemple du profil de cytométrie de flux obtenu pour chaque stimulation est présenté sur la figure 68.



**Figure 68** : Exemple de profils obtenus par cytométrie de flux pour l'étude de la prolifération

de cellules T allogéniques en co-culture avec des lymphocytes B amygdaliens stimulés ou non

Les cellules répondantes ont été cultivées soit seules (**A**), soit en présence de suspensions cellulaires d'amygdales palatines non stimulées (**B**), stimulées avec 0.5  $\mu$ M d'ODN CpG (**C**), ou avec 5 $\mu$ g/L de PMA (**D**) (ratio lymphocytes B/lymphocytes T de 1/1).

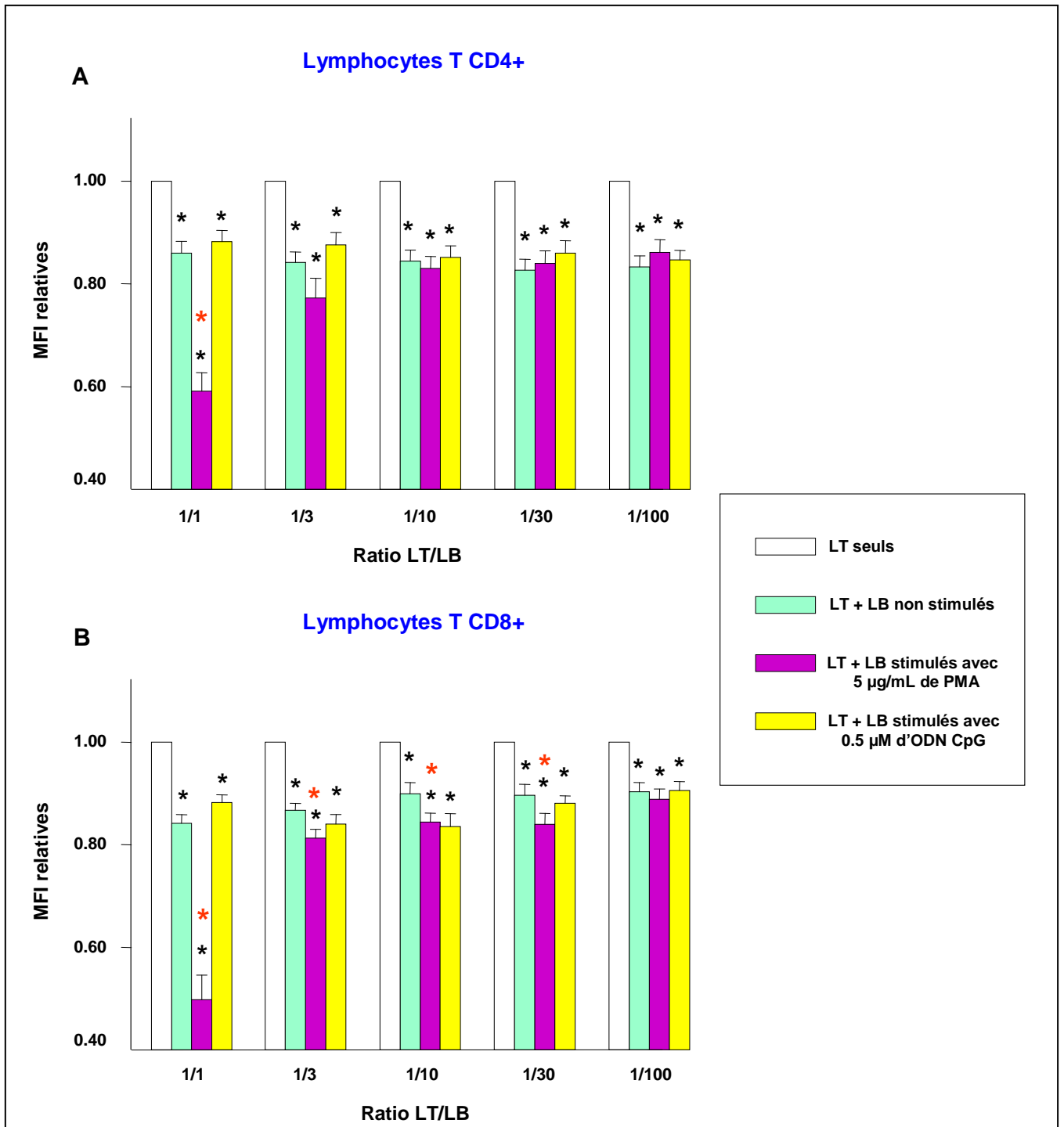
Le cadre représenté à droite de chaque histogramme correspond à la position du marquage CFSE à J0.

Comme indiqué précédemment, la diminution de la MFI du CFSE permet de suivre la prolifération cellulaire des cellules marquées par cytométrie de flux.

Les résultats présentés sur la figure 69 montrent que, dans tous les cas, les lymphocytes T CD4 et CD8 mis en culture avec des lymphocytes B non stimulés proliféraient légèrement par rapport aux lymphocytes T seuls qui, eux-mêmes, semblaient en partie activés *in vivo* ou par les conditions de séparation (pic minoritaire à droite).

Les cellules B amygdaliennes stimulées avec 5  $\mu$ g/L de PMA induisent une prolifération cellulaire significative des cellules T CD4+ ( $p=0.0001$ ) ainsi que des cellules T CD8+ ( $p=0.0002$ ) pour les ratios lymphocytes B/lymphocytes T de 1/1 par rapport aux cellules B non stimulées. De plus, les lymphocytes T CD4 prolifèrent, à un moindre degré, pour le ratio 1/3 et une prolifération significative des lymphocytes T CD8, à un moindre degré a également été mise en évidence, pour les ratios 1/3, 1/10 et 1/30.

Par contre, les cellules stimulées avec les ODN CpG induisent une prolifération allogénique des deux sous-populations de lymphocytes T comparable à celle obtenue avec les cellules B non stimulées. Aucune différence n'a été observée quels que soient les ratios testés (figure 69A et 69B).



**Figure 69** : Prolifération allogénique des lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs en réponse aux cellules B de LLC-B stimulées ou non

Chacune des suspensions cellulaires tumorales (notées LB) préalablement stimulées ou non avec 0.5 µM d'ODN CpG et 5 µg/L de PMA pendant 48 heures ont été cultivées avec 2 suspensions cellulaires (notées LT) provenant de sujets contrôles à des doses graduelles (ratio lymphocytes B/lymphocytes T de 1/1, 1/3, 1/10, 1/30 et 1/100). Les analyses par cytométrie de flux ont été réalisées au niveau des

lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (A) et CD8<sup>+</sup> (B). Les résultats sont exprimés en ratios des moyennes de MFI ( $\pm$  ES) obtenues pour les lymphocytes T mis en présence de lymphocytes B activés ou non par rapport à la MFI des lymphocytes T naïfs seuls.

\* =  $P < 0.05$  versus lymphocytes T seuls ; \* =  $P < 0.05$  versus lymphocytes T + lymphocytes B non stimulés

## **VI.2 - Etude de la prolifération de lymphocytes T naïfs allogéniques en culture mixte avec les cellules B tumorales**

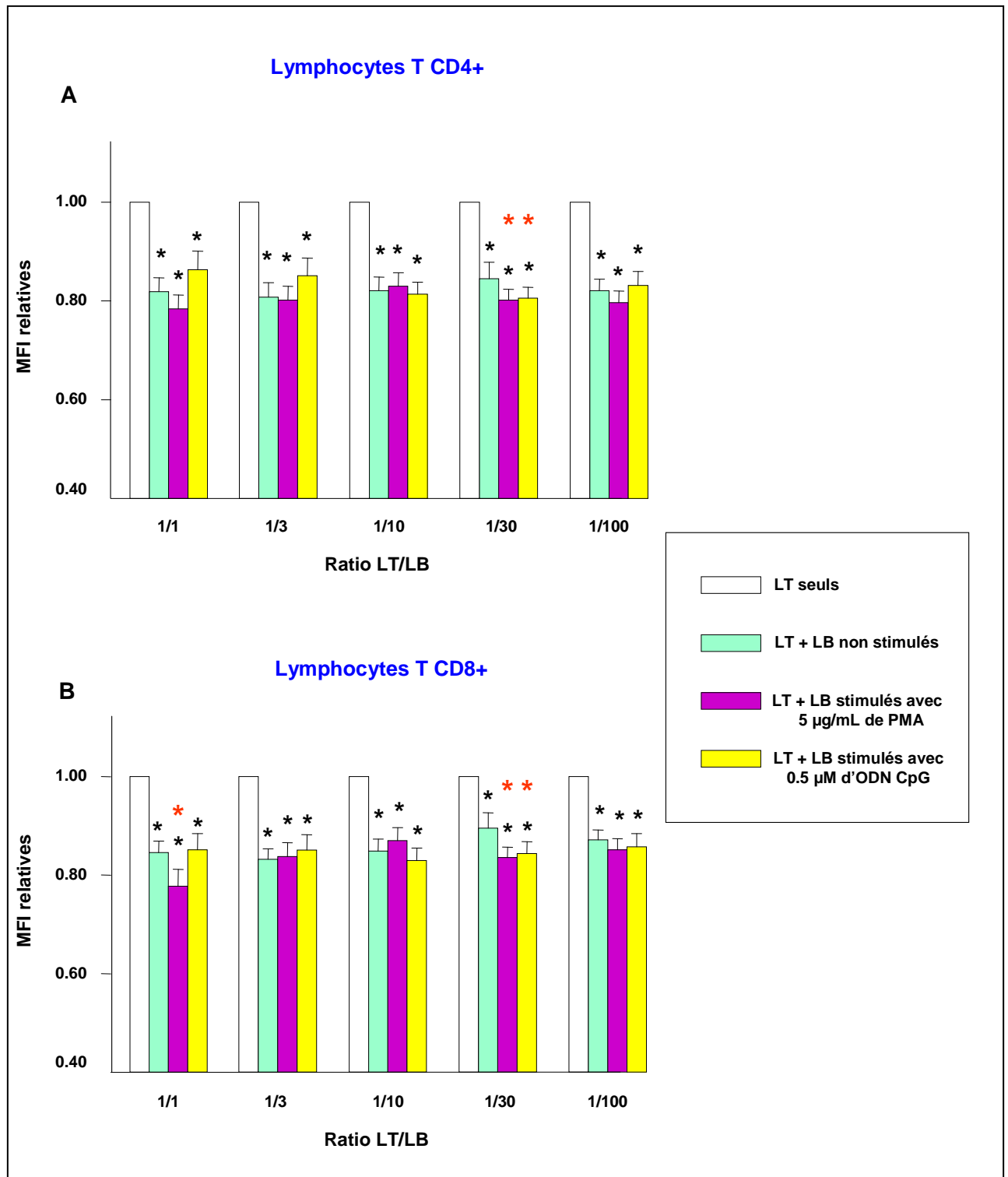
Les suspensions cellulaires de 5 patients atteints de LLC-B âgés de 63 à 84 ans (moyenne d'âge de  $73.4 \pm 3.6$ ) avec un score de Matutes de 4 ou 5 ont été utilisées pour l'étude de la prolifération de lymphocytes T allogéniques.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 70 et indiquent que les cellules B de LLC entraînent spontanément une prolifération significative des lymphocytes T allogéniques CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. En effet, le marquage CFSE est significativement diminué dans les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> mis en contact avec des cellules de LLC-B..

L'activation des cellules B tumorales avec le PMA induit une légère augmentation de la prolifération des lymphocytes T CD4 pour les ratios 1/1 et 1/30 par rapport à la prolifération obtenue pour les cellules T co-cultivées avec les suspensions de cellules B seules. De la même façon, le PMA initie une prolifération significative des lymphocytes T CD8 de faible intensité surtout visible pour le ratio 1/1.

La stimulation de la prolifération allogénique par les ODN CpG est similaire à celle observée avec les cellules de LLC-B non stimulées, voire légèrement supérieure pour un ratio de 1:30.





**Figure 70** : Prolifération allogénique des lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs en réponse aux cellules B amygdaliennes stimulées ou non

Chacune des suspensions cellulaires amygdaliennes (notées LB) préalablement stimulées ou non avec 0.5 µM d'ODN CpG et 5 µg/L de PMA pendant 48 heures ont été cultivées avec 2 suspensions

cellulaires (notées LT) provenant de sujets contrôles à des doses graduelles (ratio lymphocytes B/lymphocytes T de 1/1, 1/3, 1/10, 1/30 et 1/100). Les analyses par cytométrie de flux ont été réalisées au niveau des lymphocytes T CD4+ (A) et CD8+ (B). Les résultats sont exprimés en ratios des moyennes de MFI ( $\pm$  ES) obtenues pour les lymphocytes T mis en présence de lymphocytes B activés ou non par rapport à la MFI des lymphocytes T naïfs seuls.

\* =  $P < 0.05$  versus lymphocytes T seuls ; \* =  $P < 0.05$  versus lymphocytes T + lymphocytes B non stimulés.

## **DISCUSSION**

## **Les TLRs sont exprimés au niveau protéique par les lymphocytes B sains et de LLC**

Ce travail s'est proposé d'analyser, dans un premier temps, en cytométrie de flux, l'expression des différents TLRs au niveau de lymphocytes B normaux et de lymphocytes B de LLC-B. Cette étape préalable était indispensable une exploration de l'éventuelle modulation et/ou stimulation de ces récepteurs par des agonistes spécifiques, dans un but thérapeutique.

Les résultats de cette étude ont montré que les cellules B de LLC-B présentent un profil d'expression des TLRs similaire à celui des lymphocytes B obtenus à partir du sang périphérique ou d'amygdales palatines d'individus sains, avec notamment une faible expression de TLR-4 et une forte expression de TLR-7, TLR-9 et TLR-10. TLR-9 apparaît de plus surexprimé au niveau des cellules B tumorales.

Dans la littérature, l'expression des TLRs dans les lymphocytes B humains normaux, a été analysée par différentes équipes au niveau de sous-populations cellulaires d'amygdales ou du sang périphérique (Bourke, 2003 ; Bernasconi, 2003 ; Muzio, 2000, Eaton-Bassiri, 2004 ; Dasari, 2005). La majorité des études portant sur l'expression de ces récepteurs se sont toutefois focalisées sur la détection de leurs ARNm par Northern Blot (Muzio, 2000) ou par PCR en temps réel (Hornung, 2002). Le développement récent d'anticorps dirigés contre ces protéines a permis une nouvelle approche de l'étude de leur profil d'expression, au niveau cellulaire. Toutefois, à ce jour, seules quelques études se sont intéressées à l'expression de ces récepteurs par cytométrie de flux (Eaton-Bassiri, 2004 ; Dasari, 2005).

La plupart de ces travaux montrent que de l'ARN messager codant pour tous les TLRs peut être détecté dans les cellules B mais que des taux significatifs sont essentiellement retrouvés pour TLR-1, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9 et TLR-10, expression qui apparaît plus importante après activation cellulaire (Bourke, 2003 ; Bernasconi, 2003 ; Hornung, 2002). Par contre, l'étude de l'expression protéique des différents TLRs au niveau des cellules B circulantes et amygdaliennes a permis la mise en évidence de l'expression de TLR-1, TLR-2, TLR-7, TLR-9 et TLR-10 (Dasari, 2005 ; Mansson, 2006).

Très peu d'études se sont focalisées sur l'expression des TLRs au niveau de cellules B de syndromes lymphoprolifératifs et en particulier de la LLC-B (Bourke, 2003 ; Jahrsdörfer, 2005 ; Spaner, 2006). Bourke et al. (2003) ont rapporté une forte expression de TLR-9 mais

également de TLR-10 dans des lignées cellulaires représentatives de néoplasies à cellules B matures (tels que le syndrome de Burkitt, le lymphome folliculaire et le myélome multiple).

La surexpression de TLR-9 observée dans les cellules B de LLC-B par rapport aux cellules B normales pourrait être corrélée au statut "mémoire" des lymphocytes B de LLC-B. En effet, Bernasconi et al. (2003) ont montré une expression plus importante de plusieurs TLRs et notamment de TLR-9 au niveau des cellules B mémoires par rapport aux cellules B naïves. Une autre étude a également rapporté que l'expression des ARNm de TLR-9 et TLR-10 augmente fortement des cellules B au repos aux cellules B matures (Bourke, 2003). Ces résultats suggèrent que l'expression des ARNm de ces récepteurs au niveau des cellules B normales apparaît régulée au cours du développement et que les TLRs sont contrôlés par des mécanismes post-transcriptionnels dans les lymphocytes B.

Le rôle critique que jouent les TLRs dans l'immunité innée et dans l'inflammation a incité les chercheurs à identifier de nouvelles classes thérapeutiques d'immunomodulateurs ciblant ces récepteurs. L'existence d'agonistes spécifiques pour certains d'entre eux permet ainsi d'envisager leur modulation dans une optique de thérapeutique des pathologies des cellules B. En outre, des études récentes ont montré le rôle que peuvent jouer les ligands de ces récepteurs en tant qu'adjuvants pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie et de l'immunothérapie de la LLC-B (van Duin, 2006).

Des ligands sont connus pour TLR-7 et TLR-9, bien exprimés par les cellules B humaines, voire surexprimés pour TLR-9 sur les cellules de LLC-B. Ceci nous a permis d'examiner, *in vitro*, l'influence de leurs agonistes respectifs sur des cellules B de LLC-B, et de comparer l'effet observé avec celui induit par une stimulation similaire de lymphocytes B sains provenant d'amygdales palatines. Nous nous sommes également intéressés à l'effet d'une stimulation de TLR-4 via le LPS, puisque, d'une part, nous avons noté une faible expression de ce récepteur sur les lymphocytes B humains et, d'autre part, le LPS est couramment utilisé pour stimuler des cellules B murines (Melchers, 1975).

Les amygdales palatines ont été utilisées comme source importante de lymphocytes B humains sains. *In vivo*, l'activation des cellules B par les antigènes a essentiellement lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. Au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, comme les amygdales, ceci permet de générer une réponse efficace à un signal de danger. Les follicules lymphoïdes et le tissu lymphoïde diffus qui constituent les amygdales sont enchâssés dans le chorion de la muqueuse palatine et constituent une source intéressante de cellules B car celles-ci y représentent 50 à 60% des cellules totales. De plus, les amygdales

sont organisées, comme les autres organes lymphoïdes secondaires, en régions différenciées histologiquement abritant les lymphocytes B à différents stades d'activation et de maturation (Vessière-Louveaux, 1980 ; Logtenberg, 1981). Toutes les cellules B de ces organes peuvent potentiellement être activées, après reconnaissance de l'antigène au travers de leur récepteur, ou par des signaux non spécifiques.

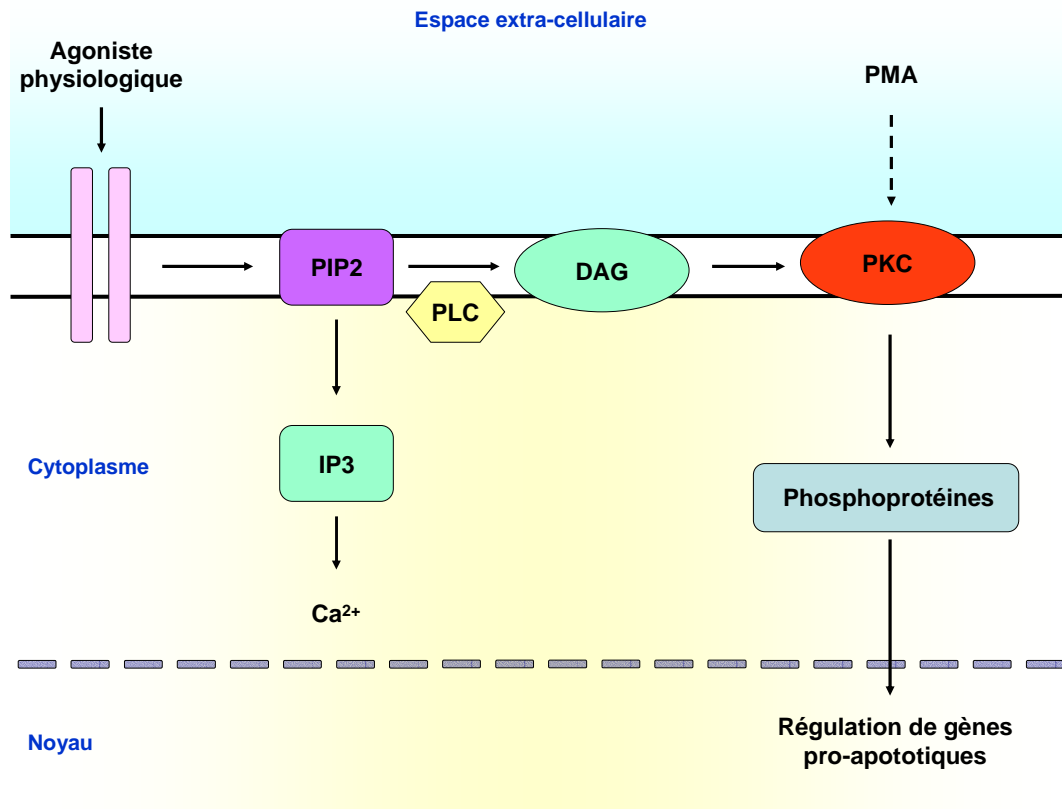
### **PMA : témoin positif de l'activation de la voie PKC**

Suite à des travaux précédents réalisés au laboratoire par le Docteur Kennel, nous avons choisi d'utiliser le PMA comme contrôle de stimulation positif.

Comme les ligands des TLRs, le PMA est une substance mitogène capable d'activer les cellules B sans l'aide de cellules T (Mond, 1990), ce qui se produit dans le cadre de rencontre avec des antigènes dits thymo-indépendants ou TI.

Nous avons montré que cet ester de phorbol protège les cellules B saines mais surtout tumorales de l'apoptose avec un effet réellement majeur observé pour les cellules de LLC-B alors que l'apoptose spontanée des cellules tumorales et des cellules saines est quasiment identique.

L'ester de phorbol PMA, également appelé TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-ester), est capable d'activer la protéine PKC qui fait partie de la famille des sérine/thréonine kinases. L'activation de la PKC dépend du métabolisme des phospholipides membranaires et débute par le clivage du PIP2 (phosphatidyl inositol biphosphate) par la phospholipase C (PLC), générant de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). Le PMA mime l'action du DAG au niveau de la PKC (Sharkey, 1986). En se liant avec leur domaine de régulation, il induit le recrutement de phosphoprotéines au niveau de la membrane plasmique initiant ainsi leur activation. La PKC peut ainsi être transloquée dans le cytoplasme où elle pourra phosphoryler les résidus sérine/thréonine d'autres protéines. Les phosphoprotéines peuvent ensuite agir comme des facteurs de transcription de différents gènes, et réguler l'expression de protéines anti-apoptotiques et donc participer à la survie cellulaire (figure 71).



**Figure 71** : Mécanismes induits par le PMA et aboutissant à la survie cellulaire

Bien que l'implication de la PKC dans l'activation ou l'inhibition de l'apoptose ait été rapportée depuis plusieurs années (Whelan, 1998), les travaux s'étant attachés à l'étude des mécanismes à l'origine de l'effet anti-apoptotique induit par le PMA sont récents. Il a été rapporté que la protéine PKC induit la phosphorylation et l'activation d'Akt, indépendamment de la PI3K, après stimulation avec le PMA, dans plusieurs types cellulaires (Li, 1999 ; Bauer, 2003 ; Kawakami, 2004).

Le PMA a par ailleurs déjà été décrit comme un inhibiteur de l'apoptose des cellules B de LLC-B (Barragan, 2006), résultat également observé dans nos propres travaux. Ces auteurs ont mis en évidence l'implication de la PKC $\beta$  dans la phosphorylation de la protéine Akt après stimulation des cellules B de LLC par le PMA.

La légère prolifération cellulaire tardive observée, pour les cellules B saines et les cellules de LLC-B, peut être expliquée par l'activation d'Akt ou par l'activation de la voie Raf/MEK/ERK. Il a en effet été montré que la protéine PKC est capable d'activer Raf-1 (Sözeri ; 1992 ; Cacace, 1996 ; Ueda 1996) et/ou MEK (Schonwasser; 1998) par phosphorylation directe (Monick, 2000 ; Kolch, 1993 ; Yip-Schneider, 2000). Il a également été suggéré que la protéine PKC peut induire la phosphorylation de RKIP (RAF kinase

inhibitor protein), une protéine inhibitrice de Raf. En se liant avec Raf, elle bloque l'activation de la voie Raf/MEK/ERK. La phosphorylation de RKIP par la PKC conduit ainsi à la dissociation de RKIP/Raf et donc à la formation du complexe Raf/MEK (Corbit, 2002).

Nous avons observé, après stimulation avec le PMA, une surexpression des facteurs de costimulation et de coactivation des cellules de LLC-B. Ces résultats sont en accord avec une étude qui a également montré qu'une stimulation des cellules B de LLC-B avec cet ester de phorbol induit l'augmentation de l'expression de molécules de classe II du CMH (Yasukawa, 1988). Par ailleurs, la morphologie des cellules est modifiée, avec l'apparition de prolongements cytoplasmiques susceptibles d'améliorer les contacts avec des lymphocytes T.

Dans ce travail, une augmentation de l'expression des marqueurs étudiés a également été mise en évidence, à un degré moindre, au niveau des cellules B d'amygdales palatines.

Des travaux précédents ont montré, après dosage par néphélométrie, de faibles taux d'IgA dans les surnageants de culture des cellules B amygdaliennes triées, mais de plus fortes concentrations d'IgG et d'IgM (Grandjenette, 2005). Ces concentrations n'étaient pas augmentées après stimulation par le PMA, ce qui est concordant avec l'absence d'expression de CD38 que nous avons relevée, et ce qui confirme donc que le PMA n'induit pas la différenciation des cellules B en plasmocytes.

*Le PMA induit la survie cellulaire des cellules B normales et surtout tumorales et une légère prolifération via l'activation de la PKC. Cet ester de phorbol entraîne également une activation cellulaire et l'apparition de prolongements cytoplasmiques caractéristiques.*

**L'imiquimod R837 stimule l'expression des signaux de coactivation et de costimulation mais induit surtout un effet pro-apoptotique rapide des cellules B de LLC**

TLR-7 peut être activé par des composants synthétiques de la famille des imidazoquinolines qui miment l'effet des ssARN et dont on a rapporté de fortes propriétés



anti-virales et anti-tumorales dans les modèles animaux (Miller, 1999). Chez l'homme, l'imiquimod est une imidazoquinoline utilisée pour traiter l'herpès génital, les maladies causées par le *papilloma virus*, ou encore le carcinome basocellulaire (Geisse, 2004).

TLR-7 est le premier TLR à avoir été ciblé spécifiquement par les firmes pharmaceutiques pour la production de molécules thérapeutiques. Ainsi, la forme commerciale de l'imiquimod, l'Aldara™, qui se présente sous la forme d'une crème à 5% de principe actif, a été approuvée en 1997 comme outil de thérapie anti-cancéreuse avant même que les mécanismes d'action de ces récepteurs aient été complètement élucidés. Des rémissions cliniques et histologiques complètes ont par ailleurs été observées dans le traitement des lymphomes à cellules T (Didona, 2004) ou encore dans le traitement des localisations cutanées de la LLC-B après application de cette crème (Spaner, 2005).

L'étude de la prolifération cellulaire après marquage au CFSE des cellules B tumorales stimulées avec l'imiquimod R837 a montré des ratios normalisés de MFI du CFSE plus importants que pour les témoins. Ces résultats pourraient être liés à l'effet pro-apoptotique rapide et important induit par cet agoniste de TLR-7, au niveau de ces cellules, pour les plus fortes concentrations testées. En effet, la condensation cytoplasmique liée à l'apoptose pourrait entraîner une concentration corpusculaire du CFSE augmentant corrélativement le signal de chaque événement cellulaire .

Afin d'évaluer le niveau d'activation cellulaire des cellules saines et des cellules tumorales stimulées avec l'imiquimod R837, l'expression de HLA-DR, qui est une molécule de classe II du CMH, ainsi que des molécules de costimulation CD80, CD86, CD54, CD58 et CD40 a été étudiée.

CD80 (ou B7.1) et CD86 (ou B7.2) sont des glycoprotéines transmembranaires de la Superfamille des Immunoglobulines (IgSF). En se liant à CD28 présent sur les lymphocytes T, ces molécules fournissent un signal de costimulation nécessaire à l'activation des cellules qui les expriment, cellules présentatrices d'antigène et lymphocytes B (Lees, 1998).

CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de la famille du récepteur du Nerve growth factor (NGFR) qui, en se liant à son ligand CD40L (CD154) fournit d'importants signaux de costimulation nécessaires pour la différenciation terminale T dépendante de lymphocytes B activés (Lees, 1998).

CD54 et CD58 sont des glycoprotéines transmembranaires IgSF fonctionnant comme des molécules d'adhésion dans les interactions des lymphocytes T avec les cellules

présentatrices d'antigène (Lees, 1998).

Nous nous sommes également intéressés au marqueur IgSF CD83 qui, en raison de sa présence sur les cellules présentatrices d'antigène doit probablement également être mis en jeu dans la présentation antigénique en tant que molécule de costimulation (Lees, 1998).

La stimulation des cellules amygdaliennes avec l'imiquimod R837, *in vitro*, induit une surexpression importante de HLA-DR et à un moindre degré des autres marqueurs de costimulation étudiés.

Les travaux s'étant attachés à l'étude de la stimulation des cellules B saines humaines via l'imiquimod R837 sont rares. Mansson et al. (2006) ont rapporté une surexpression de HLA-DR après stimulation de cellules amygdaliennes avec cet agoniste de TLR-7. Une étude chez la souris a également rapporté que l'imiquimod R837 utilisé à des concentrations inférieures à la plus faible dose que nous avons testée augmente l'expression des molécules de classe II du CMH et de CD86 de lymphocytes B normaux (Tomai, 2000).

Dans ce travail, une activation des cellules de LLC-B a été observée avec l'imiquimod, se traduisant par une augmentation à la fois dose-dépendante et dépendante du temps de l'expression de HLA-DR et de CD40, et à un moindre degré des autres marqueurs de costimulation. Nous avons surtout observé une apoptose rapide et significative de ces cellules tumorales après stimulation avec les plus fortes concentrations testées, autrement dit avec 5, 10 et 20 µg/mL d'imiquimod.

Il est également à noter que la surexpression des marqueurs de costimulation et de coactivation observée au niveau des cellules tumorales et des cellules saines, après stimulation avec l'imiquimod R837, est de même ordre de grandeur. Par contre, alors que, comme mentionné plus haut, l'apoptose spontanée des cellules tumorales et des cellules saines est quasiment similaire, des résultats différents sont obtenus, au niveau de ces cellules, après stimulation avec l'imiquimod. En effet, un effet pro-apoptotique rapide et important est visible pour les cellules de LLC-B stimulées via TLR-7 alors que seule la plus forte concentration d'imiquimod induit un effet pro-apoptotique tardif des cellules amygdaliennes.

Les informations concernant l'activité fonctionnelle de l'imiquimod R837 au niveau des cellules B de LLC-B sont limitées. Toutefois, nos résultats sont concordants avec ceux rapportés par Spaner et al. (2006). Ces auteurs ont examiné l'effet de la stimulation de cellules B de LLC-B avec S28690, un autre agoniste de TLR-7 de la famille des imidazoquinolines, à une concentration proche de la plus faible concentration que celle testée ici. Dans ces

conditions, une augmentation légèrement plus importante de l'expression des marqueurs de coactivation et de costimulation que celle que nous avons observée a été mise en évidence.

L'activité pro-apoptotique de l'imiquimod a été montrée dans des cultures de cellules tumorales épithéliales (Schön, 2003) puis a été confirmé, *in vivo*, dans des tumeurs de différentes origines (Sullivan, 2003 ; Vidal, 2004 ; Sidbury, 2003, Schön, 2004b) et, au niveau cellulaire, *in vitro* (Meyer, 2003). Schön et al. (2003) ont rapporté que des cellules tumorales de carcinome baso-cellulaire, cultivées avec de l'imiquimod et en l'absence d'autres cellules immunitaires, présentent, de façon dose dépendante, une apoptose importante par rapport aux cellules sans stimulation. Cet effet pro-apoptotique a été observé dans des cellules tumorales à des concentrations comprises entre 25 µg/mL et 50 µg/mL, concentrations jusqu'à 1000 fois inférieures à la dose préconisée pour la crème Aldara<sup>TM</sup> mise sur le marché. Des études ultérieures ont confirmé l'activité anti-apoptotique de l'imiquimod *in vivo* dans d'autres tumeurs telles que des métastases cutanées de mélanome (Schön, 2004b).

*Nos résultats sont proches à la fois de ceux de Spaner et al. qui ont rapporté une activation cellulaire des cellules de LLC-B stimulées avec un agoniste de TLR-7, à une concentration proche de la plus faible concentration que nous avons testée, et de ceux de Schön et al., qui montrent un effet pro-apoptotique de l'imiquimod utilisé à de plus fortes concentrations.*

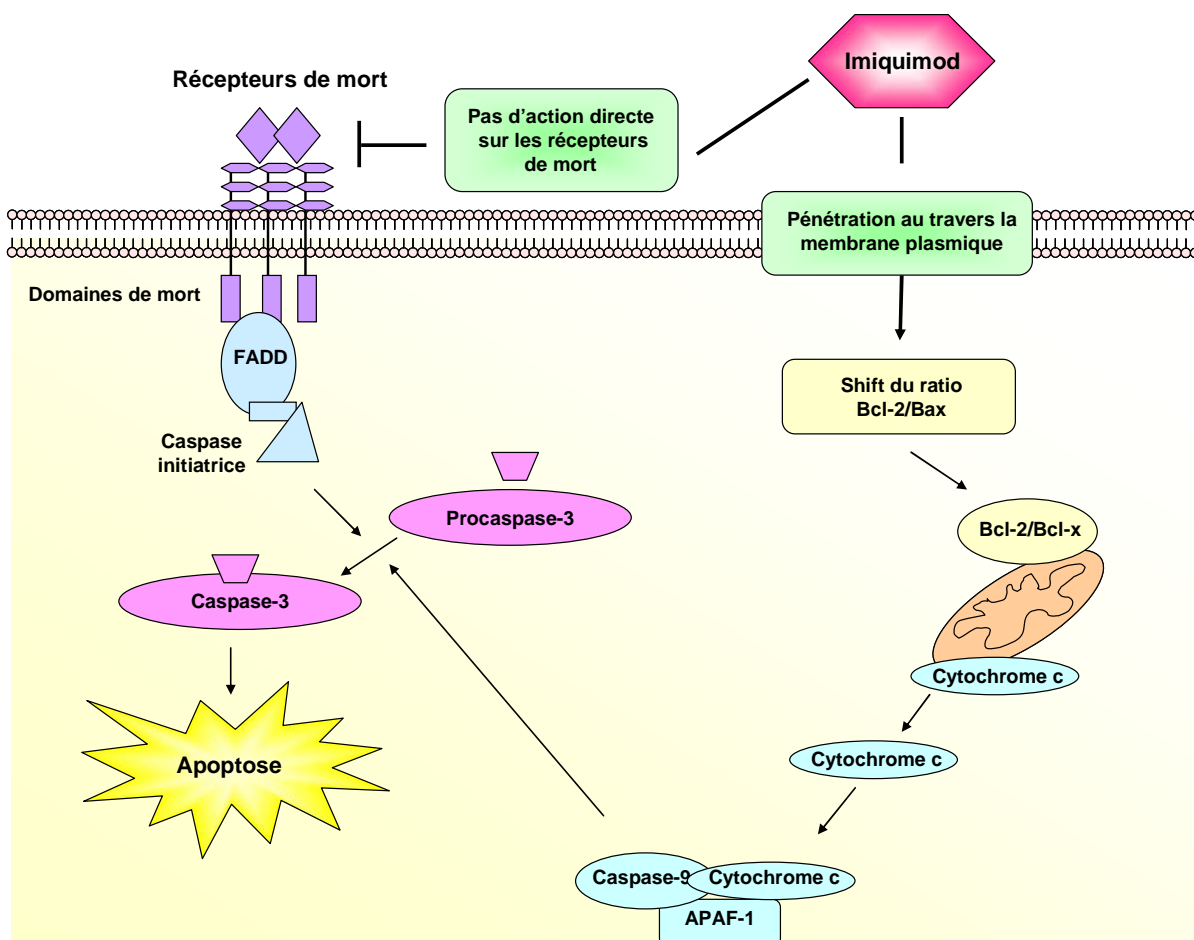
Les médicaments cytostatiques sont capables d'induire l'apoptose via deux voies majeures. La première, appelée voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, implique l'activation des récepteurs du ligand FAS (FAS/APO-1/CD95), de TNF- $\alpha$  ou des récepteurs TRAIL qui appartiennent à la superfamille des gènes du récepteur au TNF (Kaufmann, 2000). La seconde, appelée voie intrinsèque ou voie mitochondriale, est dépendante du relargage du cytochrome c mitochondrial (Sun, 1999 ; Dirsch, 2001, Kaufmann, 2000).

L'effet pro-apoptotique de l'imiquimod pourrait être expliqué par son action directe, via la voie extrinsèque, sur les récepteurs de mort initiant la cascade de transduction du signal apoptotique.

Schön et al. (2004a) ont rapporté que des cellules de mélanomes stimulées pendant 48 heures avec 50 µg/mL d'imiquimod présentent une augmentation de l'apoptose similaire à celle obtenue avec TRAIL, ligand naturel des récepteurs TRAIL, ou des anticorps agonistes

de FAS/APO-1/CD95. Toutefois, aucune altération de l'expression de ces récepteurs de mort n'a été relevée au niveau de ces lignées de cellules tumorales stimulées avec l'imiquimod (Schön, 2003 ; Schön, 2004b). De plus, l'utilisation d'anticorps antagonistes dirigés contre ces récepteurs, capables de bloquer leurs fonctions, inhibe complètement l'apoptose médiée par les ligands naturels dans des lignées cellulaires tumorales dérivées de kératinocytes alors que l'effet pro-apoptotique de l'imiquimod n'est pas altéré (Schön, 2004a).

L'imiquimod pourrait donc être capable de contourner le signal de transduction initié par les récepteurs de mort, et pourrait agir en aval des interactions moléculaires conduisant à l'activation de la cascade des caspases et donc à la mort cellulaire (figure 72).



**Figure 72 :** Représentation schématique des mécanismes à l'origine de l'activité pro-apoptotique de l'imiquimod (adapté de Schön, 2004a)

Il a en effet été rapporté que l'apoptose induite par l'imiquimod est complètement abolie

après inhibition des caspases dans des lignées tumorales épithéliales et de mélanomes. De plus, une activation de la caspase 3 a été détectée dans des cellules tumorales traitées avec l'imiquimod mais pas avec le resiquimod, qui est un autre agoniste de TLR-7 (Schön, 2003 ; Schön, 2004b). L'imiquimod pourrait donc influencer des voies de signalisation complémentaires de l'apoptose comme le relargage du cytochrome c mitochondrial, de la mitochondrie vers le cytosol. Le cytochrome c ainsi libéré peut s'associer à la protéine régulatrice APAF-1, et à la procaspase-9, proenzyme inactif de la caspase-9, pour former l'apoptosome (Hengartner, 2000). La caspase-9 est alors activée et clive la pro-caspase-3, qui conduit à l'activation de la caspase-3 jouant le rôle de protéase "effectrice". Ceci entraîne alors le clivage des substrats de mort conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Zou, 1999).

Une inhibition de la caspase-9 au niveau de cellules tumorales entraîne une diminution de l'effet pro-apoptotique de l'imiquimod ce qui est concordant avec l'hypothèse que la voie de signalisation mitochondriale médiée par la caspase-9 serait impliquée dans l'activité pro-apoptotique de l'imiquimod. De plus, la cinétique de cette translocation est compatible avec l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN cellulaire (Schön, 2003 ; Schön, 2004b).

Les protéines de la famille Bcl-2 sont capables de moduler cette voie de signalisation en amont de l'activation de la phase exécutive faisant intervenir les caspases. La famille de protéines Bcl-2 comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bak, Bad, Bid ou Bim, qu'anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-XL (Raisova, 2001). Dans des cellules de mélanome cultivées avec de l'imiquimod, on observe un ratio Bcl-2/Bax nettement orienté vers la protéine Bax (Schön, 2004b), suggérant un biais pro-apoptotique. Ces résultats sont confortés par le fait qu'une surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 induit, au niveau de lignées cellulaires de kératinocytes immortalisées ou de mélanomes, une suppression nette de l'apoptose normalement observée après traitement par l'imiquimod. De plus, des cellules de mélanome exprimant constitutivement de forts taux de Bcl-2 apparaissent résistantes à l'apoptose induite par l'imiquimod (Schön, 2004b). Ces observations suggèrent donc que l'imiquimod est capable d'activer la voie mitochondriale et que l'apoptose engendrée est dépendante des protéines de la famille Bcl-2 (figure 72).

D'autres travaux ont rapporté que l'imiquimod peut moduler les voies de signalisation faisant intervenir STAT-1 (Dockrell, 2001). Il s'agit d'un autre mécanisme pouvant contribuer à l'effet pro-apoptotique de l'imiquimod puisque STAT-1 joue un rôle dans l'induction de l'apoptose de nombreux types cellulaires (Stephanou, 2005).

Il a également été rapporté que la stimulation de TLR-7 conduit à l'activation des MAP-Kinases ou du facteur de stimulation NF- $\kappa$ B. Or, les voies des MAPKs p38 et JNK sont principalement impliquées dans la transduction de signaux apoptotiques. Ainsi, la voie p38 intervient dans l'apoptose induite par Fas (Juo, 1997). De plus, l'une des fonctions de JNK serait d'activer la kinase pro-apoptotique ASK1 (Chen, 1999). Parmi les activités pléiotropes de NF- $\kappa$ B existe également une capacité d'induction de la transcription des protéines pro-apoptotiques de la famille bcl-2.

*L'imiquimod R837 pourrait donc induire l'apoptose des cellules B, indépendamment de TLR-7, via la voie mitochondriale ou via STAT-1, ou après engagement de TLR-7, via les voies de signalisation aboutissant à l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPKs.*

### **Les ODN CpG M362 induisent une forte expression des signaux de coactivation et de costimulation équivalente ou supérieure à celle du PMA**

Des ODN synthétiques contenant des motifs CpG peuvent être utilisés pour mimer les interactions naturelles entre de l'ADN bactérien et TLR-9. Compte tenu de leur fort pouvoir immunostimulant, ces ODN CpG ont été utilisés, comme adjuvants, avec succès, dans des modèles animaux d'infection, de vaccins ou d'allergie (Weiner, 2000). Ces produits sont actuellement en cours d'investigations chez l'homme.

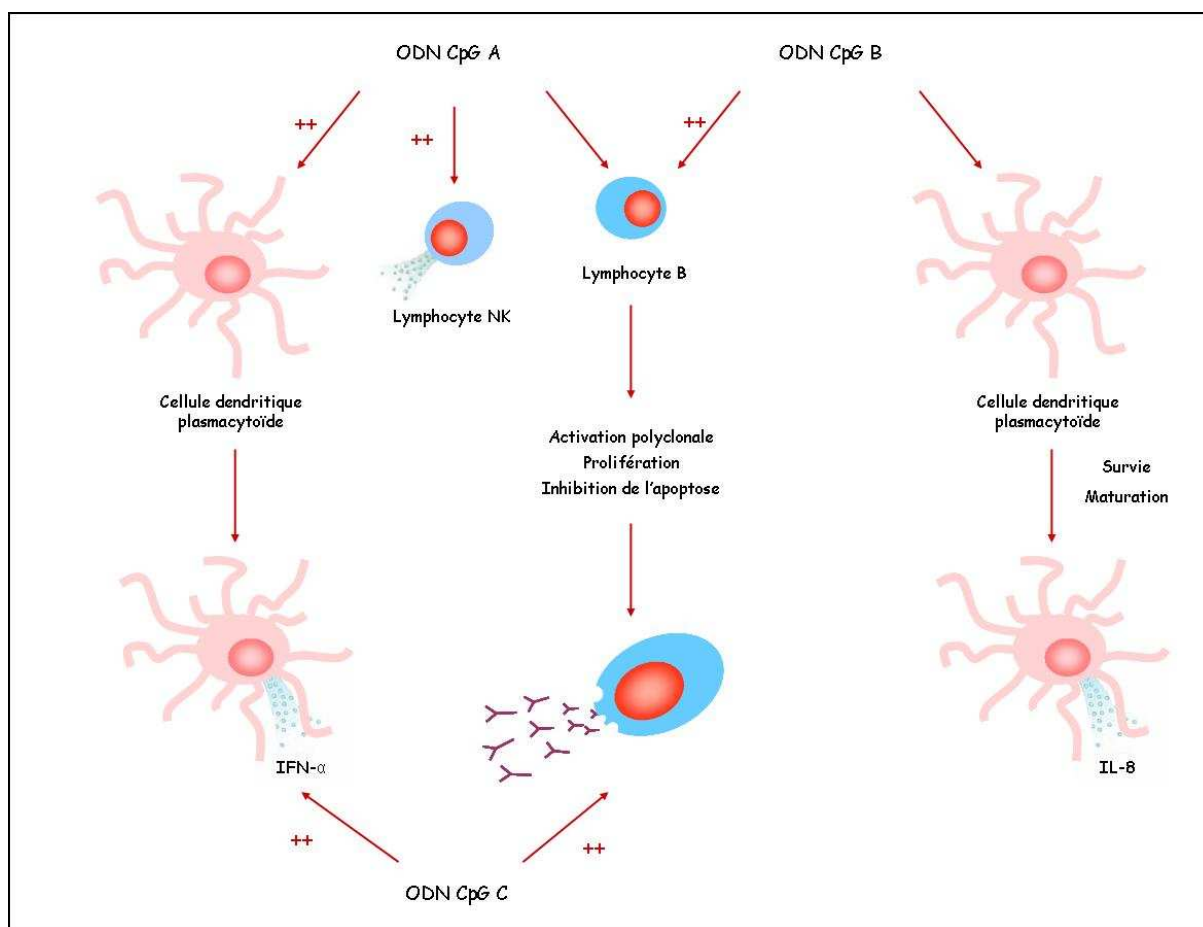
En oncologie, de nombreuses publications rapportent le rôle de l'injection de ces ODN CpG seuls dans la régression de tumeurs solides chez l'homme (Carpentier, 2003). Des essais cliniques de phase I, II ou III ont également été réalisés en les utilisant comme adjuvants de vaccins ou en thérapie combinée, pour induire des réponses immunes innées et adaptatives dans différentes pathologies qui vont de l'allergie au cancer en passant par les infections virales (Krieg, 2006). De plus, il a été montré que ce ligand de TLR-9 constituait l'adjuvant le plus efficace pour l'induction de réponses immunitaires TH1 cytotoxiques comportant la production de lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques de l'antigène (Miconnet, 2002 ; Zwaveling, 2002). Ces premières données montrent que les ODN CpG sont bien tolérés chez l'homme, et les résultats encourageants obtenus soulignent l'intérêt de leur utilisation en immunothérapie.

Au moins trois classes distinctes d'ODN CpG ont été décrites (Kerkmann, 2003 ; Klinman, 2004).

Les ODN CpG de type "K" ou "B", tels que l'ODN CpG 2006, sont les plus anciennement connus et classiquement utilisés. Ils ont la capacité d'activer les cellules B. Ils n'induisent qu'une faible sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules dendritiques plasmacytoïdes mais favorisent leur survie, leur maturation et la sécrétion d'IL-8. Ils comportent de multiples motifs CpG, et leur structure est stabilisée par un squelette phosphorothioate.

Les ODN CpG de type "D" ou "A", tels que les ODN CpG 2336 et CpG 2216, possèdent une plus faible capacité à activer les cellules B, mais une plus forte capacité à induire la production d'IFN de type I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ils sont également capables d'induire une forte activation des cellules NK. Ils contiennent un seul motif CpG, et leur activité requiert un squelette composé d'un mélange phosphodiester-phosphorothioate.

Les ODN CpG de type "C", tels que l'ODN M362, combinent les effets des ODN de type "B" et "A" : ils sont capables d'induire la production d'IFN de type I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes ainsi que d'activer des cellules B. Ils sont constitués d'un squelette phosphorothioate avec des motifs CpG multiples et des dimères TCG en 5'. La séquence la plus puissante est appelée M362 et contient un motif palindromique central avec des dinucléotides CG, ce qui est une caractéristique du type A, et un motif "TCGTCG" à l'extrémité 5', structure présente dans les ODN CpG de type "B" (Jurk, 2004) (figure 73).



**Figure 73** : Représentation schématique des effets induits par les différents types d'ODN CpG sur les cellules du système immunitaire humain

Les ODN CpG M362 avec lesquels nous avons choisi de stimuler les cellules B sont des ODN de type "C".

Dans ce travail, nous avons montré que les ODN GpC M362, utilisés comme contrôles négatifs des ODN CpG M362, entraînent, au niveau des cellules B de LLC, une augmentation de l'expression des marqueurs de coactivation et de présentation étudiés, augmentation toutefois moindre par rapport à celle observée pour les ODN CpG M362. Ces ODN contrôles induisent également, comme pour les ODN CpG, une protection de l'apoptose des cellules tumorales. D'autres études ont rapporté un effet des ODN non-CpG contrôles sur différents types cellulaires (Latz, 2004 ; Yasuda, 2005 ; Saegusa, 2007). Il a été suggéré que TLR-9 présenterait une "faible affinité" pour les ODN non-CpG, qui est convertie en une liaison de "forte affinité" après introduction de motifs CpG. Les ODN non-CpG seraient donc de



"faibles" immunostimulants (Saegusa, 2007).

La stimulation des cellules B saines provenant d'amygdales palatines avec cet ODN entraîne, au niveau de ces cellules, une augmentation de l'expression de HLA-DR, CD40, CD54 et CD58 et à un moindre degré des autres des marqueurs de costimulation.

A notre connaissance peu d'études se sont intéressées à l'effet de la stimulation des cellules B via des ODN de type "C". Les travaux de la littérature cités ci-après afin de discuter nos résultats concernent la stimulation de cellules B via les ODN de type "B".

Les ODN CpG de type "B" sur les cellules B humaines normales induisent une activation des marqueurs de costimulation et de co-activation ce qui est concordant avec nos résultats. Ainsi, Gantner et al. (2003) ont montré une surexpression des marqueurs d'activation CD40, CD54, CD80, CD86 et HLA-DR après stimulation de cellules B saines provenant d'amygdales palatines (Gantner, 2003). Il a également été rapporté une augmentation de l'expression de HLA-DR (Mansonn, 2006) ainsi que de CD40 et CD86 (Bauer, 1999) au niveau de cellules B amygdaliennes mises en culture avec des ODN CpG 2006. Hartmann et al. (2000) ont rapporté des résultats similaires après activation de cellules B saines du sang périphérique avec des ODN CpG, caractérisés par une surexpression des marqueurs CD40, CD54, CD80, CD86 et des molécules de classe II du CMH (Hartmann, 2000).

Après stimulation des cellules de LLC-B avec les ODN CpG M362, nous avons observé une augmentation de l'expression de tous les marqueurs d'activation, plus importante que pour les cellules B saines, une survie prolongée de ces cellules tumorales ainsi qu'une prolifération tardive.

Peu d'équipes se sont attachées à l'étude de l'activation des cellules B de LLC-B par les ODN CpG. Ces rares travaux ont également montré, par cytométrie de flux, une surexpression des marqueurs de costimulation et de présentation antigénique après stimulation pendant 48 heures avec 5 µg/mL d'ODN CpG 2006 (Jahrsdörfer, 2001 ; Jahrsdörfer, 2005b), ou avec 2 µg/mL d'ODN DSP30 (Decker, 2000a) ce qui est concordant avec nos résultats. Toutefois, Decker et al. (2000a) ont rapporté, après marquage à la thymidine tritiée, une prolifération des cellules tumorales dès 3 jours de culture avec des ODN de type "B". Jahrsdörfer et al. (2001 et 2005b) ont également relevé, grâce à un marquage au CFSE, une prolifération des cellules B de LLC après 4 jours de stimulation avec les ODN CpG 2006, prolifération qui est suivie par une mort programmée des cellules par apoptose (Jahrsdörfer, 2005b).

Plusieurs études ont montré que les ODN CpG sont capables d'augmenter la survie de cellules B murines. Ainsi, Yi et al. ont rapporté que les ligands de TLR-9 protègent les cellules murines de lymphomes B de l'apoptose (Yi, 1996 ; Yi, 1998 ; Han, 1999). Cet effet anti-apoptotique est associé à une augmentation de l'activité p50/c rel de NF- $\kappa$ B et au maintien du taux du proto-oncogène c-myc (Yi, 1995 ; Yi, 1998) et donc à la régulation de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Lee, 1999 ; Nilsson, 2003). De plus, c-myc peut contribuer au maintien de la phosphorylation d'Akt qui, comme déjà mentionné plus haut, un rôle essentiel dans la survie cellulaire (Bellmann, 2006). Des ODN CpG de type B ont également un effet anti-apoptotique au niveau de cellules B murines matures, de par le maintien de l'expression de NF- $\kappa$ B (Yi, 1998) ou en bloquant la perte spontanée du potentiel de membrane mitochondrial (Yi, 1999). Il a également été rapporté que les ODN CpG peuvent protéger les cellules B de l'apoptose médiée par Fas en régulant de façon négative l'expression de ce récepteur de mort sur les cellules B murines (Wang, 1997).

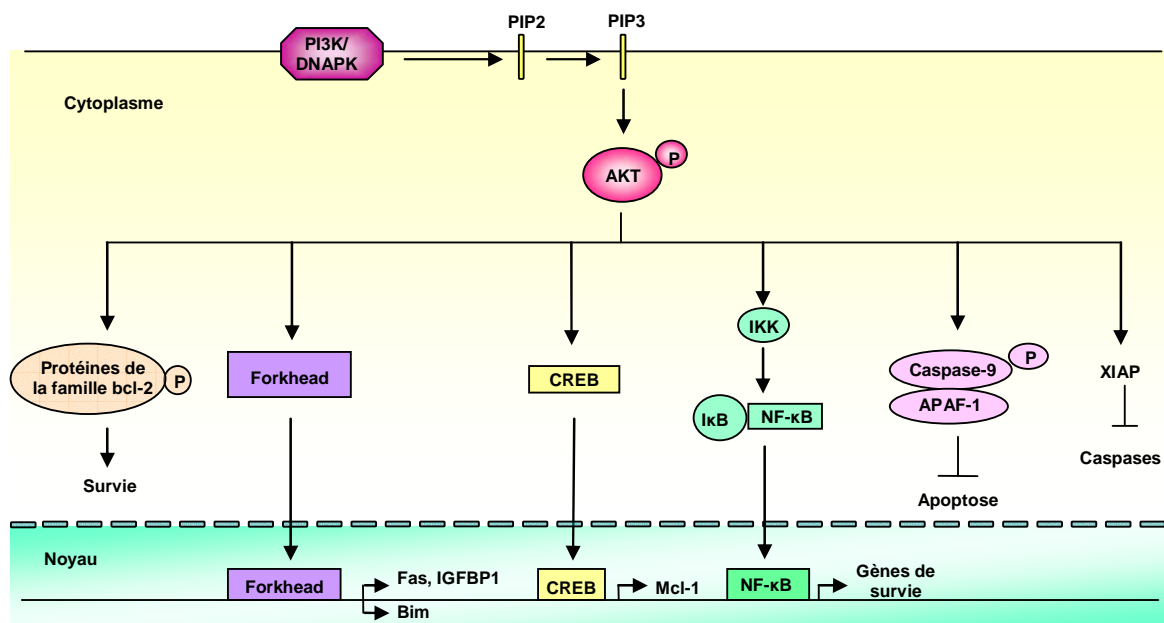
Une synthèse des données disponibles montre que l'engagement des agonistes spécifiques de TLR-9 induit une activation d'une part des MAPKs, notamment de ERK, p38, et JNK, et d'autre part de NF- $\kappa$ B, IRF-5 et IRF-7.

La protéine Akt a également été rapportée comme étant activée après stimulation avec les ODN CpG (Dragoi, 2005 ; Sester, 2006). Les voies de signalisation conduisant à l'activation de cette protéine via les ODN CpG ne sont toutefois pas claires. Il a été suggéré que l'activation d'Akt en réponse aux ODN CpG serait indépendante de TLR-9 : la protéine DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), une sérine/thréonine kinase de la famille des PI3K-like, induirait directement la phosphorylation et l'activation d'Akt (Dragoi, 2005). Toutefois, ces résultats sont controversés. En effet, Sester et al. (2006) ont montré que les ODN CpG induisent la survie de macrophages murins via TLR-9 et la voie PI3K/Akt, indépendamment de la protéine DNA-PK.

La protéine Akt joue un rôle primordial dans la régulation de la prolifération et de la survie des cellules normales et cancéreuses (Osaki, 2004). Les protéines de la famille des PI3Ks ou des PI3K-like activées convertissent le PIP2 en PIP3 (phosphatidyl inositol triphosphate) ce qui aboutit à l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt également nommée protéine kinase B ou PKB. L'activation de cette protéine kinase induit la phosphorylation de protéines cibles de la famille Bcl-2 telles que la protéine pro-apoptotique Bad ou la protéine anti-apoptotique Mcl-1 qui peuvent ainsi respectivement être inhibée ou surexprimée (Datta, 1997 ; Liu, 2001 ; Maurer, 2006). Akt peut également inactiver les

facteurs de transcription de la famille Forkhead tels que AFX et FKHL1 qui possèdent des sites consensus de phosphorylation conservés pour Akt. Ces facteurs participent normalement à l'activation de la transcription de gènes codant des protéines pro-apoptotiques telles que le ligand de Fas, IGFBP-1 (insulin-like growth factor-binding protein-1) et Bim (protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2) (Datta, 1999). Il a par ailleurs été rapporté que Akt est capable d'activer le facteur de transcription CREB (cyclic AMP-response element-binding protein) qui est impliqué dans l'augmentation de transcription de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 (Datta, 1999). Akt peut également inhiber l'apoptose en phosphorylant directement la caspase-9 ou en induisant l'expression de régulateurs négatifs de l'apoptose tels que XIAP (Xlinked inhibitor of apoptosis protein) (Cardone, 1998 ; Dan, 2004 ; Hu, 2004 ; Uddin, 2006) (figure 74).

Une autre voie de signalisation cellulaire qui est impliquée dans la survie cellulaire et activée par les ODN CpG est celle de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. En effet, l'activation de NF- $\kappa$ B conduit à sa translocation dans le noyau où il active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ou l'inhibition de l'apoptose (Lee, 1999). Par ailleurs, d'autres études ont montré que la protéine Akt peut augmenter l'expression des gènes cibles de NF- $\kappa$ B telles que Bcl-XL et A1, en activant IKK et en induisant ainsi la dégradation de I $\kappa$ B (Suzuki, 2003 ; Song, 2004) (figure 74).



**Figure 74** : Représentation schématique de l'implication de la voie PI3K ou DNA-PK / Akt dans la survie cellulaire (adapté de Datta, 1999)

Akt est capable de moduler de nombreuses protéines intervenant dans la prolifération. En effet, elle peut inhiber le GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) ce qui induit une voie de signalisation qui aboutit à l'expression de la cycline D1. Cette cycline permet alors d'induire la progression du cycle cellulaire. La kinase Akt peut également phosphoryler P21/Waf1/Cip1 et p27Kip2 ce qui permet d'inhiber leur effet anti-prolifératif en empêchant notamment l'inhibition du complexe cycline D1/CDK4 (cyclin-dependent kinase 4). De la même manière, Akt peut augmenter la phosphorylation de mTOR (mammalian target of rapamycin). La protéine mTOR ainsi phosphorylée induit la traduction de la cycline D (Osaki, 2004).

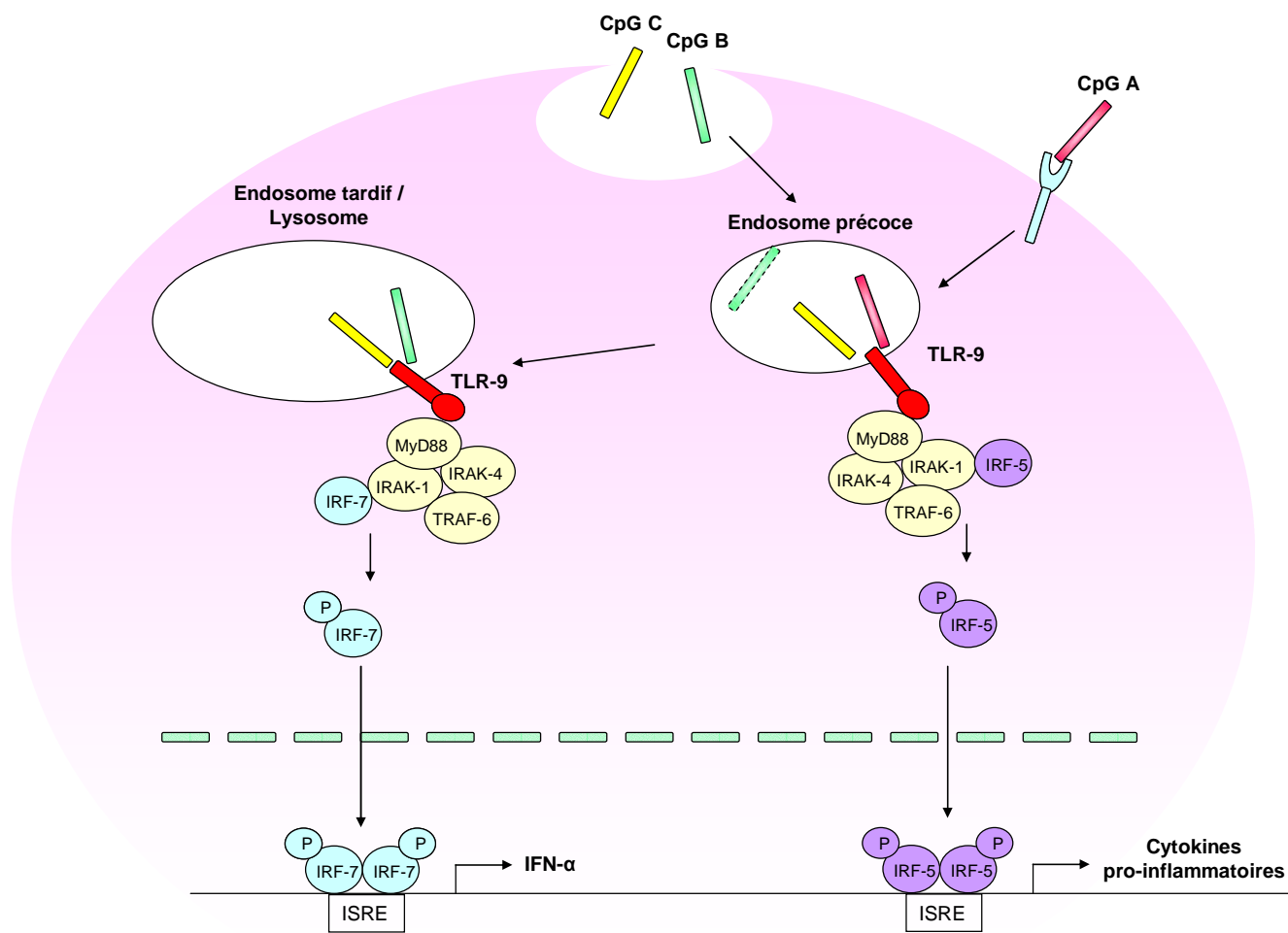
La voie de signalisation Raf/MEK/ERK, activée par les ODN CpG via TLR-9, peut également contrôler l'expression de nombreuses protéines essentielles pour la survie et la prolifération cellulaire. Ainsi, ERK peut être impliqué dans la régulation de Bim, qui est une autre protéine pro-apoptique de la famille des protéines Bcl-2 (Harada, 2004). ERK augmente la transcription du gène de la cyclin D1 et facilite également la formation de complexes actifs cycline D1/CDK4 (Cheng, 1998 ; Matsushima, 1994 ; Lavoie, 1996) favorisant ainsi la prolifération cellulaire. Il a également été montré que p27 peut être phosphorylée *in vitro* par ERK. Cette phosphorylation peut jouer un rôle dans la dégradation de p27Kip1 et/ou réguler sa capacité de lier CDK2 (Kawada, 1997 ; Nguyen, 1999 ; Yin, 1999 ; Bastians, 1998 ; Alessandrini, 1997) qui favorise l'entrée dans la phase S.

***Les ODN CpG entraînent une activation cellulaire et une augmentation de la survie des cellules B normales et tumorales. Cet effet anti-apoptotique peut être la conséquence d'une activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, de la voie Ras-Raf-MEK-ERK, ou encore de la protéine Akt. L'activation d'ERK et de Akt peuvent également expliquer la prolifération tardive que nous avons observée au niveau des cellules B saines et tumorales.***

La réponse des cellules B de LLC-B à la stimulation via les ODN CpG est hétérogène. Dans plusieurs études portant sur un petit échantillon de patients, il a été rapporté une prolifération des cellules tumorales dans la moitié des cas (Decker, 2002 ; Jahrsdörfer, 2005b). Toutefois, une induction de l'apoptose a également été observée dans certains cas, ce qui indique que la stimulation de ces cellules de LLC-B via les ODN CpG a un effet pléiotropique sur la prolifération et l'apoptose (Jahrsdörfer, 2005a ; Jahrsdörfer, 2005b).

La découverte et l'identification des motifs CpG hypométhylés comme ligands de TLR-9 est récente (Bauer, 2001). Aussi, les données de la littérature sont relativement pauvres concernant les voies de signalisation de TLR-9 chez l'homme. En effet, la plupart des études se sont attachées à étudier ces voies de signalisation dans des cellules murines, qui, par l'utilisation de souris "knock-out" se prêtent plus facilement à l'analyse des voies de transduction du signal, mais il n'est pas certain que ces résultats puissent être complètement étendus à l'homme. En effet, le profil d'expression des TLRs varie entre les espèces. Par exemple, le TLR-9 murin est exprimé non seulement au niveau des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des cellules B comme le TLR-9 humain, mais également au niveau des monocytes et des cellules dendritiques myéloïdes. De plus, selon les espèces, les séquences optimales des motifs CpG sont différentes. Ces séquences sont respectivement 5'-GTCGTT-3' et 5'-GACGTT-3' chez l'homme et la souris (Wagner, 2004). Il est donc difficile de prévoir précisément les effets de l'activation de TLR-9 chez l'homme en extrapolant les résultats obtenus chez la souris (Iwasaki, 2004).

Une étude sur la localisation des différents types d'ODN CpG, au niveau de cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines, a montré que les ODN de type "A", qui sont capturés par le récepteur scavenger CXCL16 (Gursel, 2006), sont ensuite retenus dans les endosomes où ils sont capables d'induire la production d'IFN- $\alpha$  via une voie de signalisation faisant intervenir MyD88 et IRF-7. Par contre, après internalisation dans un compartiment endosomal, les ODN de type "B" sont rapidement transférés et dégradés dans le lysosome où ils induisent en majorité la production de TNF- $\alpha$  via des voies de signalisation faisant intervenir les facteurs MyD88 et IRF-5 (Honda, 2005). Les ODN de type "C" sont quant à eux distribués dans les deux types d'endosomes (Guiducci, 2006). Les différents effets biologiques observés dans la littérature dépendent donc fortement de la nature des ligands qui est essentielle pour orienter leur localisation intracellulaire (figure 75).



**Figure 75** : Représentation schématique des différentes réponses activées après stimulation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par différents types d'ODN CpG

Les différences observées entre les résultats obtenus dans la littérature peuvent également refléter les caractéristiques de la LLC-B qui constitue une pathologie hétérogène sur les plans clinique et biologique. Une prolifération plus importante a été rapportée pour les cellules B de LLC-B stimulées avec des ODN CpG provenant de patients présentant des délétions 17p et 11q (Jahrsdörfer, 2005a). De plus, récemment, Longo et al. (2007) ont rapporté une prolifération plus importante des cellules B de LLC-B présentant des gènes IgVH non mutés qui serait due à une augmentation de l'activation de la protéine Akt médiée par les motifs CpG (Longo, 2007). Ces résultats sont particulièrement intéressants car les délétions impliquées, ainsi que le statut non muté des gènes IgVH sont actuellement reconnus comme des facteurs de mauvais pronostic de cette maladie (Damle, 1999 ; Döhner, 2000). Il

est ainsi possible de formuler l'hypothèse que la surexpression de TLR-9 dans les LLC-B pourrait être directement impliquée dans la physiopathologie d'une affection caractérisée par de nombreuses infections, et donc par un contact potentiel chronique avec des antigènes d'origine bactérienne. La surexpression de TLR-9 contribuerait ainsi au maintien du clone malin, voire à sa prolifération plus agressive en présence de co-facteurs associés à une augmentation du signal transmis par TLR-9, tels que 17p- et/ou le statut non muté.

Après stimulation avec les ligands respectifs de TLR-7 et TLR-9, les cellules B saines présentent une surexpression des marqueurs de coactivation et de costimulation modérée et de même ordre de grandeur. Les résultats concernant l'apoptose mettent également en évidence un comportement similaire des cellules B saines stimulées avec l'imiquimod et les ODN CpG.

En revanche, une activation cellulaire plus importante a été observée au niveau des cellules B tumorales stimulées avec les ODN CpG par rapport aux cellules B tumorales stimulées avec l'imiquimod. L'engagement de TLR-9 induit par ailleurs une survie des cellules tumorales alors que les plus fortes concentrations d'imiquimod entraînent une apoptose rapide et importante de ces cellules.

### **La stimulation par les TLRs module différemment le profil de sécrétion cytokinique des cellules B saines ou de LLC**

La sécrétion de onze cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$ ) a été examinée au niveau des surnageants de culture des suspensions cellulaires saines ou tumorales stimulées ou non. Ceci avait pour objet de caractériser l'environnement cytokinique généré *ex vivo* par les cellules B de LLC-B et les modifications induites par leur modulation. Il faut noter que le milieu de culture utilisé, supplémenté par de l'Ultrosor comme apport de facteurs trophiques complémentaires, est dépourvu de sérum donc de cytokines pouvant potentiellement interférer avec les dosages. Ceci renforce la significativité des résultats observés. Il faut toutefois noter que la séparation cellulaire permettant d'obtenir des suspensions lymphocytaires prive certainement les cellules B de LLC de facteurs micro-environnementaux qui les entourent *in vivo*. La significativité

essentielle de ce travail réside donc dans la comparaison de la sécrétion cytokinique "de base" à celle observée après modulation des TLRs.

Les dosages des cytokines ont été réalisés grâce au kit "FlowCytomix human Th1/Th2 11plex Kit" en cytométrie de flux. Cette technique, de mise en oeuvre rapide, offre la possibilité d'identifier et de quantifier simultanément 11 cytokines, dans un faible volume d'échantillon, avec une meilleure reproductibilité et une meilleure sensibilité qu'un dosage ELISA (Morgan, 2004). Une des limites de cette méthode, récurrente à toute méthode de quantification, est l'absence de standards internationaux. En effet, chaque technologie possède ses propres calibrateurs et variations inter-lots, ce qui peut rendre difficiles les comparaisons, d'une part entre ces méthodes, et, d'autre part, avec les techniques ELISA traditionnelles. Toutefois, l'utilisation homogène de cette technique permet une appréciation comparative de profils cytokiniques par essence complexes.

L'IL-1 $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire capable d'augmenter la prolifération des cellules B et de favoriser la synthèse d'immunoglobulines. De plus, une de ses plus importantes activités biologiques est sa capacité à activer les lymphocytes T en augmentant la production de l'IL-2 et l'expression membranaire des récepteurs à l'IL-2 sur ces cellules (Borish, 2003).

L'IL-2 induit, d'une manière générale, l'expansion clonale des lymphocytes T (Th1 et Th2) et active les fonctions des cellules cytotoxiques.

Les cytokines pro-inflammatoires IL-4 et IL-5 favorisent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et leur sécrétion d'immunoglobulines. La production d'IL-4 a un effet autocrine sur les lymphocytes Th2 en favorisant leur prolifération. Elles sont également impliquées dans le switch IgE.

L'IL-6, est une cytokine pro-inflammatoire produite par une grande variété de cellules dont les lymphocytes B. Sous l'influence de cette cytokine, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes et sécrètent des immunoglobulines. L'IL-6 favorise également l'orientation de lymphocytes naïfs T CD4<sup>+</sup> vers le des cellules activées de profil cytokinique Th2 en induisant la production initiale d'IL-4 par ces cellules ou en inhibant la production d'IFN- $\gamma$  et donc la réponse Th1 (Diehl, 2002).

L'interleukine-8 est une cytokine pouvant être sécrétée par un très grand nombre de cellules incluant les monocytes, les macrophages, les lymphocytes, mais également les cellules non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales ou endothéliales (Taub, 1996).



Elle a été initialement identifiée comme une molécule chimioattractive pour les neutrophiles. Il a également été rapporté que l'IL-8 est capable d'attirer des lymphocytes T mais ces résultats restent controversés (Taub, 1996).

L'IL-10 est produite par les lymphocytes Th2 et TR1 (T regulatory cell 1), les lymphocytes B et les macrophages. Elle joue un rôle immunomodulateur essentiel en régulant négativement la réponse Th1. Il s'agit en effet d'une cytokine immunosuppressive capable d'inhiber la production de diverses cytokines Th1 en régulant de façon négative les fonctions des cellules présentatrices d'antigènes (Moore, 2001). L'activation des cellules T est également bloquée en raison de l'inhibition par l'IL-10 de la production d'IL-2 (Hatanaka, 2000). En outre, l'activation de lymphocytes T en présence d'IL-10 peut induire un état anergique irréversible et ce, même en présence d'IL-2, après une stimulation par des anticorps anti-CD3 ou anti-CD28. L'anergie médiée par l'IL-10 semble associée à l'induction d'une population de lymphocytes T régulateurs produisant de forts taux d'IL-10 (TR1) et pouvant inhiber les réponses spécifiques d'antigènes *in vitro* et *in vivo*. En inhibant la production d'IL-12 et l'expression de molécules de costimulation par différents types de cellules dendritiques, l'IL-10 peut aussi inhiber des réponses T allogéniques (Moore, 2001).

L'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  promeuvent la différenciation Th1. Ainsi, l'IL-12 qui est normalement dérivée des monocytes et des macrophages mais également des cellules B et des cellules dendritiques (Borish, 2003) induit la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th1 ainsi que la production d'IFN- $\gamma$  par ces cellules et par les lymphocytes NK (Yap, 2000). L'IFN- $\gamma$  quant à lui joue un rôle primordial dans l'immunité à médiation cellulaire. Il active en effet les neutrophiles et les cellules NK qui sont capables de cytotoxicité envers des cellules modifiées comme les cellules infectées par des virus ou des bactéries intracellulaires et les cellules tumorales (O'Connor, 2005). De plus, il induit une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classes I et II (Borish, 2003).

Le TNF- $\alpha$  et le TNF- $\beta$  (également appelé lymphotoxine- $\alpha$ ) sont deux protéines homologues capables de se lier aux mêmes récepteurs. Elles sont sécrétées par diverses cellules du système immunitaire dont les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK ainsi que par les cellules endothéliales. Le rôle premier du TNF consiste en l'induction directe de l'apoptose de diverses cellules tumorales de par ses effets cytotoxiques (Borish, 2003). En outre, la production de TNF- $\alpha$  augmente l'efficacité de la réponse immune anti-tumorale des lymphocytes T, en particulier en augmentant la sécrétion de l'IL-2 indispensable à l'activation et à la prolifération des cellules T (Matanic, 2003). Le TNF active également de nombreux

types cellulaires comme les lymphocytes, les monocytes, les macrophages, les cellules épithéliales et mésenchymateuses, lesquelles produisent alors des cytokines et des substances chimiotactiques (Akira, 1993). Sous son influence, les lymphocytes B produisent des anticorps et les lymphocytes T des cytokines pro-inflammatoires. Il est également un puissant activateur des polynucléaires neutrophiles en induisant le chimiotactisme, l'adhérence et la dégranulation de ces cellules, et la mise en place des phénomènes du stress oxydatif (Borish, 2003).

Un grand nombre de cytokines ont été retrouvées ici dans les surnageants de culture des suspensions de cellules amygdaliennes non stimulées. Ainsi, une très forte production d'IL-8 a été observée ainsi qu'une plus faible production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$ . Des taux significatifs d'IL-1 $\beta$ , d'IL-2, d'IL-4, d'IL-10 et d'IFN- $\gamma$  ont également été notés, témoignant de la complexité des réponses immunitaires muqueuses permanentes dans ce tissu. La présence, dans les suspensions cellulaires non triées utilisées, de lymphocytes T capables de sécréter eux-mêmes des cytokines, et donc de stimuler les lymphocytes B peut expliquer la grande diversité des cytokines produites à l'état basal.

La stimulation des cellules B amygdaliennes avec le PMA induit une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$ . Elle augmente également la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , et à un moindre degré d'IL-2. Par contre, le PMA n'induit qu'une faible augmentation d'IL-10, suggérant que cet activateur favorise les réponses pro-inflammatoires, sans que la contrepartie régulatrice soit favorisée.

Les ODN CpG et l'imiquimod R837 entraînent tous deux une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  et des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ . Il existe parallèlement une augmentation de la production d'IL-10 témoignant d'une tentative de régulation. Une légère augmentation de la sécrétion d'IL-2, d'IL-1 $\beta$ , et de TNF- $\beta$  a également été mise en évidence dans les surnageants de culture des cellules B amygdaliennes. Il semble donc qu'à l'instar du PMA, ces ligands des TLRs orientent les réponses cellulaires vers un profil pro-inflammatoire, éventuellement propice à la génération de réponses cellulaires, potentiellement anti-tumorales.

Ceci est confirmé par la production concomitante d'IFN- $\gamma$ , témoin de réponses TH1, et d'IL-10, tentant de les inhiber, après stimulation avec le PMA, les ODN CpG et l'imiquimod. Par ailleurs, l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 par les cellules B amygdaliennes indique clairement l'effet pro-inflammatoire et pro-immunitaire de cette réponse.

Il est à noter qu'aucune production d'IL-12 n'a été mise en évidence dans les surnageants de culture des cellules non stimulées, ou après stimulation avec les ligands de TLRs ou avec le PMA.

Chez la souris, plusieurs d'études ont montré que les ODN CpG étaient capables d'induire de fortes réponses Th1. En effet, des cellules B murines stimulées avec des ODN étaient capables de sécréter de l'IL-12 (Wagner, 2002 ; Krieg, 2002). Chez l'homme, par contre, peu d'informations sont disponibles quant à la capacité des ODN CpG à orienter la réponse plutôt vers un profil Th1 ou Th2. Les travaux de Bauer et al. (1999) ont mis en évidence, comme les nôtres, une induction de la sécrétion de l'IL-6 et de TNF- $\alpha$  après stimulation de cellules B amygdaliennes avec des ODN CpG 2006. Cette équipe a toutefois rapporté que ces cellules stimulées produisent également de l'IL-12, contrairement à ce que l'on a observé ici. Ceci peut toutefois s'expliquer par la différence d'ODN CpG utilisés.

L'examen des cytokines présentes dans les surnageants de culture des cellules B de LLC-B non stimulées a mis en évidence une forte sécrétion d'IL-8, suggérant un environnement pro-inflammatoire.

Dans la littérature, les dosages des cytokines dans le contexte de la LLC ont, dans la plupart des cas, été réalisés au niveau sérique. Nos résultats vont toutefois dans le sens des travaux de di Celle et al. (1994) qui ont mis en évidence une production importante d'IL-8 dans des surnageants de culture de cellules B de LLC-B. Cette cytokine induirait l'accumulation de ces cellules B tumorales, en prolongeant leur survie de façon autocrine (di Celle, 1996). Molica et al. (1999) ont par ailleurs rapporté une corrélation entre les taux d'IL-8 sérique et les taux de bcl-2 suggérant ainsi que l'effet anti-apoptotique de cette interleukine pourrait faire intervenir bcl-2.

Nous avons également montré que le PMA entraînait une production importante de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8 par les cellules de LLC-B, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de TNF- $\alpha$ . Toutefois, le PMA induisait également, à un degré moindre, une augmentation de la sécrétion d'IL-10, témoin potentiel, là encore, d'une tentative de régulation.

La stimulation des cellules de LLC-B avec les ODN CpG induit elle aussi une forte sécrétion d'IL-8. Ceci est compatible avec l'idée que la surexpression de TLR-9 par les cellules de LLC-B contribue à l'histoire naturelle de la maladie, potentiellement entretenue par les agents pathogènes responsables des infections de ces patients, et se traduisant par des

taux élevés d'IL-8 *in vivo* (Molica, 1999). Les ODN CpG induisent par ailleurs une augmentation de la production d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et de TNF- $\beta$ . Une induction de la sécrétion de la cytokine immunosuppressive IL-10 a également été notée, comme avec le PMA et témoignant peut être de tentatives de régulation.

Après stimulation avec l'imiquimod R837, nous avons également observé que les cellules de LLC-B produisaient, *in vitro*, d'importantes quantités d'IL-8. Ceci suggère que les ARN bactériens pourraient aussi contribuer à l'histoire naturelle de la maladie. Une production augmentée de TNF- $\alpha$  et de TNF- $\beta$  a également été observée, corroborant l'hypothèse pro-inflammatoire.

Les ODN CpG, l'imiquimod et le PMA n'affectent que très peu la production d'IL-2 et n'induisent pas la production d'IL-12 ni d'IFN- $\gamma$  par les cellules B tumorales. Ces cellules B stimulées semblent donc incapables d'orienter une réponse lymphocytaire T vers un profil Th1. La forte sécrétion d'IL-8 dans les surnageants de culture des cellules stimulées avec le PMA, les ODN CpG et l'imiquimod pourrait jouer un rôle de chimioattractant pour les polynucléaires neutrophiles ou certains lymphocytes T. Enfin, la sécrétion importante de TNF pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la réponse immune anti-tumorale des cellules T.

***L'imiquimod R837 et les ODN CpG M362 orientent les réponses cellulaires vers un profil pro-inflammatoire et pro-immunitaire via la production d'IL-8 et de TNF.***

La comparaison des effets induits par le PMA sur les cellules tumorales par rapport aux cellules normales a montré que cet ester de phorbol stimule de façon beaucoup plus importante la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$  au niveau des cellules B de LLC et à un degré moindre d'IL10. Par contre, la production de TNF- $\beta$  était plus fortement augmentée dans les surnageants de culture des cellules amygdaliennes.

Les ODN CpG M362 entraînent une sécrétion d'IL-8 beaucoup plus importante au niveau des cellules B tumorales. L'IL-6 et le TNF- $\beta$  ont également été retrouvés à de plus fortes concentrations dans les surnageants de culture des cellules de LLC-B. En revanche, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2, l'IL-10, l'IL-4 et le TNF- $\alpha$  sont apparus comme étant plus fortement sécrétés par les cellules saines stimulées avec les ODN CpG.

La production d'IL-8 apparaît fortement augmentée dans les suspensions cellulaires

saines et tumorales stimulées avec l'imiquimod R837. La sécrétion d'IL-2 était également augmentée de la même façon, après stimulation des cellules amygdaliennes et tumorales avec l'imiquimod. Cet agoniste de TLR-7 entraîne une sécrétion d'IL-6 beaucoup plus importante par les cellules d'amygdales palatines par rapport aux cellules de LLC-B. Les productions d'IL-10, d'IL-1 $\beta$  et d'IL-4 sont également induites de façon plus importante dans les surnageants de culture de cellules normales. Par contre, l'imiquimod entraîne une plus forte sécrétion de TNF- $\alpha$  et de TNF- $\beta$  dans les suspensions cellulaires tumorales.

La sécrétion cytokinique observée après stimulation avec les ODN CpG et l'imiquimod peut être expliquée par l'activation de NF- $\kappa$ B et des facteurs de transcription induits par les MAPKs, suite à l'engagement de TLR-7 et TLR-9. En effet, ces facteurs régulent l'expression de gènes codant pour des cytokines ou encore des molécules chimioattractives (Boldrick, 2002).

D'autres travaux ont rapporté que l'imiquimod peut moduler les voies de signalisation faisant intervenir STAT-1 (Dockrell, 2001) ce qui pourrait contribuer à la transcription de cytokines pro-inflammatoires (Bottrell, 1999).

En outre, l'imiquimod pourrait activer directement NF- $\kappa$ B et augmenter l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires indépendamment de TLR-7. Schön et al. (2006) ont ainsi rapporté qu'une lignée immortalisée de kératinocytes humains, HaCaT, n'exprimant aucun TLR, présente une augmentation de l'expression de l'IL-6, de l'IL-8, du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  en présence d'imiquimod. De plus, des cellules mononucléées de souris déficientes pour le gène MyD88, un adaptateur essentiel dans les voies de signalisation médiées par les TLRs, présentent en présence d'imiquimod une surproduction d'IL-1 $\beta$ , même si elle est plus faible que pour des souris exprimant MyD88. L'imiquimod pourrait donc interférer directement avec la voie de signalisation du récepteur de l'adénosine et induire la production de cytokines pro-inflammatoires. Il serait en effet capable de se lier aux récepteurs de l'adénosine et en particulier à A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub>, avec une forte affinité, et ce, à des concentrations proches de celles utilisées dans les études cliniques. De plus, la structure chimique de l'imiquimod ressemble beaucoup à celle de l'antagoniste typique de ces récepteurs qu'est la théophylline (Schön, 2006). L'activation des récepteurs A<sub>2A</sub> par l'adénosine extracellulaire conduit à l'activation de l'adenylyl cyclase, à l'accumulation de l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) et inhibe la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires (Sullivan, 1998). L'imiquimod jouerait ainsi un rôle d'antagoniste partiel sur le récepteur A<sub>2A</sub> entraînant une diminution de l'adenylyl cyclase, de l'accumulation de

l'AMPC et donc à une diminution du rétro-contrôle négatif qui limite normalement les réactions inflammatoires (Schön, 2006).

### **Différenciation des cellules B en cellules présentatrices d'antigènes efficaces**

La stimulation des cellules B tumorales avec le PMA entraîne une légère augmentation de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. De plus, les cellules de LLC-B stimulées avec les ODN CpG induisent une prolifération allogénique des deux sous-population de lymphocytes comparables à celle obtenue avec les lymphocytes B non stimulés. La production d'IL-10 et la faible sécrétion d'IL-2 mises en évidence dans les surnageants de culture de ces cellules tumorales stimulées pourraient expliquer ces résultats.

Une étude récente a rapporté des quantités importantes de cellules T régulatrices chez des patients atteints de LLC-B par rapport aux taux observés chez des sujets sains. Une fréquence plus importante de lymphocytes T régulateurs a par ailleurs été observée chez des patients atteints de LLC non traités ou présentant une maladie progressive (Beyer, 2005). Or, les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> sont capables d'inhiber les réponses T spécifiques d'un antigène et peuvent être partiellement responsables de l'absence de réponses anti-tumorales (Sakaguchi, 2004). La présence de lymphocytes T régulateurs dans nos cultures pourrait également expliquer l'incapacité des cellules B tumorales stimulées à induire la prolifération des lymphocytes T.

Nous avons par contre montré une prolifération des lymphocytes T mis en culture avec des cellules B amygdaliennes stimulées avec du PMA, prolifération qui concernait surtout les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

Pour confirmer ces résultats, il serait intéressant d'utiliser des lymphocytes T isolés par tri immunomagnétique comme cellules répondantes. Il serait également nécessaire d'examiner le profil de production de cytokines par les lymphocytes T après culture avec les cellules B leucémiques stimulées.

Les résultats rapportés ici sont concordants avec plusieurs travaux montrant qu'il est possible de différencier des cellules B en cellules présentatrices d'antigènes efficaces. Ainsi, Zhong et al. ont rapporté l'existence d'une sous-population de cellules B matures 5G9<sup>+</sup> issue

du sang périphérique humain présentant un phénotype de cellules B matures avec une morphologie et des fonctions de cellules dendritiques (Zhong, 1999). Corradi et al. (1987) ont d'ailleurs montré, il y a longtemps, qu'une sous-population de cellules B humaines peut, après stimulation avec un ester de phorbol, acquérir les caractéristiques morphologiques de cellules dendritiques.

Plusieurs études ont également montré la capacité des précurseurs de cellules B à se différencier en cellules présentatrices d'antigènes sous l'influence de différents stimuli. Ainsi, Björck et al (1998) ont rapporté que des cellules CD19+ pro-B pouvaient se transformer en cellules présentatrices d'antigènes quand elles étaient mises en culture avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-3, de l'IL-7, du TNF- $\alpha$ , du SCF (Stem Cell Factor) et un ligand humain de FLT-3 (Fms-Like Tyrosine kinase 3). Plus récemment, dans une lignée cellulaire du nom de HBM-Noda, dérivée de cellules primaires de la moelle osseuse d'un patient atteint d'une leucémie aiguë myéloblastique, ont été identifiées des caractéristiques de cellules B telles que le réarrangement des gènes d'immunoglobulines et l'expression des marqueurs pan-B CD19 et CD20, ainsi qu'une morphologie et l'expression de marqueurs spécifiques aux cellules dendritiques (Nagasaki, 2000). Les travaux de Mohty et al. (2002) ont également mis en évidence la possibilité d'obtenir des cellules dendritiques à partir de cellules B CD19+ du sang périphérique de sujets contrôles ou de patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs après 8 jours de culture en présence d'IL-4 et de CD40 ligand.

Ces différents travaux suggèrent l'existence d'une relation étroite entre les cellules B et les cellules dendritiques et mettent en avant la possibilité de transformer des cellules B en cellules présentatrices d'antigènes efficaces, avec des propriétés morphologiques et phénotypiques équivalentes. Ceci va dans le sens des résultats que nous avons obtenus après stimulation des cellules B saines et tumorales avec le PMA et les ODN CpG. Ces résultats sont concordants avec les propriétés nouvellement décrites des lymphocytes B, acteurs de l'immunité innée, mais qui peuvent également jouer le rôle de lien entre l'immunité innée et cognitive (Viau, 2005).

# **CONCLUSIONS-PERSPECTIVES**



Ce travail avait pour objectif principal de transformer les cellules B de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B en cellules présentatrices d'antigènes efficaces de leur propre idiotype via une activation par des agonistes des TLRs.

Dans un premier temps, le **profil d'expression des TLRs au niveau des lymphocytes B sains et pathologiques** a été analysé par cytométrie de flux. Les résultats obtenus ont montré que le profil d'expression des TLRs des cellules B de LLC-B est similaire à celui des lymphocytes B normaux avec une importante expression de TLR-7, -9 et -10 et une plus faible expression de TLR-4. Par ailleurs, TLR-9 est exprimé de façon beaucoup plus importante au niveau des cellules B tumorales.

**L'effet de la stimulation des ligands de TLR-4, TLR-7 et TLR-9** a ensuite été testé, au niveau de cellules B saines amygdaliennes et des cellules B tumorales. Le niveau d'activation cellulaire des cellules saines et des cellules tumorales stimulées a été analysé par immunophénotypage. Une analyse cytomorphologique a été entreprise de manière à étudier l'aspect des cellules après stimulation. Leur prolifération a été évaluée grâce à un marquage au CFSE et l'apoptose a été étudiée par la méthode TUNEL. Une étude de la sécrétion de cytokines a également été réalisée, en cytométrie de flux, à partir de surnageants de culture de lymphocytes B tumoraux ou sains stimulés ou non afin de caractériser l'influence des ligands des TLRs étudiés sur leur production cytokinique.

Nous avons montré que le **LPS**, ligand de TLR-4, induit, *in vitro*, une faible augmentation de l'expression de HLA-DR au niveau des cellules B saines et tumorales.

Après stimulation avec **l'imiquimod R837**, ligand de TLR-7, nous avons surtout mis en évidence, pour les plus fortes concentrations testées, un effet pro-apoptotique rapide et important des cellules tumorales mais pas des cellules B saines. De plus, cette stimulation induit, *in vitro*, une activation modérée des cellules B amygdaliennes et tumorales.

Les cellules B de LLC-B stimulées avec des **ODN CpG M362**, ligands de TLR-9, présentent une augmentation importante des marqueurs de costimulation et de présentation ainsi qu'une augmentation de leur survie. Une activation moindre a été observée au niveau des cellules B d'amygdales palatines stimulées avec ces ODN CpG.

La caractérisation de l'environnement cytokinique généré *ex vivo* par les cellules B d'amygdales palatines et de LLC-B stimulées ou non par l'imiquimod R837 et les ODN CpG M362 a montré que ces ligands orientent les réponses cellulaires vers un profil pro-inflammatoire. La production d'IL-8 observée pourrait jouer un rôle de chimioattractant pour les polynucléaires neutrophiles ou certains lymphocytes T et la sécrétion importante de TNF pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la réponse immune anti-tumorale des cellules T.

Enfin, une **analyse fonctionnelle** a été réalisée dans un modèle de stimulation allogénique afin de mesurer la capacité des cellules B saines et pathologiques stimulées ou non par les ODN CpG à activer des lymphocytes T naïfs. L'absence de prolifération de lymphocytes T naïfs allogéniques que nous avons observée pourrait être expliquée par la faible sécrétion d'IL-2 ainsi que par la présence d'IL-10 dans les surnageants de culture.

Ce travail permet de compléter les rares données de la littérature concernant l'expression des TLRs au niveau des cellules B de LLC-B et des cellules B saines.

*L'ensemble de nos résultats montrent que TLR-7 et TLR-9, exprimés fortement au niveau des cellules B tumorales de LLC-B, sont fonctionnels et capables de répondre à des ligands spécifiques qui sont respectivement l'imiquimod et les ODN CpG et peuvent constituer une cible intéressante dans l'immunothérapie anti-tumorale de la LLC-B.*

L'induction d'apoptose médiée par l'imiquimod R837 pourrait permettre la production de structures hautement immunogènes reconnues par des cellules dendritiques et donc d'éliminer les cellules malignes en association avec la chimiothérapie.

Les ODN CpG M362 pourraient, par contre, être utilisés comme adjuvants pour transformer les cellules B tumorales en cellules présentatrices d'antigènes efficaces de leur propre idiotype à condition de parvenir à les différencier en cellules activatrices de réponses Th1 et cytotoxiques et à contrecarrer l'environnement immunosuppresseur induit par les cellules tumorales. La stimulation par les ODN CpG en présence de corps apoptotiques générés par l'imiquimod pourrait permettre un chargement efficace de motifs tumoraux et permettre, en présence d'un environnement cytokinique approprié, d'obtenir une activation

lymphocytaire efficace.

Dans la continuité de ce travail, nous pouvons envisager un certain nombre d'études.

L'exploration de l'orientation immunologique des lymphocytes T obtenus après stimulation par les cellules B stimulées avec des ODN CpG devra être réalisée par l'étude de leur profil de sécrétion cytokinique. Il sera nécessaire de déterminer les signaux permettant la production de cellules T de type TH1 et cytotoxiques et capables de contrecarrer l'environnement immunosuppresseur induit par les cellules tumorales.

Dans un deuxième temps, le potentiel cytotoxique de CTL autologues vis-à-vis des cellules tumorales stimulées avec les ODN CpG pourra être évalué. La cinétique de la production de cytokines pourra également être analysée par RT-PCR.

Les voies de signalisation mises en jeu lors de la stimulation de TLR-7 via l'imiquimod R837 et de TLR-9 via les ODN CpG M362 devront être étudiées plus précisément. La stimulation des TLR-7 et TLR-9 par leurs ligands respectifs peut induire une voie de transduction qui conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B, des MAPKs telles que ERK, JNK et p38 et des facteurs IRF. De plus, la protéine Akt peut être activée via les ODN CpG. Il serait donc intéressant de déterminer les facteurs mis en jeu lors des réponses que nous avons obtenues, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de chacune de ces voies ou par l'étude de l'état d'activation des protéines clefs de ces voies de signalisation.

Il faudra déterminer si l'apoptose observée après stimulation avec l'imiquimod et si la protection de l'apoptose obtenue après stimulation avec les ODN CpG sont respectivement dépendantes ou non de TLR-7 et TLR-9. La chloroquine qui est un inhibiteur de l'acidification endosomale connu pour bloquer l'activation médiée par TLR-7 et TLR-9 pourra être utilisée.

Les résultats de ce travail pourront être corrélés aux facteurs pronostiques récemment décrits tels que le statut mutationnel, les marqueurs CD38 et Zap 70 et la présence ou non de délétion 17p ou 11q.

Une éventuelle modulation de cellules T régulatrices ou de cellules NK produisant CD56+/granzyme après stimulation allogénique pourra également être étudiée.

L'objectif final serait l'utilisation de ces agonistes de TLRs dans des études cliniques de phase I.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbott B. L.** (2004) Advances in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 2, 448-454.
- Abbott B. L.** (2006) Chronic lymphocytic leukemia: recent advances in diagnosis and treatment. *Oncologist* 11, 21-30.
- Abujamra A. L., Spanjaard R. A., Akinsheye I., Zhao X., Faller D. V., Ghosh S. K.** (2006) Leukemia virus long terminal repeat activates NFkappaB pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology* 345, 390-403.
- Aderem A., Ulevitch R. J.** (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Akira S.** (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 5-11.
- Akira S.** (2006) TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311, 1-16.
- Akira S., Takeda K.** (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
- Alessandrini A., Chiaur D. S., Pagano M.** (1997) Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia* 11, 342-345.
- Alexopoulou L., Holt A. C., Medzhitov R., Flavell R. A.** (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Alexopoulou L., Thomas V., Schnare M., Lobet Y., Anguita J., Schoen R. T., Medzhitov R., Fikrig E., Flavell R. A.** (2002) Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* 8, 878-884.
- Apoptosis Assay Methods : Methods for studying apoptosis in individual cells  
 Disponible sur [https://www.roche-applied-science.com/PROD\\_IFN/MANUALS/CELL\\_MAN/apoptosis\\_033\\_035.pdf](https://www.roche-applied-science.com/PROD_IFN/MANUALS/CELL_MAN/apoptosis_033_035.pdf)
- Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J. A., Bare O., Auron P. E., Stevenson M. A., Calderwood S. K.** (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277, 15028-15034.
- Au W. C., Moore P. A., LaFleur D. W., Tombal B., Pitha P. M.** (1998) Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *J Biol Chem* 273, 29210-29217.
- Badros A., Barlogie B., Morris C., Desikan R., Martin S. R., Munshi N., Zangari M., Mehta J., Toor A., Cottler-Fox M., Fassas A., Anaissie E., Schichman S., Tricot G.** (2001) High response rate in refractory and poor-risk multiple myeloma after allotransplantation using a nonmyeloablative conditioning regimen and donor

- lymphocyte infusions. *Blood* 97, 2574-2579.
- Barge R. M., Osanto S., Marijt W. A., Starrenburg C. W., Fibbe W. E., Nortier J. W., Falkenburg J. H., Willemze R.** (2003) Minimal GVHD following in-vitro T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning allowing subsequent infusions of donor lymphocytes in patients with hematological malignancies and solid tumors. *Exp Hematol* 31, 865-872.
- Barnes B. J., Moore P. A., Pitha P. M.** (2001) Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J Biol Chem* 276, 23382-23390.
- Barragan M., Bellosillo B., Campas C., Colomer D., Pons G., Gil J.** (2002) Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 99, 2969-2976.
- Barragan M., de Frias M., Iglesias-Serret D., Campas C., Castano E., Santidrian A. F., Coll-Mulet L., Cosialls A. M., Domingo A., Pons G., Gil J.** (2006) Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C (Tabeta et al.). *J Leukoc Biol* 80, 1473-1479.
- Bastians H., Townsley F. M., Ruderman J. V.** (1998) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) induces N-terminal proteolytic cleavage of cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15374-15381.
- Bauer B., Jenny M., Fresser F., Uberall F., Baier G.** (2003) AKT1/PKBalpha is recruited to lipid rafts and activated downstream of PKC isotypes in CD3-induced T cell signaling. *FEBS Lett* 541, 155-162.
- Bauer M., Heeg K., Wagner H., Lipford G. B.** (1999) DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology* 97, 699-705.
- Bauer S., Kirschning C. J., Hacker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H., Lipford G. B.** (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9237-9242.
- Bell J. K., Mullen G. E., Leifer C. A., Mazzoni A., Davies D. R., Segal D. M.** (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24, 528-533.
- Bellmann K., Martel J., Poirier D. J., Labrie M. M., Landry J.** (2006) Downregulation of the PI3K/Akt survival pathway in cells with deregulated expression of c-Myc. *Apoptosis* 11, 1311-1319.

- Bernasconi N. L., Onai N., Lanzavecchia A.** (2003) A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* *101*, 4500-4504.
- Besse A., Lamothe B., Campos A. D., Webster W. K., Maddineni U., Lin S. C., Wu H., Darnay B. G.** (2007) TAK1-dependent signaling requires functional interaction with TAB2/TAB3. *J Biol Chem* *282*, 3918-3928.
- Beyer M., Kochanek M., Darabi K., Popov A., Jensen M., Endl E., Knolle P. A., Thomas R. K., von Bergwelt-Baildon M., Debey S., Hallek M., Schultze J. L.** (2005) Reduced frequencies and suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* *106*, 2018-2025.
- Bieback K., Lien E., Klagge I. M., Avota E., Schneider-Schaulies J., Duprex W. P., Wagner H., Kirschning C. J., Ter Meulen V., Schneider-Schaulies S.** (2002) Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* *76*, 8729-8736.
- Binet J. L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguet H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M. T., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F.** (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* *48*, 198-206.
- Binet J. L., Maloum K., Leblond V., Sutton L., Gabarre J., Gonzalez H., Merle-Beral H.** (1997) Leucémie lymphoïde chronique. Source : *Cancers : évaluation, traitement et surveillance*. Andrieu J.M., Colonna P. (Paris, ESTEM).  
Disponible sur <http://www.medespace.com/cancero/doc/llc.html>
- Biragyn A., Ruffini P. A., Leifer C. A., Klyushnenkova E., Shakhov A., Chertov O., Shirakawa A. K., Farber J. M., Segal D. M., Oppenheim J. J., Kwak L. W.** (2002) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* *298*, 1025-1029.
- Björck P., Kincade P. W.** (1998) Cutting Edge: CD19<sup>+</sup> Pro-B Cells Can Give Rise to Dendritic Cells In Vitro. *J Immunol* *161*, 5795-5799.
- Blaise D., Gravis G., Maraninchi D.** (1993) Long-term follow-up of T-cell depletion for bone marrow transplantation. *Lancet* *341*, 51-52.
- Boldrick J. C., Alizadeh A. A., Diehn M., Dudoit S., Liu C. L., Belcher C. E., Botstein D., Staudt L. M., Brown P. O., Relman D. A.** (2002) Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci*

U S A 99, 972-977.

- Borish L. C., Steinke J. W.** (2003) 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* *111*, S460-475.
- Bottrel R. L. A., Yang Y.-L., Levy D. E., Tomai M., Reis L. F. L.** (1999) The Immune Response Modifier Imiquimod Requires STAT-1 for induction of Interferon, Interferon-Stimulated Genes, and Interleukin-6. *Antimicrob Agents Chemother* *43*, 856-861.
- Bourke E., Bosisio D., Golay J., Polentarutti N., Mantovani A.** (2003) The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* *102*, 956-963.
- Bowen A. L., Zomas A., Emmett E., Matutes E., Dyer M. J., Catovsky D.** (1997) Subcutaneous CAMPATH-1H in fludarabine-resistant/relapsed chronic lymphocytic and B-prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* *96*, 617-619.
- Boyum A.** (1976) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* *5*, 9-15.
- Branson K., Chopra R., Kottaridis P. D., McQuaker G., Parker A., Schey S., Chakraverty R. K., Craddock C., Milligan D. W., Pettengell R., Marsh J. C., Linch D. C., Goldstone A. H., Williams C. D., Mackinnon S.** (2002) Role of nonmyeloablative allogeneic stem-cell transplantation after failure of autologous transplantation in patients with lymphoproliferative malignancies. *J Clin Oncol* *20*, 4022-4031.
- Buhmann R., Nolte A., Westhaus D., Emmerich B., Hallek M.** (1999) CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood* *93*, 1992-2002.
- Burns K., Clatworthy J., Martin L., Martinon F., Plumpton C., Maschera B., Lewis A., Ray K., Tschopp J., Volpe F.** (2000) Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* *2*, 346-351.
- Byrd J. C., Stilgenbauer S., Flinn I. W.** (2004) Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 163-183.
- Cacace A. M., Ueffing M., Philipp A., Han E. K., Kolch W., Weinstein I. B.** (1996) PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase. *Oncogene* *13*, 2517-2526.
- Caligaris-Cappio F., Cignetti A., Granziero L., Ghia P.** (2002) Chronic lymphocytic leukaemia: a model for investigating potential new targets for the therapy of indolent



- lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol* 15, 563-575.
- Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C. M.** (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15524-15529.
- Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J. C.** (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Carella A. M., Cavaliere M., Lerma E., Ferrara R., Tedeschi L., Romanelli A., Vinci M., Pinotti G., Lambelet P., Loni C., Verdiani S., De Stefano F., Valbonesi M., Corsetti M. T.** (2000) Autografting followed by nonmyeloablative immunosuppressive chemotherapy and allogeneic peripheral-blood hematopoietic stem-cell transplantation as treatment of resistant Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 18, 3918-3924.
- Carpentier A. F., Auf G., Delattre J. Y.** (2003) CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy : review of the literature and potential applications in malignant glioma. *Front Biosci* 8, e115-127.
- Cartron G., Linassier C., Bremond J. L., Desablens B., Georget M. T., Fimbel B., Luthier F., Dutel J. L., Lamagnere J. P., Colombat P.** (1998) CD5 negative B-cell chronic lymphocytic leukemia: clinical and biological features of 42 cases. *Leuk Lymphoma* 31, 209-216.
- Cella M., Salio M., Sakakibara Y., Langen H., Julkunen I., Lanzavecchia A.** (1999) Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 189, 821-829.
- Centers for Disease Control and Prevention** (2002) Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. *MMWR Recomm Rep* 51, 1-78.
- Chan A. C., Iwashima M., Turck C. W., Weiss A.** (1992) ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649-662.
- Chaudhary P. M., Ferguson C., Nguyen V., Nguyen O., Massa H. F., Eby M., Jasmin A., Trask B. J., Hood L., Nelson P. S.** (1998) Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* 91, 4020-4027.
- Chen L., Widhopf G., Huynh L., Rassenti L., Rai K. R., Weiss A., 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 Z., Seimiya H., Naito M., Mashima T., Kizaki A., Dan S., Imaizumi M., Ichijo H., Miyazono K., Tsuruo T.** (1999) ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* 18, 173-180.
- Cheng M., Sexl V., Sherr C. J., Roussel M. F.** (1998) Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1091-1096.
- Cheson B. D., Bennett J. M., Grever M., Kay N., Keating M. J., O'Brien S., Rai K. R.** (1996) National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87, 4990-4997.
- Childs R., Clave E., Contentin N., Jayasekera D., Hensel N., Leitman S., Read E. J., Carter C., Bahceci E., Young N. S., Barrett A. J.** (1999) Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 94, 3234-3241.
- Chiorazzi N., Ferrarini M.** (2003) B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 21, 841-894.
- Chiorazzi N., Rai K. R., Ferrarini M.** (2005) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352, 804-815.
- Choe J., Kelker M. S., Wilson I. A.** (2005) Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309, 581-585.
- Chuang T., Ulevitch R. J.** (2001) Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 1518, 157-161.
- Cimmino A., Calin G. A., Fabbri M., Iorio M. V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S. E., Aqeilan R. I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C. G., Kipps T. J., Negrini M., Croce C. M.** (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
- CLL Trialists' Collaborative Group** (1999) Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 91, 861-868.
- Compton T., Kurt-Jones E. A., Boehme K. W., Belko J., Latz E., Golenbock D. T., Finberg R. W.** (2003) Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 77, 4588-4596.
- Corbit K. C., Trakul N., Eves E. M., Diaz B., Marshall M., Rosner M. R.** (2003)

- Activation of Raf-1 Signaling by Protein Kinase C through a Mechanism Involving Raf Kinase Inhibitory Protein. *J Biol Chem* 278, 13061-13068.
- Corradi M. P., Jelinek D. F., Ramberg J. E., Lipsky P. E.** (1987) Development of a cell with dendritic morphology from a precursor of B lymphocyte lineage. *J Immunol* 138, 2075-2081.
- Costa C. P., Kirschning C. J., Busch D., Durr S., Jennen L., Heinzmann U., Prebeck S., Wagner H., Miethke T.** (2002) Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Immunol* 32, 2460-2470.
- Crespo M., Bosch F., Villamor N., Bellosillo B., Colomer D., Rozman M., Marce S., Lopez-Guillermo A., Campo E., Montserrat E.** (2003) ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348, 1764-1775.
- Damle R. N., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen S. L., Buchbinder A., Budman D., Dittmar K., Kolitz J., Lichtman S. M., Schulman P., Vinciguerra V. P., Rai K. R., Ferrarini M., Chiorazzi N.** (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1840-1847.
- Dan H. C., Sun M., Kaneko S., Feldman R. I., Nicosia S. V., Wang H. G., Tsang B. K., Cheng J. Q.** (2004) Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 279, 5405-5412.
- Dasari P., Nicholson I. C., Hodge G., Dandie G. W., Zola H.** (2005) Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol* 236, 140-145.
- Datta S. R., Brunet A., Greenberg M. E.** (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905-2927.
- Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. E.** (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Deaglio S., Capobianco A., Bergui L., Durig J., Morabito F., Duhrsen U., Malavasi F.** (2003) CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 102, 2146-2155.
- Decker T., Schneller F., Hipp S., Miething C., Jahn T., Duyster J., Peschel C.** (2002) Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia* 16,

327-334.

- Decker T., Schneller F., Kronschnabl M., Dechow T., Lipford G. B., Wagner H., Peschel C.** (2000b) Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol* 28, 558-568.
- Decker T., Schneller F., Sparwasser T., Tretter T., Lipford G. B., Wagner H., Peschel C.** (2000a) Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 95, 999-1006.
- Degan M., Rupolo M., Bo M. D., Stefanon A., Bomben R., Zucchetto A., Canton E., Berretta M., Nanni P., Steffan A., Ballerini P. F., Damiani D., Pucillo C., Attadia V., Colombatti A., Gattei V.** (2004) Mutational status of IgVH genes consistent with antigen-driven selection but not percent of mutations has prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma* 5, 123-126.
- Delgado J., Thomson K., Russell N., Ewing J., Stewart W., Cook G., Devereux S., Lovell R., Chopra R., Marks D. I., Mackinnon S., Milligan D. W.** (2006) Results of alemtuzumab-based reduced-intensity allogeneic transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a British Society of Blood and Marrow Transplantation Study. *Blood* 107, 1724-1730.
- Deng L., Wang C., Spencer E., Yang L., Braun A., You J., Slaughter C., Pickart C., Chen Z. J.** (2000) Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-361.
- di Celle F. P., Mariani S., Riera L., Stacchini A., Reato G., Foa R.** (1996) Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood* 87, 4382-4389.
- di Celle P. F., Carbone A., Marchis D., Zhou D., Sozzani S., Zupo S., Pini M., Mantovani A., Foa R.** (1994) Cytokine gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of constitutive interleukin-8 (IL-8) mRNA expression and secretion of biologically active IL-8 protein. *Blood* 84, 220-228.
- Dicker F., Schnittger S., Haferlach T., Kern W., Schoch C.** (2006) Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 108, 3152-3160.

- Didona B., Benucci R., Amerio P., Canzona F., Rienzo O., Cavalieri R.** (2004) Primary cutaneous CD30+ T-cell lymphoma responsive to topical imiquimod (Aldara). *Br J Dermatol* 150, 1198-1201.
- Diebold S. S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis e Sousa C.** (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Diehl S., Rincon M.** (2002) The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 39, 531-536.
- Dighiero G.** (2002) Is chronic lymphocytic leukemia one disease? *Haematologica* 87, 1233-1235.
- Dighiero G.** (2005) CLL Biology and Prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 278-284.
- Dighiero G., Bodega E., Mayzner R., Binet J. L.** (1980) Individual cell-by-cell quantitation of lymphocyte surface membrane Ig in normal and CLL lymphocyte and during ontogeny of mouse B lymphocytes by immunoperoxidase assay. *Blood* 55, 93-100.
- Dighiero G., Maloum K., Desablens B., Cazin B., Navarro M., Leblay R., Leporrier M., Jaubert J., Lepeu G., Dreyfus B., Binet J. L., Travade P.** (1998) Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 338, 1506-1514.
- Dighiero G., Travade P., Chevret S., Fenaux P., Chastang C., Binet J. L.** (1991) B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood* 78, 1901-1914.
- Dirsch V. M., Stuppner H., Vollmar A. M.** (2001) Helenalin Triggers a CD95 Death Receptor-independent Apoptosis That Is Not Affected by Overexpression of Bcl-xL or Bcl-2. *Cancer Res* 61, 5817-5823.
- Dockrell D. H., Kinghorn G. R.** (2001) Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *J Antimicrob Chemother* 48, 751-755.
- Döhner H., Fischer K., Bentz M., Hansen K., Benner A., Cabot G., Diehl D., Schlenk R., Coy J., Stilgenbauer S., et al.** (1995) p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 85, 1580-1589.
- Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Krober A., Bullinger L., Dohner K., Bentz M., Lichter P.** (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343, 1910-1916.

- Dono M., Cerruti G., Zupo S.** (2004) The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2105-2111.
- Du X., Poltorak A., Wei Y., Beutler B.** (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 11, 362-371.
- Dumitru C. D., Ceci J. D., Tsatsanis C., Kontoyiannis D., Stamatakis K., Lin J. H., Patriotis C., Jenkins N. A., Copeland N. G., Kollias G., Tsihchlis P. N.** (2000) TNF- $\alpha$  induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103, 1071-1083.
- Dybdahl B., Wahba A., Lien E., Flo T. H., Waage A., Qureshi N., Sellevold O. F., Espevik T., Sundan A.** (2002) Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 105, 685-690.
- Eaton-Bassiri A., Dillon S. B., Cunningham M., Ryczyn M. A., Mills J., Sarisky R. T., Mbow M. L.** (2004) Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 72, 7202-7211.
- Echchakir H., Bagot M., Dorothee G., Martinvalet D., Le Gouvello S., Bousnell L., Chouaib S., Bensussan A., Mami-Chouaib F.** (2000) Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J Invest Dermatol* 115, 74-80.
- Eichhorst, B. F., Busch, R., Hopfinger, G., Pasold, R., Hensel, M., Steinbrecher, C., Siehl, S., Jager, U., Bergmann, M., Stilgenbauer, S., Schweighofer C., Wendtner C.M., Döhner H., Brittinger G., Emmerich B., Hallek M.** (2006). Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107, 885-891.
- Fagarasan S., Honjo T.** (2000) T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 290, 89-92.
- Fayad L., Keating M. J., Reuben J. M., O'Brien S., Lee B. N., Lerner S., Kurzrock R.** (2001) Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 97, 256-263.
- Fearon E. R., Pardoll D. M., Itaya T., Golumbek P., Levitsky H. I., Simons J. W., Karasuyama H., Vogelstein B., Frost P.** (1990) Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 60, 397-403.

- Ferguson A. R., Youd M. E., Corley R. B.** (2004) Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol* *16*, 1411-1422.
- Ferrer I., Friguls B., Dalfo E., Planas A. M.** (2003) Early modifications in the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated kinases SAPK/JNK and p38, and their phosphorylated substrates following focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* *105*, 425-437.
- Fitzgerald K. A., Rowe D. C., Barnes B. J., Caffrey D. R., Visintin A., Latz E., Monks B., Pitha P. M., Golenbock D. T.** (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* *198*, 1043-1055.
- Flinn I. W., Grever M. R.** (1996) Chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Treat Rev* *22*, 1-13.
- Foa R., Fierro M. T., Lusso P., Raspadori D., Ferrando M. L., Matera L., Malavasi F., Lauria F.** (1986) Reduced natural killer T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia identified by three monoclonal antibodies: Leu-11, A10, AB8.28. *Br J Haematol* *62*, 151-154.
- French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukaemia** (1990) Natural history of stage A chronic lymphocytic leukaemia untreated patients. *Br J Haematol* *76*, 45-57.
- Fulci V., Chiaretti S., Goldoni M., Azzalin G., Carucci N., Tavolaro S., Castellano L., Magrelli A., Citarella F., Messina M., Maggio R., Peragine N., Santangelo S., Mauro F. R., Landgraf P., Tuschl T., Weir D. B., Chien M., Russo J. J., Ju J., Sheridan R., Sander C., Zavolan M., Guarini A., Foa R., Macino G.** (2007) Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *109*, 4944-4951.
- Funami K., Matsumoto M., Oshiumi H., Akazawa T., Yamamoto A., Seya T.** (2004) The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol* *16*, 1143-1154.
- Galdiero M., Galdiero M., Finamore E., Rossano F., Gambuzza M., Catania M. R., Teti G., Midiri A., Mancuso G.** (2004) Haemophilus influenzae porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect Immun* *72*, 1204-1209.
- Gantner F., Hermann P., Nakashima K., Matsukawa S., Sakai K., Bacon K. B.** (2003) CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol* *33*, 1576-1585.
- Gao F. G., Khammanivong V., Liu W. J., Leggatt G. R., Frazer I. H., Fernando G. J.**

- (2002) Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell. *Cancer Res* 62, 6438-6441.
- Geisse J., Caro I., Lindholm J., Golitz L., Stampone P., Owens M.** (2004) Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol* 50, 722-733.
- Geisse J. K., Rich P., Pandya A., Gross K., Andres K., Ginkel A., Owens M.** (2002) Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: a double-blind, randomized, vehicle-controlled study. *J Am Acad Dermatol* 47, 390-398.
- Ghia P., Caligaris-Cappio F.** (2006) The origin of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 33, 150-156.
- Gilleece M. H., Dexter T. M.** (1993) Effect of Campath-1H antibody on human hematopoietic progenitors in vitro. *Blood* 82, 807-812.
- Giuntoli R. L., Lu J., Kobayashi H., Kennedy R., Celis E.** (2002) Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function. *Clin Cancer Res* 8, 922-931.
- Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A.** (2000) *Immunologie, le cours de Janis Kuby* (New York: W.H. Freeman).
- Gomi K., Kawasaki K., Kawai Y., Shiozaki M., Nishijima M.** (2002) Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates the signal transduction induced by flavolipin, an amino acid-containing lipid unique to *Flavobacterium meningosepticum*. *J Immunol* 168, 2939-2943.
- Grakoui A., Bromley S. K., Sumen C., Davis M. M., Shaw A. S., Allen P. M., Dustin M. L.** (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Grandjennette C., Kennel A., Massin F., Faure G. C., Bene M. C., Montagne P.** (2005) Measurement of immunoglobulins G, A, and M levels in B-lymphocytes culture. *J Immunoassay Immunochem* 26, 303-311.
- Gribben J. G.** (2007) Stem-cell transplantation in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 20, 513-527.
- Guiducci C., Ott G., Chan J. H., Damon E., Calacsan C., Matray T., Lee K. D., Coffman R. L., Barrat F. J.** (2006) Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med* 203, 1999-2008.
- Guillot L., Balloy V., McCormack F. X., Golenbock D. T., Chignard M., Si-Tahar M.** (2002) Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A



- involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 168, 5989-5992.
- Gursel M., Gursel I., Mostowski H. S., Klinman D. M.** (2006) CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation. *J Immunol* 177, 1575-1580.
- Häcker H., Redecke V., Blagoev B., Kratchmarova I., Hsu L. C., Wang G. G., Kamps M. P., Raz E., Wagner H., Hacker G., Mann M., Karin M.** (2006) Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439, 204-207.
- Hajjar A. M., O'Mahony D. S., Ozinsky A., Underhill D. M., Aderem A., Klebanoff S. J., Wilson C. B.** (2001) Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 166, 15-19.
- Hale G., Cobbold S., Novitzky N., Bunjes D., Willemze R., Prentice H. G., Milligan D., MacKinnon S., Waldmann H.** (2001) CAMPATH-1 antibodies in stem-cell transplantation. *Cytotherapy* 3, 145-164.
- Hallek M., Langenmayer I., Nerl C., Knauf W., Dietzfelbinger H., Adorf D., Ostwald M., Busch R., Kuhn-Hallek I., Thiel E., Emmerich B.** (1999) Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93, 1732-1737.
- Hallek M., Wanders L., Ostwald M., Busch R., Senekowitsch R., Stern S., Schick H. D., Kuhn-Hallek I., Emmerich B.** (1996) Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 22, 439-447.
- Hamblin T. J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D. G., 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., Gardiner A., Oscier D. G., Davis Z., Stevenson F. K.** (2000) Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* 95, 2455-2457.
- Hamblin T. J., Orchard J. A., Ibbotson R. E., Davis Z., Thomas P. W., Stevenson F. K., 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.
- Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmauer E., Reed J. C.** (1993) bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82, 1820-1828.

- Harada H., Quearry B., Ruiz-Vela A., Korsmeyer S. J.** (2004) Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 15313-15317.
- Harig S., Witzens M., Krackhardt A. M., Trojan A., Barrett P., Broderick R., Zauls A. J., Gribben J. G.** (2001) Induction of cytotoxic T-cell responses against immunoglobulin V region-derived peptides modified at human leukocyte antigen-A2 binding residues. *Blood* *98*, 2999-3005.
- Harris N. L., Jaffe E. S., Diebold J., Flandrin G., Muller-Hermelink H. K., Vardiman J.** (2000) Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol* *11 Suppl 1*, 3-10.
- Harris N. L., Jaffe E. S., Stein H., Banks P. M., Chan J. K., Cleary M. L., Delsol G., De Wolf-Peters C., Falini B., Gatter K. C., et al.** (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* *84*, 1361-1392.
- Hartmann G., Krieg A. M.** (2000) Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* *164*, 944-953.
- Hasan U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guiet C., Briere F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E. E.** (2005) Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* *174*, 2942-2950.
- Hashimoto C., Hudson K. L., Anderson K. V.** (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269-279.
- Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A.** (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103.
- Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S.** (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.
- Hemmi H., Kaisho T., Takeuchi O., Sato S., Sanjo H., Hoshino K., Horiuchi T., Tomizawa H., Takeda K., Akira S.** (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* *3*, 196-200.
- Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M.,**

- Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S.** (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Hemmi H., Takeuchi O., Sato S., Yamamoto M., Kaisho T., Sanjo H., Kawai T., Hoshino K., Takeda K., Akira S.** (2004) The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* *199*, 1641-1650.
- Hengartner M. O.** (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* *407*, 770-776.
- Hernandez J. A., Land K. J., McKenna R. W.** (1995) Leukemias, myeloma, and other lymphoreticular neoplasms. *Cancer* *75*, 381-394.
- Hirschfeld M., Weis J. J., Toshchakov V., Salkowski C. A., Cody M. J., Ward D. C., Qureshi N., Michalek S. M., Vogel S. N.** (2001) Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* *69*, 1477-1482.
- Hiscott J., Pitha P., Genin P., Nguyen H., Heylbroeck C., Mamane Y., Algarte M., Lin R.** (1999) Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* *19*, 1-13.
- Hochrein H., Schlatter B., O'Keeffe M., Wagner C., Schmitz F., Schiemann M., Bauer S., Suter M., Wagner H.** (2004) Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11416-11421.
- Hoebe K., Janssen E. M., Kim S. O., Alexopoulou L., Flavell R. A., Han J., Beutler B.** (2003) Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol* *4*, 1223-1229.
- Hoffmann J. A.** (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* *426*, 33-38.
- Honda K., Ohba Y., Yanai H., Negishi H., Mizutani T., Takaoka A., Taya C., Taniguchi T.** (2005) Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* *434*, 1035-1040.
- Honda K., Yanai H., Negishi H., Asagiri M., Sato M., Mizutani T., Shimada N., Ohba Y., Takaoka A., Yoshida N., Taniguchi T.** (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* *434*, 772-777.
- Hopkins P. A., Sriskandan S.** (2005) Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* *140*, 395-407.
- Horng T., Barton G. M., Flavell R. A., Medzhitov R.** (2002) The adaptor molecule TIRAP

- provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420, 329-333.
- Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdörfer B., Giese T., Endres S., Hartmann G.** (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168, 4531-4537.
- Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S.** (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752.
- Hoy T.** (2005) *Flow Cytometry and Cell Sorting: An Introduction*  
Disponible sur [http://www.cardiff.ac.uk/medic/aboutus/departments/haematology/resources/biomed04.ppt#306,11,Diapositive 11](http://www.cardiff.ac.uk/medic/aboutus/departments/haematology/resources/biomed04.ppt#306,11,Diapositive%2011)
- Hu P., Han Z., Couvillon A. D., Exton J. H.** (2004) Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Biol Chem* 279, 49420-49429.
- Hung K., Hayashi R., Lafond-Walker A., Lowenstein C., Pardoll D., Levitsky H.** (1998) The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188, 2357-2368.
- Ibrahim S., Keating M., Do K. A., O'Brien S., Huh Y. O., Jilani I., Lerner S., Kantarjian H. M., Albitar M.** (2001) CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98, 181-186.
- Imler J. L., Hoffmann J. A.** (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* 11, 304-311.
- Ishitani T., Takaesu G., Ninomiya-Tsuji J., Shibuya H., Gaynor R. B., Matsumoto K.** (2003) Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *Embo J* 22, 6277-6288.
- Iwasaki A., Medzhitov R.** (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-995.
- Jahrsdörfer B., Hartmann G., Racila E., Jackson W., Muhlenhoff L., Meinhardt G., Endres S., Link B. K., Krieg A. M., Weiner G. J.** (2001) CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 69, 81-88.
- Jahrsdörfer B., Muhlenhoff L., Blackwell S. E., Wagner M., Poeck H., Hartmann E., Jox R., Giese T., Emmerich B., Endres S., Weiner G. J., Hartmann G.** (2005a) B-cell

- lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res* 11, 1490-1499.
- Jahrsdörfer B., Wooldridge J. E., Blackwell S. E., Taylor C. M., Griffith T. S., Link B. K., Weiner G. J.** (2005b) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J Leukoc Biol* 77, 378-387.
- Janeway C. A., Jr., Medzhitov R.** (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.** (2001) *Immuno biology, the immune system in health and disease*, 5th edition (New York et Londres: Garland Publishing Inc ).
- Johnson G. B., Brunn G. J., Kodaira Y., Platt J. L.** (2002) Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 168, 5233-5239.
- Johnson S., Smith A. G., Loffler H., Osby E., Juliusson G., Emmerich B., Wyld P. J., Hiddemann W.** (1996) Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet* 347, 1432-1438.
- Judge A. D., Sood V., Shaw J. R., Fang D., McClintock K., MacLachlan I.** (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23, 457-462.
- Juliusson G., Gahrton G.** (1990) Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 45, 143-160.
- Juo P., Kuo C. J., Reynolds S. E., Konz R. F., Raingeaud J., Davis R. J., Biemann H. P., Blenis J.** (1997) Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol Cell Biol* 17, 24-35.
- Jurk M., Schulte B., Kritzler A., Noll B., Uhlmann E., Wader T., Schetter C., Krieg A. M., Vollmer J.** (2004) C-Class CpG ODN: sequence requirements and characterization of immunostimulatory activities on mRNA level. *Immunobiology* 209, 141-154.
- Kaisho T., Akira S.** (2004) Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect* 6, 1388-1394.
- Kalil N., Cheson B. D.** (1999) Chronic lymphocytic leukemia. *Oncologist* 4, 352-369.
- Kane L. P., Lin J., Weiss A.** (2000) Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* 12, 242-249.

- Kaufmann S. H., Gores G. J.** (2000) Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 22, 1007-1017.
- Kawada M., Yamagoe S., Murakami Y., Suzuki K., Mizuno S., Uehara Y.** (1997) Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 15, 629-637.
- Kawai T., Akira S.** (2006) Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7, 131-137.
- Kawai T., Akira S.** (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816-825.
- Kawai T., Sato S., Ishii K. J., Coban C., Hemmi H., Yamamoto M., Terai K., Matsuda M., Inoue J., Uematsu S., Takeuchi O., Akira S.** (2004) Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5, 1061-1068.
- Kawai T., Takeuchi O., Fujita T., Inoue J., Muhlradt P. F., Sato S., Hoshino K., Akira S.** (2001) Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167, 5887-5894.
- Kawakami Y., Nishimoto H., Kitaura J., Maeda-Yamamoto M., Kato R. M., Littman D. R., Leitges M., Rawlings D. J., Kawakami T.** (2004) Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem* 279, 47720-47725.
- Kay N. E., Han L., Bone N., 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.
- Keating M. J., O'Brien S., Albitar M.** (2002) Emerging information on the use of rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 29, 70-74.
- Keating M.J., O'Brien S., Albitar M., Lerner S., Plunkett W., Giles F., Andreeff M., Cortes J., Faderl S., Thomas D., Koller C., Wierda W., Detry M.A., Lynn A., Kantarjian H.** (2005) Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 23, 4079-4088.
- Keating M. J., O'Brien S., Lerner S., Koller C., Beran M., Robertson L. E., Freireich E. J., Estey E., Kantarjian H.** (1998) Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 92, 1165-1171.

- Kerkmann M., Rothenfusser S., Hornung V., Towarowski A., Wagner M., Sarris A., Giese T., Endres S., Hartmann G.** (2003) Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* *170*, 4465-4474.
- Khan J. A., Brint E. K., O'Neill L. A., Tong L.** (2004) Crystal structure of the Toll/interleukin-1 receptor domain of human IL-1RAPL. *J Biol Chem* *279*, 31664-31670.
- Khouri I. F., Keating M., Korbling M., Przepiorka D., Anderlini P., O'Brien S., Giralt S., Ippoliti C., von Wolff B., Gajewski J., Donato M., Claxton D., Ueno N., Andersson B., Gee A., Champlin R.** (1998) Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* *16*, 2817-2824.
- Khouri I. F., Saliba R. M., Giralt S. A., Lee M. S., Okoroji G. J., Hagemester F. B., Korbling M., Younes A., Ippoliti C., Gajewski J. L., McLaughlin P., Anderlini P., Donato M. L., Cabanillas F. F., Champlin R. E.** (2001) Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality. *Blood* *98*, 3595-3599.
- Kipps T. J.** (1989) The CD5 B cell. *Adv Immunol* *47*, 117-185.
- Klinman D. M., Currie D., Gursel I., Verthelyi D.** (2004) Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* *199*, 201-216.
- Kolb H. J., Schattenberg A., Goldman J. M., Hertenstein B., Jacobsen N., Arcese W., Ljungman P., Ferrant A., Verdonck L., Niederwieser D., van Rhee F., Mittermueller J., de Witte T., Holler E., Ansari H.** (1995) Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* *86*, 2041-2050.
- Kolch W., Heidecker G., Kochs G., Hummel R., Vahidi H., Mischak H., Finkenzeller G., Marme D., Rapp U. R.** (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* *364*, 249-252.
- Kopp E., Medzhitov R., Carothers J., Xiao C., Douglas I., Janeway C. A., Ghosh S.** (1999) ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* *13*, 2059-2071.
- Korn T., Bettelli E., Gao W., Awasthi A., Jager A., Strom T. B., Oukka M., Kuchroo V. K.** (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells.

Nature 448, 484-487.

- Krieg A. M.** (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20, 709-760.
- Krieg A. M.** (2006) Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5, 471-484.
- Krieg A. M., Yi A. K.** (2000) Rescue of B cells from apoptosis by immune stimulatory CpG DNA. *Springer Semin Immunopathol* 22, 55-61.
- Krober A., Seiler T., Benner A., Bullinger L., Bruckle E., Lichter P., Dohner H., Stilgenbauer S.** (2002) V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100, 1410-1416.
- Krug A., French A. R., Barchet W., Fischer J. A., Dzionek A., Pingel J. T., Orihuela M. M., Akira S., Yokoyama W. M., Colonna M.** (2004) TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.
- Kurt-Jones E. A., Chan M., Zhou S., Wang J., Reed G., Bronson R., Arnold M. M., Knipe D. M., Finberg R. W.** (2004) Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1315-1320.
- Kurt-Jones E. A., Popova L., Kwinn L., Haynes L. M., Jones L. P., Tripp R. A., Walsh E. E., Freeman M. W., Golenbock D. T., Anderson L. J., Finberg R. W.** (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1, 398-401.
- Kyriakis J. M., Avruch J.** (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.
- Laine J., Kunstle G., Obata T., Sha M., Noguchi M.** (2000) The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell* 6, 395-407.
- Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K. A., Monks B. G., Knetter C. F., Lien E., Nilsen N. J., Espevik T., Golenbock D. T.** (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5, 190-198.
- Latz E., Visintin A., Lien E., Fitzgerald K. A., Monks B. G., Kurt-Jones E. A., Golenbock D. T., Espevik T.** (2002) Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* 277, 47834-47843.
- Lavoie J. N., L'Allemain G., Brunet A., Muller R., Pouyssegur J.** (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the



p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271, 20608-20616.

- Lee H. H., Dadgostar H., Cheng Q., Shu J., Cheng G.** (1999) NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9136-9141.
- Lees O., Bene M. C., GEIL e. I. m. d.** (1998) Clusters de différenciation humains. Applications à la caractérisation des hémopathies (Paris: Biotem).
- Lehner M. D., Morath S., Michelsen K. S., Schumann R. R., Hartung T.** (2001) Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 166, 5161-5167.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M., Hoffmann J. A.** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Leporrier M., Chevret S., Cazin B., Boudjerra N., Feugier P., Desablens B., Rapp M. J., Jaubert J., Autrand C., Divine M., Dreyfus B., Maloum K., Travade P., Dighiero G., Binet J. L., Chastang C.** (2001) Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 98, 2319-2325.
- Li C., Zienkiewicz J., Hawiger J.** (2005) Interactive sites in the MyD88 Toll/interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling pathway. *J Biol Chem* 280, 26152-26159.
- Li S., Strelow A., Fontana E. J., Wesche H.** (2002) IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5567-5572.
- Li W., Zhang J., Flechner L., Hyun T., Yam A., Franke T. F., Pierce J. H.** (1999) Protein kinase C-alpha overexpression stimulates Akt activity and suppresses apoptosis induced by interleukin 3 withdrawal. *Oncogene* 18, 6564-6572.
- Lien E., Sellati T. J., Yoshimura A., Flo T. H., Rawadi G., Finberg R. W., Carroll J. D., Espevik T., Ingalls R. R., Radolf J. D., Golenbock D. T.** (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274, 33419-33425.
- Lin K., Sherrington P. D., Dennis M., Matrai Z., Cawley J. C., Pettitt A. R.** (2002) Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100, 1404-1409.
- Lin R., Heylbroeck C., Genin P., Pitha P. M., Hiscott J.** (1999) Essential role of interferon

- regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol Cell Biol* *19*, 959-966.
- Linsley P. S., Schelter J., Burchard J., Kibukawa M., Martin M. M., Bartz S. R., Johnson J. M., Cummins J. M., Raymond C. K., Dai H., Chau N., Cleary M., Jackson A. L., Carleton M., Lim L.** (2007) Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* *27*, 2240-2252.
- Liota E., Smith K. J., Buckley R., Menon P., Skelton H.** (2000) Imiquimod therapy for molluscum contagiosum. *J Cutan Med Surg* *4*, 76-82.
- Liu H., Perlman H., Pagliari L. J., Pope R. M.** (2001) Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation. *J Exp Med* *194*, 113-126.
- Liu N. S., O'Brien S.** (2004) Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol* *21*, 297-304.
- Longo P. G., Laurenti L., Gobessi S., Petlickovski A., Pelosi M., Chiusolo P., Sica S., Leone G., Efremov D. G.** (2007) The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* *21*, 110-120.
- Lotz M., Ranheim E., Kipps T. J.** (1994) Transforming growth factor beta as endogenous growth inhibitor of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med* *179*, 999-1004.
- Lozanski G., Heerema N. A., Flinn I. W., Smith L., Harbison J., Webb J., Moran M., Lucas M., Lin T., Hackbarth M. L., Proffitt J. H., Lucas D., Grever M. R., Byrd J. C.** (2004) Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* *103*, 3278-3281.
- Lund J., Sato A., Akira S., Medzhitov R., Iwasaki A.** (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* *198*, 513-520.
- Lund J. M., Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams N. C., Gale N. W., Iwasaki A., Flavell R. A.** (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 5598-5603.
- Lundin J., Porwit-MacDonald A., Rossmann E. D., Karlsson C., Edman P., Rezvany M. R., Kimby E., Osterborg A., Mellstedt H.** (2004) Cellular immune reconstitution after subcutaneous alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody, CAMPATH-1H) treatment as first-line therapy for B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* *18*,

484-490.

- Luo C., Zheng L.** (2000) Independent evolution of Toll and related genes in insects and mammals. *Immunogenetics* 51, 92-98.
- Malavasi F., Ferrero E. (reviewer: Lee H.C.)** Protein Reviews on the Web. The guide on CD38. Disponible sur : [http://mpr.nci.nih.gov/prow/guide/4279266\\_g.htm](http://mpr.nci.nih.gov/prow/guide/4279266_g.htm)
- Malinin N. L., Boldin M. P., Kovalenko A. V., Wallach D.** (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540-544.
- Maloum K., Davi F., Merle-Beral H., Pritsch O., Magnac C., Vuillier F., Dighiero G., Troussard X., Mauro F. F., Benichou J.** (2000) Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 96, 377-379.
- Mansson A., Adner M., Hockerfelt U., Cardell L. O.** (2006) A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology* 118, 539-548.
- Maraninchi D., Gluckman E., Blaise D., Guyotat D., Rio B., Pico J. L., Leblond V., Michallet M., Dreyfus F., Ifrah N., et al.** (1987) Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* 2, 175-178.
- Massari P., Henneke P., Ho Y., Latz E., Golenbock D. T., Wetzler L. M.** (2002) Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* 168, 1533-1537.
- Matsumoto M., Funami K., Tanabe M., Oshiumi H., Shingai M., Seto Y., Yamamoto A., Seya T.** (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171, 3154-3162.
- Matsumoto M., Kikkawa S., Kohase M., Miyake K., Seya T.** (2002) Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1364-1369.
- Matsushime H., Quelle D. E., Shurtleff S. A., Shibuya M., Sherr C. J., Kato J. Y.** (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14, 2066-2076.
- Matsuzawa A., Saegusa K., Noguchi T., Sadamitsu C., Nishitoh H., Nagai S., Koyasu S., Matsumoto K., Takeda K., Ichijo H.** (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 6, 587-592.
- Mattes J., Hulett M., Xie W., Hogan S., Rothenberg M. E., Foster P., Parish C.** (2003)

- Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med* 197, 387-393.
- Matutes E., Owusu-Ankomah K., Morilla R., Garcia Marco J., Houlihan A., Que T. H., 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.
- Matzinger P.** (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305.
- Maurer U., Charvet C., Wagman A. S., Dejardin E., Green D. R.** (2006) Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21, 749-760.
- McCarron K. F., Hammel J. P., Hsi E. D.** (2000) Usefulness of CD79b expression in the diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 113, 805-813.
- McHeyzer-Williams M. G.** (2003) B cells as effectors. *Curr Opin Immunol* 15, 354-361.
- McSweeney P. A., Niederwieser D., Shizuru J. A., Sandmaier B. M., Molina A. J., Maloney D. G., Chauncey T. R., Gooley T. A., Hegenbart U., Nash R. A., Radich J., Wagner J. L., Minor S., Appelbaum F. R., Bensinger W. I., Bryant E., Flowers M. E., Georges G. E., Grumet F. C., Kiem H. P., Torok-Storb B., Yu C., Blume K. G., Storb R. F.** (2001) Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 97, 3390-3400.
- McWhirter S. M., Fitzgerald K. A., Rosains J., Rowe D. C., Golenbock D. T., Maniatis T.** (2004) IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 233-238.
- Means T. K., Wang S., Lien E., Yoshimura A., Golenbock D. T., Fenton M. J.** (1999) Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 163, 3920-3927.
- Medzhitov R., Janeway C. A., Jr.** (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A., Jr.** (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S., Janeway C. A., Jr.** (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2, 253-258.
- Melchjorsen J., Jensen S. B., Malmgaard L., Rasmussen S. B., Weber F., Bowie A. G.,**

- Matikainen S., Paludan S. R.** (2005) Activation of Innate Defense against a Paramyxovirus Is Mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a Cell-Type-Specific Manner. *J Virol* 79, 12944-12951.
- Messmer B. T., Messmer D., Allen S. L., Koltz J. E., Kudalkar P., Cesar D., Murphy E. J., Koduru P., Ferrarini M., Zupo S., Cutrona G., Damle R. N., Wasil T., Rai K. R., Hellerstein M. K., Chiorazzi N.** (2005) In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 115, 755-764.
- Meyer T., Nindl I., Schmook T., Ulrich C., Sterry W., Stockfleth E.** (2003) Induction of apoptosis by Toll-like receptor-7 agonist in tissue cultures. *Br J Dermatol* 149 Suppl 66, 9-14.
- Meylan E., Burns K., Hofmann K., Blancheteau V., Martinon F., Kelliher M., Tschopp J.** (2004) RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 5, 503-507.
- Michallet A. S., Nicolini F., Michallet M.** (2003) [Alloreactive donor lymphocytes (DLI) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT): study of toxicity and efficacy]. *Bull Cancer* 90, 758-762.
- Michallet M., Dhedin N., Michallet A. S.** (2001) [Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for hematological malignancies]. *Bull Cancer* 88, 908-926.
- Miconnet I., Koenig S., Speiser D., Krieg A., Guillaume P., Cerottini J. C., Romero P.** (2002) CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol* 168, 1212-1218.
- Miller R. L., Gerster J. F., Owens M. L., Slade H. B., Tomai M. A.** (1999) Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 21, 1-14.
- Mohty M., Isnardon D., Charbonnier A., Lafage-Pochitaloff M., Merlin M., Sainty D., Olive D., Gaugler B.** (2002) Generation of potent T(h)1 responses from patients with lymphoid malignancies after differentiation of B lymphocytes into dendritic-like cells. *Int Immunol* 14, 741-750.
- Murphy R. F.** (1996) Flow Cytometry and Sorting Part 1  
Disponible sur <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/theory/fluiopti/sld035.htm>
- Molica S., Levato D., Cascavilla N., Levato L., Musto P.** (1999a) Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 62, 117-122.
- Molica S., Vitelli G., Levato D., Levato L., Dattilo A., Gandolfo G. M.** (1999b) Clinico-

- biological implications of increased serum levels of interleukin-8 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 84, 208-211.
- Mond J. J., Feuerstein N., June C. H., Balapure A. K., Glazer R. I., Witherspoon K., Brunswick M.** (1991) Bimodal effect of phorbol ester on B cell activation. Implication for the role of protein kinase C. *J Biol Chem* 266, 4458-4463.
- Monick M. M., Carter A. B., Flaherty D. M., Peterson M. W., Hunninghake G. W.** (2000) Protein kinase C zeta plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J Immunol* 165, 4632-4639.
- Montillo M., Hamblin T., Hallek M., Montserrat E., Morra E.** (2005) Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 90, 391-399.
- Montserrat E., Rozman C.** (1995) Chronic lymphocytic leukemia: present status. *Ann Oncol* 6, 219-235.
- Montserrat E., Sanchez-Bisono J., Vinolas N., Rozman C.** (1986) Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 62, 567-575.
- Moore K. W., de Waal Malefyt R., Coffman R. L., O'Garra A.** (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.
- Morabito F., Filangeri M., Callea I., Sculli G., Callea V., Fracchiolla N. S., Neri A., Brugiattelli M.** (1997) Bcl-2 protein expression and p53 gene mutation in chronic lymphocytic leukemia: correlation with in vitro sensitivity to chlorambucil and purine analogs. *Haematologica* 82, 16-20.
- Moreton P., Hillmen P.** (2003) Alemtuzumab therapy in B-cell lymphoproliferative disorders. *Semin Oncol* 30, 493-501.
- Morgan E., Varro R., Sepulveda H., Ember J. A., Apgar J., Wilson J., Lowe L., Chen R., Shivraj L., Agadir A., Campos R., Ernst D., Gaur A.** (2004) Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol* 110, 252-266.
- Morris E., Thomson K., Craddock C., Mahendra P., Milligan D., Cook G., Smith G. M., Parker A., Schey S., Chopra R., Hatton C., Tighe J., Hunter A., Peggs K., Linch D., Goldstone A., Mackinnon S.** (2004) Outcomes after alemtuzumab-containing reduced-intensity allogeneic transplantation regimen for relapsed and refractory non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 104, 3865-3871.
- Moshynska O., Sankaran K., Pahwa P., Saxena A.** (2004) Prognostic significance of a

- short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 96, 673-682.
- Mosmann T. R., Coffman R. L.** (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Moynagh P. N.** (2005) TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 26, 469-476.
- Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'Amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L. P., Allavena P., Mantovani A.** (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164, 5998-6004.
- Muzio M., Polentarutti N., Bosisio D., Manoj Kumar P. P., Mantovani A.** (2000) Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 28, 563-566.
- Nagasaki M., Morikawa S., Torii I., Zhang J., Morikawa K.** (2000) A human B-lineage dendritic cell line, HBM-noda and its potential role in human T-cell leukemia/lymphoma virus type I infection. *Pathol Int* 50, 280-290.
- Nakaya T., Sato M., Hata N., Asagiri M., Suemori H., Noguchi S., Tanaka N., Taniguchi T.** (2001) Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 1150-1156.
- Nguyen D. T., Amess J. A., Doughty H., Hendry L., Diamond L. W.** (1999) IDEC-C2B8 anti-CD20 (rituximab) immunotherapy in patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma and lymphoproliferative disorders: evaluation of response on 48 patients. *Eur J Haematol* 62, 76-82.
- Nguyen H., Gitig D. M., Koff A.** (1999) Cell-free degradation of p27(kip1), a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome. *Mol Cell Biol* 19, 1190-1201.
- Nilsson J. A., Cleveland J. L.** (2003) Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22, 9007-9021.
- Nishiya T., DeFranco A. L.** (2004) Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* 279, 19008-19017.
- Nishiya T., Kajita E., Miwa S., Defranco A. L.** (2005) TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem* 280, 37107-37117.
- O'Brien S., del Giglio A., Keating M.** (1995) Advances in the biology and treatment of B-

- cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 85, 307-318.
- O'Brien S. M., Kantarjian H. M., Thomas D. A., Cortes J., Giles F. J., Wierda W. G., Koller C. A., Ferrajoli A., Browning M., Lerner S., Albitar M., Keating M. J.** (2003) Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 98, 2657-2663.
- Oganesyan G., Saha S. K., Guo B., He J. Q., Shahangian A., Zarnegar B., Perry A., Cheng G.** (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439, 208-211.
- Ohashi K., Burkart V., Flohe S., Kolb H.** (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164, 558-561.
- Okamura Y., Watari M., Jerud E. S., Young D. W., Ishizaka S. T., Rose J., Chow J. C., Strauss J. F., 3rd** (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276, 10229-10233.
- O'Neill L. A., Fitzgerald K. A., Bowie A. G.** (2003) The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 24, 286-290.
- Orchard J. A., Ibbotson R. E., Davis Z., Wiestner A., Rosenwald A., Thomas P. W., Hamblin T. J., Staudt L. M., Oscier D. G.** (2004) ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 363, 105-111.
- Osaki M., Kase S., Adachi K., Takeda A., Hashimoto K., Ito H.** (2004) Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 8-14.
- Osaki M., Oshimura M., Ito H.** (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9, 667-676.
- Oscier D., Fegan C., Hillmen P., Illidge T., Johnson S., Maguire P., Matutes E., Milligan D.** (2004) Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 125, 294-317.
- Oscier D. G., Gardiner A. C., Mould S. J., Glide S., Davis Z. A., Ibbotson R. E., Corcoran M. M., Chapman R. M., Thomas P. W., Copplestone J. A., Orchard J. A., Hamblin T. J.** (2002) Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 100, 1177-1184.
- Oscier D. G., Thompsett A., Zhu D., Stevenson F. K.** (1997) Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood* 89, 4153-4160.



- Osterborg A., Werner A., Halapi E., Lundin J., Harmenberg U., Wigzell H., Mellstedt H.** (1997) Clonal CD8+ and CD52- T cells are induced in responding B cell lymphoma patients treated with Campath-1H (anti-CD52). *Eur J Haematol* 58, 5-13.
- Ozinsky A., Underhill D. M., Fontenot J. D., Hajjar A. M., Smith K. D., Wilson C. B., Schroeder L., Aderem A.** (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-13771.
- Parish C. R.** (1999) Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 77, 499-508.
- Park J. S., Svetkauskaite D., He Q., Kim J. Y., Strassheim D., Ishizaka A., Abraham E.** (2004) Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 279, 7370-7377.
- Pekarsky Y., Koval A., Hallas C., Bichi R., Tresini M., Malstrom S., Russo G., Tsihchlis P., Croce C. M.** (2000) Tc11 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3028-3033.
- Pekarsky Y., Santanam U., Cimmino A., Palamarchuk A., Efanov A., Maximov V., Volinia S., Alder H., Liu C. G., Rassenti L., Calin G. A., Hagan J. P., Kipps T., Croce C. M.** (2006) Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 66, 11590-11593.
- Pepper C., Hoy T., Bentley D. P.** (1997) Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 76, 935-938.
- Perry A. K., Chow E. K., Goodnough J. B., Yeh W. C., Cheng G.** (2004) Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med* 199, 1651-1658.
- Pillai S., Cariappa A., Moran S. T.** (2005) Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23, 161-196.
- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M. Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B.** (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Rai K. R., Peterson B. L., Appelbaum F. R., Kolitz J., Elias L., Shepherd L., Hines J., Threatte G. A., Larson R. A., Cheson B. D., Schiffer C. A.** (2000) Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N*

Engl J Med 343, 1750-1757.

**Rai K. R., Sawitsky A.** (1987) A review of the prognostic role of cytogenetic, phenotypic, morphologic, and immune function characteristics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* 12, 327-338.

**Rai K. R., Sawitsky A., Cronkite E. P., Chanana A. D., Levy R. N., Pasternack B. S.** (1975) Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46, 219-234.

**Raisova M., Hossini A. M., Eberle J., Riebeling C., Wieder T., Sturm I., Daniel P. T., Orfanos C. E., Geilen C. C.** (2001) The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* 117, 333-340.

**Ranheim E. A., Kipps T. J.** (1993) Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* 177, 925-935.

**Ranheim E. A., Kipps T. J.** (1995) Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) and CD54 on human B cells by activated T cells: complex regulation by IL-4, IL-10, and CD40L. *Cell Immunol* 161, 226-235.

**Rassa J. C., Meyers J. L., Zhang Y., Kudaravalli R., Ross S. R.** (2002) Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2281-2286.

**Rassenti L. Z., Huynh L., Toy T. L., Chen L., Keating M. J., Gribben J. G., Neuberg D. S., Flinn I. W., Rai K. R., Byrd J. C., Kay N. E., Greaves A., Weiss A., Kipps T. J.** (2004) ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 351, 893-901.

**Read S., Powrie F.** (2001) CD4(+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 13, 644-649.

**Redaelli A., Laskin B. L., Stephens J. M., Botteman M. F., Pashos C. L.** (2004) The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)* 13, 279-287.

**Ridge J. P., Di Rosa F., Matzinger P.** (1998) A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.

**Ries L. A. G., Melbert D., Krapcho M., Mariotto A., Miller B. A., Feuer E. J., Clegg L., Horner M. J., Howlander N., Eisner M. P., Reichman M., Edwards B. K.** (2007) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute (Bethesda).  
Disponibile sur <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>

**Ringshausen I., Schneller F., Bogner C., Hipp S., Duyster J., Peschel C., Decker T.** (2002)

- Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* *100*, 3741-3748.
- Robertson L. E., Plunkett W., McConnell K., Keating M. J., McDonnell T. J.** (1996) Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* *10*, 456-459.
- Robinson S. P., Goldstone A. H., Mackinnon S., Carella A., Russell N., de Elvira C. R., Taghipour G., Schmitz N.** (2002) Chemo-resistant or aggressive lymphoma predicts for a poor outcome following reduced-intensity allogeneic progenitor cell transplantation: an analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation. *Blood* *100*, 4310-4316.
- Rock F. L., Hardiman G., Timans J. C., Kastelein R. A., Bazan J. F.** (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 588-593.
- Rosenberg S. A., Yang J. C., Schwartzentruber D. J., Hwu P., Marincola F. M., Topalian S. L., Restifo N. P., Dudley M. E., Schwarz S. L., Spiess P. J., Wunderlich J. R., Parkhurst M. R., Kawakami Y., Seipp C. A., Einhorn J. H., White D. E.** (1998) Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* *4*, 321-327.
- Rossi E., Matutes E., Morilla R., Owusu-Ankomah K., Heffernan A. M., Catovsky D.** (1996) Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *10*, 494-497.
- Rothe G., Schmitz G.** (1996) Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* *10*, 877-895.
- Rozman C., Montserrat E.** (1995) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* *333*, 1052-1057.
- Ruffini P. A., Neelapu S. S., Kwak L. W., Biragyn A.** (2002) Idiotypic vaccination for B-cell malignancies as a model for therapeutic cancer vaccines: from prototype protein to second generation vaccines. *Haematologica* *87*, 989-1001.
- Saegusa K., Yotsumoto S., Kato S., Aramaki Y.** (2007) Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of IL-10 and IL-12 production in macrophages stimulated with CpG oligodeoxynucleotide. *Molecular Immunology* *44*, 1323-1330.
- Sagaert X., De Wolf-Peeters C.** (2003) Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental

- lineage. *Immunol Lett* 90, 179-186.
- Sakaguchi S.** (2004) Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22, 531-562.
- Salasche S.** (2002) Imiquimod 5% cream: a new treatment option for basal cell carcinoma. *Int J Dermatol* 41 Suppl 1, 16-20.
- Salisbury J. R., Rapson N. T., Codd J. D., Rogers M. V., Nethersell A. B.** (1994) Immunohistochemical analysis of CDw52 antigen expression in non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol* 47, 313-317.
- Sarfati M., Chevret S., Chastang C., Biron G., Stryckmans P., Delespesse G., Binet J. L., Merle-Beral H., Bron D.** (1996) Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 88, 4259-4264.
- Sarkar S. N., Peters K. L., Elco C. P., Sakamoto S., Pal S., Sen G. C.** (2004) Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1060-1067.
- Sasai M., Oshiumi H., Matsumoto M., Inoue N., Fujita F., Nakanishi M., Seya T.** (2005) Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* 174, 27-30.
- Schön M., Bong A. B., Drewniok C., Herz J., Geilen C. C., Reifenberger J., Benninghoff B., Slade H. B., Gollnick H., Schön M. P.** (2003) Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst* 95, 1138-1149.
- Schön M. P., Schön M.** (2004a) Immune modulation and apoptosis induction: two sides of the antitumoral activity of imiquimod. *Apoptosis* 9, 291-298.
- Schön M. P., Schön M., Klotz K. N.** (2006) The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7- and TLR8-independent fashion. *J Invest Dermatol* 126, 1338-1347.
- Schön M. P., Wienrich B. G., Drewniok C., Bong A. B., Eberle J., Geilen C. C., Gollnick H., Schön M.** (2004b) Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Invest Dermatol* 122, 1266-1276.
- Schonwasser D. C., Marais R. M., Marshall C. J., Parker P. J.** (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 18, 790-798.

- Schultze J. L., Michalak S., Seamon M. J., Dranoff G., Jung K., Daley J., Delgado J. C., Gribben J. G., Nadler L. M.** (1997) CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* *100*, 2757-2765.
- Schwandner R., Dziarski R., Wesche H., Rothe M., Kirschning C. J.** (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* *274*, 17406-17409.
- Schweighoffer E., Vanes L., Mathiot A., Nakamura T., Tybulewicz V. L.** (2003) Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity* *18*, 523-533.
- Shanafelt T. D., Geyer S. M., Kay N. E.** (2004) Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* *103*, 1202-1210.
- Shanafelt T. D., Witzig T. E., Fink S. R., Jenkins R. B., Paternoster S. F., Smoley S. A., Stockero K. J., Nast D. M., Flynn H. C., Tschumper R. C., Geyer S., Zent C. S., Call T. G., Jelinek D. F., Kay N. E., Dewald G. W.** (2006) Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* *24*, 4634-4641.
- Shapiro P. S., Vaisberg E., Hunt A. J., Tolwinski N. S., Whalen A. M., McIntosh J. R., Ahn N. G.** (1998) Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J Cell Biol* *142*, 1533-1545.
- Sharkey N. A., Blumberg P. M.** (1986) Comparison of the activity of phorbol 12-myristate 13-acetate and the diglyceride glycerol 1-myristate 2-acetate. *Carcinogenesis* *7*, 677-679.
- Sharma S., tenOever B. R., Grandvaux N., Zhou G. P., Lin R., Hiscott J.** (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* *300*, 1148-1151.
- Shibuya H., Yamaguchi K., Shirakabe K., Tonegawa A., Gotoh Y., Ueno N., Irie K., Nishida E., Matsumoto K.** (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* *272*, 1179-1182.
- Shumack S., Robinson J., Kossard S., Golitz L., Greenway H., Schroeter A., Andres K., Amies M., Owens M.** (2002) Efficacy of topical 5% imiquimod cream for the treatment of nodular basal cell carcinoma: comparison of dosing regimens. *Arch Dermatol* *138*, 1165-1171.

- Shustik C., Mick R., Silver R., Sawitsky A., Rai K., Shapiro L.** (1988) Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation. *Hematol Oncol* 6, 7-12.
- Sidbury R., Neuschler N., Neuschler E., Sun P., Wang X. Q., Miller R., Tomai M., Puscasiu E., Gugneja S., Paller A. S.** (2003) Topically applied imiquimod inhibits vascular tumor growth in vivo. *J Invest Dermatol* 121, 1205-1209.
- Slack J. L., Schooley K., Bonnert T. P., Mitcham J. L., Qwarnstrom E. E., Sims J. E., Dower S. K.** (2000) Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 275, 4670-4678.
- Slavin S., Or R., Aker M., Shapira M. Y., Panigrahi S., Symeonidis A., Cividalli G., Nagler A.** (2001) Nonmyeloablative stem cell transplantation for the treatment of cancer and life-threatening nonmalignant disorders: past accomplishments and future goals. *Cancer Chemother Pharmacol* 48 Suppl 1, S79-84.
- Smiley S. T., King J. A., Hancock W. W.** (2001) Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167, 2887-2894.
- Smith M. F., Jr., Mitchell A., Li G., Ding S., Fitzmaurice A. M., Ryan K., Crowe S., Goldberg J. B.** (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 278, 32552-32560.
- Song J., Salek-Ardakani S., Rogers P. R., Cheng M., Van Parijs L., Croft M.** (2004) The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nat Immunol* 5, 150-158.
- Sozeri O., Vollmer K., Liyanage M., Frith D., Kour G., Mark G. E., 3rd, Stabel S.** (1992) Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 7, 2259-2262.
- Spaner D. E., Miller R. L., Mena J., Grossman L., Sorrenti V., Shi Y.** (2005) Regression of lymphomatous skin deposits in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with the Toll-like receptor-7/8 agonist, imiquimod. *Leuk Lymphoma* 46, 935-939.
- Spaner D. E., Shi Y., White D., Mena J., Hammond C., Tomic J., He L., Tomai M. A., Miller R. L., Booth J., Radvanyi L.** (2006) Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 20, 286-295.
- Stephanou A., Latchman D. S.** (2005) Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 23, 177-182.

- Stockfleth E., Meyer T., Benninghoff B., Salasche S., Papadopoulos L., Ulrich C., Christophers E.** (2002) A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5% imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. *Arch Dermatol* 138, 1498-1502.
- Stockinger B., Veldhoen M.** (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19, 281-286.
- Sullivan G. W., Linden J.** (1998) Role of A2A adenosine receptors in inflammation. *Drug Development Research* 45, 103-112.
- Sullivan T. P., Dearaujo T., Vincek V., Berman B.** (2003) Evaluation of superficial basal cell carcinomas after treatment with imiquimod 5% cream or vehicle for apoptosis and lymphocyte phenotyping. *Dermatol Surg* 29, 1181-1186.
- Sun X. M., MacFarlane M., Zhuang J., Wolf B. B., Green D. R., Cohen G. M.** (1999) Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 5053-5060.
- Suzuki H., Matsuda S., Terauchi Y., Fujiwara M., Ohteki T., Asano T., Behrens T. W., Kouro T., Takatsu K., Kadowaki T., Koyasu S.** (2003) PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat Immunol* 4, 280-286.
- Suzuki N., Suzuki S., Duncan G. S., Millar D. G., Wada T., Mirtsos C., Takada H., Wakeham A., Itie A., Li S., Penninger J. M., Wesche H., Ohashi P. S., Mak T. W., Yeh W.-C.** (2002) Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750-756.
- Suzuki N., Suzuki S., Yeh W. C.** (2002) IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol* 23, 503-506.
- Tabeta K., Georgel P., Janssen E., Du X., Hoebe K., Crozat K., Mudd S., Shamel L., Sovath S., Goode J., Alexopoulou L., Flavell R. A., Beutler B.** (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3516-3521.
- Takaesu G., Kishida S., Hiyama A., Yamaguchi K., Shibuya H., Irie K., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K.** (2000) TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 5, 649-658.
- Takaoka A., Yanai H., Kondo S., Duncan G., Negishi H., Mizutani T., Kano S., Honda K., Ohba Y., Mak T. W., Taniguchi T.** (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243-249.

- Takeda K., Kaisho T., Akira S.** (2003) TOLL-LIKE RECEPTORS. Annual Review of Immunology *21*, 335-376.
- Takeuchi O., Akira S.** (2001) Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. Int Immunopharmacol *1*, 625-635.
- Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Takeda K., Akira S.** (1999) TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. Gene *231*, 59-65.
- Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R. L., Akira S.** (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J Immunol *169*, 10-14.
- Taniguchi T., Takaoka A.** (2002) The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. Curr Opin Immunol *14*, 111-116.
- Taub D. D., Anver M., Oppenheim J. J., Longo D. L., Murphy W. J.** (1996) T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. J Clin Invest *97*, 1931-1941.
- Termeer C., Benedix F., Sleeman J., Fieber C., Voith U., Ahrens T., Miyake K., Freudenberg M., Galanos C., Simon J. C.** (2002) Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. J Exp Med *195*, 99-111.
- Thomas W. D., Hersey P.** (1998) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. J Immunol *161*, 2195-2200.
- Tomai M. A., Imbertson L. M., Stanczak T. L., Tygrett L. T., Waldschmidt T. J.** (2000) The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. Cell Immunol *203*, 55-65.
- Triantafyllou K., Orthopoulos G., Vakakis E., Ahmed M. A., Golenbock D. T., Lepper P. M., Triantafyllou M.** (2005) Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. Cell Microbiol *7*, 1117-1126.
- Trojan A., Schultze J. L., Witzens M., Vonderheide R. H., Ladetto M., Donovan J. W., Gribben J. G.** (2000) Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies. Nat Med *6*, 667-672.



- Tsan M. F., Gao B.** (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76, 514-519.
- Uddin S., Hussain A. R., Siraj A. K., Manogaran P. S., Al-Jomah N. A., Moorji A., Atizado V., Al-Dayel F., Belgaumi A., El-Solh H., Ezzat A., Bavi P., Al-Kuraya K. S.** (2006) Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* 108, 4178-4186.
- Ueda Y., Hirai S., Osada S., Suzuki A., Mizuno K., Ohno S.** (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 271, 23512-23519.
- Ulevitch R. J., Tobias P. S.** (1999) Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 11, 19-22.
- Underhill D. M., Ozinsky A., Smith K. D., Aderem A.** (1999) Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14459-14463.
- Vabulas R. M., Ahmad-Nejad P., da Costa C., Miethke T., Kirschning C. J., Hacker H., Wagner H.** (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 276, 31332-31339.
- Vabulas R. M., Ahmad-Nejad P., Ghose S., Kirschning C. J., Issels R. D., Wagner H.** (2002a) HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277, 15107-15112.
- Vabulas R. M., Braedel S., Hilf N., Singh-Jasuja H., Herter S., Ahmad-Nejad P., Kirschning C. J., Da Costa C., Rammensee H. G., Wagner H., Schild H.** (2002b) The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* 277, 20847-20853.
- Valencia-Sanchez M. A., Liu J., Hannon G. J., Parker R.** (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20, 515-524.
- Van den Hove L. E., Van Gool S. W., Vandenberghe P., Bakkus M., Thielemans K., Boogaerts M. A., Ceuppens J. L.** (1997) CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules. *Leukemia* 11, 572-580.
- van Duin D., Medzhitov R., Shaw A. C.** (2006) Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in Immunology* 27, 49-55.

- Vessiere-Louveaux F. M., Hijmans W., Schuit H. R.** (1980) Presence of multiple isotypes on the surface of human tonsillar lymphocytes. *Eur J Immunol* *10*, 186-191.
- Viau M., Zouali M.** (2005) B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clin Immunol* *114*, 17-26.
- Vidal D., Matias-Guiu X., Alomar A.** (2004) Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki67, p53 and basal cell carcinoma apoptosis. *Br J Dermatol* *151*, 656-662.
- von Krogh G.** (2001) Management of anogenital warts (condylomata acuminata). *Eur J Dermatol* *11*, 598-603; quiz 604.
- von Krogh G., Lacey C. J., Gross G., Barrasso R., Schneider A.** (2000) European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex Transm Infect* *76*, 162-168.
- Vrhovac R., Delmer A., Tang R., Marie J. P., Zittoun R., Ajchenbaum-Cymbalista F.** (1998) Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* *91*, 4694-4700.
- Vuillier F., Maloum K., Thomas E. K., Magnac C., Dumas G., Payelle-Brogard B., Opezzo P., Dighiero G., Scott-Algara D.** (2003) Idiotype-pulsed dendritic cells are able to induce antitumoral cytotoxic CD8 cells in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* *120*, 243-250.
- Wagner H.** (2002) Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* *5*, 62-69.
- Wagner M., Poeck H., Jahrsdoerfer B., Rothenfusser S., Prell D., Bohle B., Tuma E., Giese T., Ellwart J. W., Endres S., Hartmann G.** (2004) IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J Immunol* *172*, 954-963.
- Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G. R., Inoue J., Chen Z. J.** (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* *412*, 346-351.
- Wang Z., Karras J. G., Colarusso T. P., Foote L. C., Rothstein T. L.** (1997) Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol* *180*, 162-167.
- Weiner G. J.** (2000) The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol* *68*, 455-463.
- Werts C., Tapping R. I., Mathison J. C., Chuang T. H., Kravchenko V., Saint Girons I., Haake D. A., Godowski P. J., Hayashi F., Ozinsky A., Underhill D. M., Kirschning C. J., Wagner H., Aderem A., Tobias P. S., Ulevitch R. J.** (2001) Leptospiral

- lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2, 346-352.
- Whelan R. D., Parker P. J.** (1998) Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene* 16, 1939-1944.
- Wiestner A., Rosenwald A., Barry T. S., Wright G., Davis R. E., Henrickson S. E., Zhao H., Ibbotson R. E., Orchard J. A., Davis Z., Stetler-Stevenson M., Raffeld M., Arthur D. C., Marti G. E., Wilson W. H., Hamblin T. J., Oscier D. G., Staudt L. M.** (2003) ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101, 4944-4951.
- Wietek C., Miggin S. M., Jefferies C. A., O'Neill L. A.** (2003) Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR) 4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF-kappa. *J Biol Chem* 278, 50923-50931.
- Wing M. G., Moreau T., Greenwood J., Smith R. M., Hale G., Isaacs J., Waldmann H., Lachmann P. J., Compston A.** (1996) Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcgammaRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *J Clin Invest* 98, 2819-2826.
- Wyllie D. H., Kiss-Toth E., Visintin A., Smith S. C., Boussouf S., Segal D. M., Duff G. W., Dower S. K.** (2000) Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 165, 7125-7132.
- Xia M. Q., Hale G., Waldmann H.** (1993) Efficient complement-mediated lysis of cells containing the CAMPATH-1 (CDw52) antigen. *Mol Immunol* 30, 1089-1096.
- Xu Y., Tao X., Shen B., Horng T., Medzhitov R., Manley J. L., Tong L.** (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408, 111-115.
- Yamaguchi K., Shirakabe K., Shibuya H., Irie K., Oishi I., Ueno N., Taniguchi T., Nishida E., Matsumoto K.** (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., Akira S.** (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K., Akira S.** (2002) Essential role for

- TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-329.
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Uematsu S., Hoshino K., Kaisho T., Takeuchi O., Takeda K., Akira S.** (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 1144-1150.
- Yanagihara E. T., Blaisdell R. K., Hayashi T., Lukes R. J.** (1989) Malignant lymphoma in Hawaii-Japanese: a retrospective morphologic survey. *Hematol Oncol* 7, 219-232.
- Yap G., Pesin M., Sher A.** (2000) Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 165, 628-631.
- Yasuda K., Yu P., Kirschning C. J., Schlatter B., Schmitz F., Heit A., Bauer S., Hochrein H., Wagner H.** (2005) Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 174, 6129-6136.
- Yasukawa M., Shiroguchi T., Inatsuki A., Kobayashi Y.** (1988) Antigen presentation in an HLA-DR-restricted fashion by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 72, 102-108.
- Yellin M. J., Sinning J., Covey L. R., Sherman W., Lee J. J., Glickman-Nir E., Sippel K. C., Rogers J., Cleary A. M., Parker M., et al.** (1994) T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity. *J Immunol* 153, 666-674.
- Yi A. K., Chang M., Peckham D. W., Krieg A. M., Ashman R. F.** (1998) CpG oligodeoxynucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol* 160, 5898-5906.
- Yi A. K., Hornbeck P., Lafrenz D. E., Krieg A. M.** (1996) CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J Immunol* 157, 4918-4925.
- Yi A. K., Peckham D. W., Ashman R. F., Krieg A. M.** (1999) CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway. *Int Immunol* 11, 2015-2024.
- Yin M. B., Guo B., Panadero A., Frank C., Wrzosek C., Slocum H. K., Rustum Y. M.** (1999) Cyclin E-cdk2 activation is associated with cell cycle arrest and inhibition of DNA replication induced by the thymidylate synthase inhibitor Tomudex. *Exp Cell Res* 247, 189-199.

- Yip-Schneider M. T., Miao W., Lin A., Barnard D. S., Tzivion G., Marshall M. S.** (2000) Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J* 351, 151-159.
- Yoshimura A., Lien E., Ingalls R. R., Tuomanen E., Dziarski R., Golenbock D.** (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163, 1-5.
- Youinou P., Jamin C., Lydyard P. M.** (1999) CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol Today* 20, 312-316.
- Yuille M. R., Matutes E., Marossy A., Hilditch B., Catovsky D., Houlston R. S.** (2000) Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* 109, 794-799.
- Zarembek K. A., Godowski P. J.** (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168, 554-561.
- Zhang G., Ghosh S.** (2002) Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 277, 7059-7065.
- Zhong R. K., Donnenberg A. D., Zhang H. F., Watkins S., Zhou J. H., Ball E. D.** (1999) Human blood dendritic cell-like B cells isolated by the 5G9 monoclonal antibody reactive with a novel 220-kDa antigen. *J Immunol* 163, 1354-1362.
- Zilber M. T., Gregory S., Mallone R., Deaglio S., Malavasi F., Charron D., Gelin C.** (2000) CD38 expressed on human monocytes: a coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2840-2845.
- Zou H., Li Y., Liu X., Wang X.** (1999) An APAF-1·Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.
- Zucchetto A., Sonogo P., Degan M., Bomben R., Dal Bo M., Russo S., Attadia V., Rupolo M., Buccisano F., Steffan A., Del Poeta G., Pucillo C., Colombatti A., Campanini R., Gattei V.** (2005) Surface-antigen expression profiling (SEP) in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): Identification of markers with prognostic relevance. *J Immunol Methods* 305, 20-32.
- Zwaveling S., Ferreira Mota S. C., Nouta J., Johnson M., Lipford G. B., Offringa R., van der Burg S. H., Melief C. J.** (2002) Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 169, 350-358.



Nom : Mademoiselle GRANDJENETTE

Prénom : Cindy

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

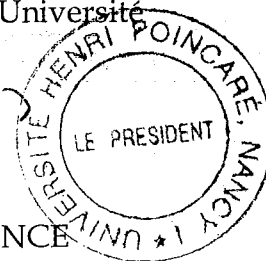
Spécialité : *BIOLOGIE CELLULAIRE ET NUTRITION*

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le 21 juillet 2008

Le Président de l'Université

Jean-Pierre FINANCE



Nom : Madame **MOBY-STUTZMANN**

Prénom : **Vanessa**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1**

En **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : **INGÉNIERIE CELLULAIRE ET TISSULAIRE**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le 31/3/08

Le Président de l'Université



Jean-Pierre FINANCE

