



HAL
open science

Actualisation de la physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique et nouvelles cibles thérapeutiques

Laurène Zimmer

► **To cite this version:**

Laurène Zimmer. Actualisation de la physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique et nouvelles cibles thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02945269

HAL Id: dumas-02945269

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02945269>

Submitted on 22 Sep 2020

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.

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le 18/09/2020

Par M^{lle} Laurène ZIMMER

Née le 26/08/1994

À Aix-en-Provence

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---oOo---

ACTUALISATION DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE ET NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES

---oOo---

JURY :

Président : Madame le Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE
Membres : Monsieur le Professeur Régis COSTELLO
Madame le Docteur Yaël BERDA HADDAD (Directrice de Thèse)
Monsieur le Professeur Romaric LACROIX (Co-Directeur de Thèse)
Madame le Docteur Véronique GELSI-BOYER

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

Remerciements

Je tiens à exprimer en tout premier lieu ma reconnaissance aux membres du Jury :

A Madame le Professeur DIGNAT-GEORGE, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assurée de ma sincère gratitude et de mon plus profond respect.

A mes directeurs de thèse,

le Docteur Yaël BERDA-HADDA et le Professeur Romaric LACROIX, qui m'ont fait l'honneur de co-encadrer ce travail thèse. Merci pour votre soutien, votre disponibilité, vos conseils, et vos encouragements. Je vous remercie de m'avoir guidé tout au long de ce travail et de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions.

Merci Yaël de m'avoir fait confiance en acceptant d'être ma directrice de thèse, merci pour toutes tes relectures, pour le temps que tu m'as accordé ainsi que pour ton enthousiasme, ta patience et ta bienveillance durant cette année de thèse.

Merci Romaric pour votre aide précieuse, pour vos idées et conseils avisés. Je vous remercie pour votre implication non seulement dans ce travail de thèse mais aussi et surtout dans mon parcours durant ces sept dernières années.

Soyez assurés tous les deux de mon profond respect et de ma plus grande reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Régis COSTELLO, je vous remercie de me faire l'honneur de siéger dans ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de ma sincère gratitude et de mon plus profond respect.

A Madame le Docteur Véronique GELSI-BOYER, je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de juger ce travail. Soyez assurée de ma profonde gratitude et de ma grande considération.

Je tiens également à remercier **le Docteur Shirley FRITZ** pour son implication dans ce travail. Merci pour ta relecture et tes conseils ainsi que pour le partage de tes connaissances durant le semestre dernier.

Je remercie évidemment ma famille sans qui rien de tout cela ne serait possible.

A mes parents, merci pour votre soutien sans faille depuis toujours. Merci à ma mère pour son dévouement sans limite et nos discussions si réconfortantes. Tu as vécu chaque épreuve de mon parcours comme si c'était le tien et je ne te remercierai jamais assez. Merci à mon père pour son implication et son aide dans ma scolarité depuis mon plus jeune âge ainsi que pour ses précieux conseils et ses encouragements pendant les moments de doutes.

Je ne peux que vous dédier ce travail à tous les deux, ma réussite est aussi la vôtre et ce diplôme est l'aboutissement de plusieurs années de dur labeur auxquelles vous avez contribué de tant de façons !

A ma sœur Pauline, mon petit rayon de soleil, merci pour ton soutien, ton réconfort et ces nombreuses heures à travailler ensemble que tu rendais tellement plus agréable.

A mes grand-mères, dont la fierté dans leur regard m'a aidé à ne jamais baisser les bras.

A ma cousine Audrey, ma colocataire de toujours. Merci pour ta joie de vivre quotidienne et pour toutes ces heures à travailler ensemble et à se soutenir.

A toi Franck, mon réconfort quotidien. Un grand merci pour ta patience et ton soutien durant toutes ces années de concours et d'examen mais surtout pour cette année de thèse ou tu en avais parfois plus marre que moi ! Merci pour ton aide précieuse en informatique mais surtout merci pour ta capacité à savoir me faire relativiser quand il le faut et pour ton enthousiasme à m'aider dès que tu le peux. Etre confiné avec moi et ma thèse n'a pas dû tous les jours être facile mais merci beaucoup d'être aussi formidable.

Je remercie aussi mes grands amis du lycée (qui se reconnaîtront), ainsi que ceux des copains d'abord sans oublier mes copines de pharmacie, ainsi que ma plus vieille amie Kelly, qui savent, tous à leur façon si bien m'entourer, me soutenir et m'encourager.

Enfin je remercie mes co internes que j'ai eu la chance de rencontrer durant les différents semestres réalisés, et qui ont donné naissance à de belles amitiés. Je remercie particulièrement Afaf et Charlaïne avec qui j'ai travaillé de près cette thèse et bien sur celles sans qui cet internat ne serait pas le même : Clara, Pauline, Camille et sans oublier les Fils !

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Table des matières

<i>Remerciements</i>	9
<i>Liste des abbréviations</i>	3
<i>Liste des Figures</i>	6
<i>Liste des Tableaux</i>	7
<i>Introduction</i>	9
<i>I. Diagnostic, Pronostic et Stratégie thérapeutique de la Leucémie Lymphoïde Chronique</i>	10
1. Définition	10
2. Épidémiologie	11
3. Diagnostic	12
3.1 Numération Formule Sanguine (NFS)	12
3.2 Le frottis sanguin.....	13
3.3 L'immunophénotypage	15
3.4 Principaux diagnostics différentiels	16
3.5 Examens complémentaires	18
4. Évolution de la maladie	18
4.1 Complications auto-immunes.....	18
4.2 Complications infectieuses.....	19
4.3 Transformations.....	20
4.4 Cancers solides associés	21
5. Marqueurs pronostiques	21
5.1 Anomalies cytogénétiques et mutation TP53	21
5.2 Statut IGVH.....	24
5.3 Marqueurs phénotypiques	25
5.4 Marqueurs sériques.....	26
5.5 Temps de doublement des lymphocytes (TDL)	28
5.6 Classifications pronostiques	28
6. Stratégie thérapeutique	31
6.1 Indication thérapeutique	31
6.2 Stratégie thérapeutique pour le traitement de 1 ^{ère} ligne.....	32
6.3 Définition de la rechute et de la maladie réfractaire	35
6.4 La maladie résiduelle dans la LLC.....	37
6.4.1 Définition de la maladie résiduelle minimale (MRD).....	37
6.4.2 Méthodes de détection de la MRD dans la LLC	38
6.4.3 Évaluation de la maladie résiduelle après traitement dans les essais cliniques.....	40
6.4.4 Intérêt et utilisation de la maladie résiduelle post greffe.....	41
6.5 Traitement des patients en rechute ou réfractaire.....	42
6.6 Place de l'allogreffe.....	44

II. Physiopathologie de la LLC et nouvelles cibles thérapeutiques 47

1. Physiopathologie.....	47
1.1 Génétique.....	47
1.1.1 Altérations chromosomiques :.....	47
1.1.2 Mutations somatiques.....	50
1.1.3 Epigénétique.....	53
1.1.4 Altération des microARN (miR).....	54
1.2 Voies de signalisations du BCR.....	55
1.2.1 La maturation B et la signalisation du BCR en situation physiologique.....	55
1.2.2 La signalisation du BCR dans la LLC.....	57
1.3 Rôle du microenvironnement.....	59
1.4 Résistance à l'apoptose.....	62
1.4.1 Voie de l'apoptose dépendante des caspases.....	62
1.4.2 Voie de l'apoptose dépendante des caspases dans la LLC.....	63
1.5 Le potentiel d'oxydo-réduction des cellules de LLC.....	64
2. Cibles et stratégies thérapeutiques issues des connaissances sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la LLC.....	66
2.1 Stratégies thérapeutiques non spécifiques de la physiopathologie de la LLC.....	66
2.1.1 Agents cytotoxiques.....	66
2.1.2 Marqueurs transmembranaires des lymphocytes B et thérapies ciblées associées.....	67
2.2 Stratégies thérapeutiques issues des connaissances récentes sur la physiopathologie de la LLC.....	76
2.2.1 Inhibition de la voie de signalisation du BCR.....	76
2.2.2 Cibles thérapeutiques impliquées dans la modulation des interactions avec le microenvironnement.....	83
2.2.3 Cibles thérapeutiques impliquées dans les stratégies d'induction de l'apoptose.....	90
2.2.1 Stratégies de renforcement de l'immunité anti tumorale.....	103

III. Le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire..... 110

1. Stress oxydatif des cellules de la LLC.....	110
2. Le rôle de l'ALDH (Aldhyde Deshydrogénase) et ses principaux inhibiteurs.....	112
3. Le diméthyl ampal thiolester (DIMATE) dans la leucémie aiguë myéloïde.....	114
4. Nouvelle stratégie thérapeutique : Le diméthyl ampal thiolester (DIMATE) dans la LLC.....	115

IV. Discussion..... 118

Bibliographie..... 122

Serment de Galien..... 144

Liste des abréviations:

ADCC:	Antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AHAI :	Anémie hémolytique auto-immune
ALDH :	Aldehyde deshydrogenase
AMM :	Autorisation de mise sur le marché
APAF:	Apoptotic peptidase activating factor
APRIL:	A proliferation inducing ligand
ARID1A:	AT-rich interaction domain 1a
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
ASO:	Allele-specific oligonucleotide
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutated
BAD:	BCL2/BCL-XL-antagonist, causing cell death
BAFF:	B-cell activating factor
BAK:	BCL2-antagonist/killer 1
BAX:	BCL2-associated X protein
BCL2:	B-cell leukemia/Lymphoma 2
BCL-XL:	BCL2-like 1
BCR:	B-cell Receptor
BCRi:	inhibiteurs de la voie du BCR
BID:	BH3 interacting domain death agonist
BIRC3:	Baculoviral IAP repeat-containing protein3
BR:	Bendamustine Rituximab
BTK:	Bruton Tyrosine Kinase
CAR-T:	Chimeric Antigen Receptor
CCL19:	Chemokine (C-C motif) ligand 19
CCND1:	Cycline D1
CCR7:	Chemokine (C-C motif) receptor 7
CD :	Cluster de Différentiation
CD23s :	CD23 soluble
CDC:	Complement Dependant Cytotoxicity
CDK:	Cyclin Dependant Kinase
CDKN2A:	Cyclin Dependant Kinase inhibitor 2A
CHD2:	Chromodomain Helicase DNA binding protein 2
CIRS:	Cumulative Illness rating Scale
CLL-IPI:	CLL International Prognostic Index
CMF :	Cytométrie en Flux
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTLA-4 :	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CXCL12 :	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCR4 :	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DCT :	Diminution de la Charge Tumorale
DDX3X:	DEAD Box Helicase 3 X-Linked
EBMT:	European Society for Blood and Marrow Transplant Society
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
EZH2:	Enhancer of zeste homolog 2

FAS: Fas cell surface death receptor
 FBXW7: F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase
 FISH: Hybridation in Situ par Fluorescence
 GVH: Greffon versus hôte
 HCL: hairy cell leukemia
 HDAC: Histone Désacétylase
 HLA: Human leukocyte antigen
 HSP70: Heat shock protein 70
 IAP: Inhibitor of apoptosis protein
 IGH: Immunoglobulin Heavy
 IGVH: Immunoglobulin Variable region Heavy chain
 IKZF3: IKAROS Family Zinc Finger 3
 IL2: Interleukin 2
 IL15: Interleukin 15
 IWCLL: International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
 JAK : Janus kinase
 LBDGC : Lymphome B diffuse à grande cellule
 LDH : Lactate dehydrogenase
 LF : lymphome folliculaire
 LNH : Lymphome non hodgkinien
 LPL : Leucémie prolymphocytaire
 LLC/LPL : LLC prolymphocytoïde
 LZM : Lymphome de la zone marginale
 MAPK : Mitogen activated protein kinase
 LLC : Leucémie lymphoïde chronique
 MBL : Lymphocytose B monoclonale
 MCL-1: Myeloid Cell Leukemia 1
 M-CLL: muted CLL
 MDA : Malondialdéhyde
 MDM2 : Murine Double Minute 2
 MEK : MAP/ERK kinase
 MiRNA : micro-RNA
 MP : Maladie Progressive
 MRD: Minimal Residual Disease
 MTOR: Mechanistic target of rapamycin
 MS: Maladie Stable
 MSC: Mesenchymal stem cells
 MYD88: Myeloid differentiation primary response 88
 NFAT: Nuclear factor of activated T-cells
 NFkB: Nuclear factor kappa B
 NFS: Numération Formule sanguine
 NGS: Next Generation Sequencing
 NK: natural killer
 NLC: Nurse Like cells
 NOTCH1: Notch1
 NOXA: NADPH oxidase activator
 PARP: Poly (ADP-ribose) polymérase
 PBS: Phosphate buffered saline
 PCR: Reaction de polymérisation en Chaîne
 PD-1: Programmed Cell Death 1

PEITC: PhénéthylIsothiocyanate
 PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
 PKC: Protéine kinase C
 PLC γ : Phospholipase C γ
 PKB/AKT: Protéine kinase B
 POT1: Protection of telomeres 1
 PUMA: p53-upregulated modulator of apoptosis
 RC : Réponse complète
 RFC : Rituximab Fludarabine Cyclophosphamide
 RG : Réponse Globale
 ROS : Reactive oxygen species
 RP : Réponse Partielle
 R/R : Rechute/Réfractaire
 RO : Réponse Objective
 ROR1: Receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1
 RN : Réponse Nodale
 RND : Réponse Nodale Partielle
 RT-PCR: Real time polymerase chain reaction
 SF3B1: Splicing Factor 3B subunit 1
 SLL: Small lymphocytic leukemia
 SG: Survie Globale
 SHIP1: SRC Homology-2 domain containing Inositol 5-Phosphatase
 SMAC: Second Mitochondrial derived Activator of Caspases
 SMG : Survie Médiane Globale
 SOD : Superoxyde dismutase
 SSP : Survie Sans Progression
 SST: Survie Sans Traitement
 STAT: Signal transducer and activator of transcription
 SYK: Spleen tyrosine kinase
 TCL1: T-cell leukemia/lymphoma 1
 TCR : T-cell Receptor
 TDL : Temps de doublement lymphocytaire
 TK: Thymidine Kinase
 TLR: Toll Like Receptor
 TNF: Tumor necrosis factor
 TP53: Tumor Protein 53
 U-CLL: unmutated-CLL
 XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein
 XPO1: Exportine 1
 ZAP-70 : Zêta Associated Protein-70

Liste des Figures

FIGURE 1 : FROTTIS SANGUIN MONTRANT DE PETITS LYMPHOCYTES DE LA LLC TYPIQUE D'ASPECT BIEN DIFFERENCIE ASSOCIES A UNE OMBRE DE GÜMPRECHT (MICROSCOPIE OPTIQUE X50).	14
FIGURE 2 : FROTTIS SANGUIN MONTRANT DES PROLYMPHOCYTES ET DES CELLULES CLIVEES (MICROSCOPIE OPTIQUE X50).	14
FIGURE 3 : IMPACT DES PRINCIPALES ANOMALIES CYTOGENETIQUES SUR LA SURVIE DES PATIENTS ATTEINTS DE LLC, D'APRES DÖHNER ET AL., 2000.	22
FIGURE 4 : IMPACT DU NOMBRE D'ANOMALIES CYTOGENETIQUES SUR LA SURVIE DE PATIENTS ATTEINTS DE LLC SANS TENIR COMPTE DES ANOMALIES TP53 ET EN PRESENCE DE MUTATIONS TP53, D'APRES BALIAKAS ET AL., 2019	23
FIGURE 5 : DIFFERENTES ETAPES DE LA QUANTIFICATION PAR PCR CLONOSPÉCIFIQUE	39
FIGURE 6 : LOCALISATION GENOMIQUE DE MIR-15/MIR-16-1 DANS LA PARTIE MINIMALE DELETEDE DU CHROMOSOME 13 ADAPTE D'APRES MJ RAMAIAH ET AL 2018.....	48
FIGURE 7 : SCHEMA ILLUSTRANT LA REGULATION NEGATIVE DE L'EXPRESSION DES GENES BCL-2, MCL-1 ET CCND1 PAR MIR-15/MIR-16-1 ET LE MECANISME DE RETROACTION ENTRE MIR-15/ MIR-16-1 ET TP53.	48
FIGURE 8 : SCHEMA DES DIFFERENTES MUTATIONS SOMATIQUES ET DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA LLC D'APRES KIPPS ET AL. 2017.	51
FIGURE 9 : SCHEMA DES VOIES DE SIGNALISATION AFFECTEES PAR LES ANOMALIES MOLECULAIRES LES PLUS FREQUENTES DANS LA LLC ET IMPLICATIONS CLINIQUES DE CES MUTATIONS GENIQUES D'APRES ROSSI ET AL 2016.....	53
FIGURE 10 : VOIES DE SIGNALISATION DU BCR D'APRES TEN HACKEN ET BURGER, 2016.....	57
FIGURE 11 : DIFFERENCE ENTRE LA VOIE DE SIGNALISATION DES CELLULES M-CLL ET CELLE DES CELLULES U-CLL D'APRES TEN HACKEN ET BURGER, 2016 149	58
FIGURE 12 : LE MICROENVIRONNEMENT DES CELLULES DE LLC D'APRES KIPPS ET AL., 2017	60
FIGURE 13 : SCHEMA DES MECANISMES REGULANT HIF-1A DANS LA LLC, SELON MARTINA SEIFFERT HEMATOLOGICA 2020	61
FIGURE 14 : VOIES APOPTOTIQUES INTRINSEQUE ET EXTRINSEQUE CASPASES DEPENDANTES, ADAPTE D'APRES S.YOKOBORI ET AL 2014	63
FIGURE 15 : SCHEMA DES DIFFERENTS MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES IMPLIQUES DANS LA PATHOGENESE DE LA LLC.....	65
FIGURE 16 : THERAPIES CIBLEES DES DIFFERENTS EFFECTEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU BCR DANS LA LLC, SCHEMA ADAPTE D'APRES TEN HACKEN ET BURGER, 2016	82
FIGURE 17 : CIBLAGE DE RECEPTEURS TRANSMEMBRANAIRES DE LA CELLULE LLC ET DE LEUR LIGAND EN TANT QUE STRATEGIE THERAPEUTIQUE DANS LA LLC	89
FIGURE 18 : MECANISME D'ACTION DES CDK7 ET 9 SUR LA TRANSCRIPTION ET STRATEGIE D'INHIBITION DES CDKS POUR DIMINUER LA TRANSCRIPTION DES FACTEURS ANTIAPOPTOTIQUES, SCHEMA ADAPTE D'APRES BLACHLY ET AL., 2016	94
FIGURE 19 : CIBLAGE DES DIFFERENTES VOIES D'INDUCTION DE L'APOPTOSE EN TANT QUE STRATEGIE THERAPEUTIQUE DANS LA LLC, SCHEMA ADAPTE D'APRES BREMER ET AL., 2006	102
FIGURE 20 : LA GENERATION DE ROS ET D'ENZYMES ANTIOXYDANTES IMPLIQUEES DANS LA PATHOGENESE DES MBL ET LLC D'APRES COLLADO ET AL., 2012	111
FIGURE 21 : ROLE DE L'ALDH DANS L'EPURATION DES ALDEHYDES TOXIQUES, ADAPTE D'APRES RODRIGUEZ-ZAVALA ET AL., 2019	113

Liste des Tableaux

TABLEAU 1 :	DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS B BASE SUR LES MARQUEURS PHENOTYPIQUES	17
TABLEAU 2 :	REPARTITION DES PRINCIPALES ANOMALIES CYTOGENETIQUES DANS LA LLC	22
TABLEAU 3 :	CLASSIFICATION DE RAI SELON RAI ET AL	28
TABLEAU 4 :	CLASSIFICATION DE RAI MODIFIEE SELON SCARFO ET AL.....	29
TABLEAU 5 :	CLASSIFICATION DE BINET SELON BINET ET AL.....	29
TABLEAU 6 :	CLASSIFICATION DE ROSSI SELON ROSSI ET AL.....	30
TABLEAU 7 :	CRITERES ET CALCUL DU CLL-IPI SELON THE INTERNATIONAL CLL WORKING GROUP71	30
TABLEAU 8 :	CATEGORIES DE RISQUE ET SURVIE SANS TRAITEMENT SELON LE SCORE CLL-IPI 71	31
TABLEAU 9 :	RECOMMANDATIONS SUR LA 1ERE LIGNE DE TRAITEMENT DE LA LLC ADAPTE SELON KIPPS ET AL, 2019.	34
TABLEAU 10 :	CRITERES DE REPONSE COMPLETE, PARTIELLE ET DE MALADIE PROGRESSIVE SELON L'IWCLL 2018.....	36
TABLEAU 11 :	CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES METHODES D'EVALUATION DE LA MRD101.....	40
TABLEAU 12 :	RECOMMANDATIONS SUR LA 2EME LIGNE DE TRAITEMENT DE LA LLC ADAPTE SELON KIPPS ET AL.	43
TABLEAU 13 :	RESULTATS D'ETUDES RANDOMISEES SUR LE RITUXIMAB, LE CHLORAMBUCIL, LA BENDAMUSTINE, L'OBINUTUZUMAB, L'IBRUTINIB, L'IDELALISIB ET LE VENETOCLAX, D'APRES KIPPS ET AL., 2019	44
TABLEAU 14 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES ANTI CD20 AYANT L'AMM DANS LA LLC.	68
TABLEAU 15 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'UBLITUXIMAB.....	69
TABLEAU 16 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'ALEMTUZUMAB.....	70
TABLEAU 17 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES ANTICORPS ANTI CD19.....	71
TABLEAU 18 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES ANTICORPS ANTI CD22.....	72
TABLEAU 19 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'ANTI CD23, LUMILIXIMAB.	73
TABLEAU 20 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'ANTI CD74, MILATUZUMAB.....	74
TABLEAU 21 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES ANTI CD37.	75
TABLEAU 22 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'ENSEMBLE DES INHIBITEURS DE LA BTK TESTES DANS LA LLC.....	78
TABLEAU 23 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'ENSEMBLE DES INHIBITEURS DE LA PI3 KINASE TESTES DANS LA LLC	80
TABLEAU 24 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES INHIBITEURS DE LA LYN KINASE.....	81
TABLEAU 25 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES INHIBITEURS DE LA TYROSINE KINASE SYK	82
TABLEAU 26 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'ENSEMBLE DES MOLECULES IMPACTANT LES INTERACTIONS DES CELLULES DE LLC AVEC LE MICROENVIRONNEMENT.	88
TABLEAU 27 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES BH3 MIMETIQUES.....	92
TABLEAU 28 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'ENSEMBLE DES INHIBITEURS DES CDK.....	95

TABLEAU 29 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'ENSEMBLE DES INHIBITEURS DES KINASES ERK ET AKT.....	96
TABLEAU 30 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS TESTES DANS LA LLC.....	98
TABLEAU 31 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE L'ENSEMBLE DES INHIBITEURS DE L'ENSEMBLE DES HDACI.....	99
TABLEAU 32 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DU CARFILZOMIB.....	100
TABLEAU 33 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES INHIBITEURS DU PARP.....	101
TABLEAU 34 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DE NUTLIN-3A.....	101
TABLEAU 35 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES INHIBITEURS DE HSP90.....	102
TABLEAU 36 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DU PEMBROLIZUMAB.....	104
TABLEAU 37 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DU MONALIZUMAB ET DU LIRILUMAB.....	105
TABLEAU 38 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DU SAMALIZUMAB.....	106
TABLEAU 39 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES D'UN ANTI CD32B.....	107
TABLEAU 40 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES DES AGONISTES DU TLR.....	108
TABLEAU 41 :	SYNTHESE DES ESSAIS CLINIQUES D'INTERLEUKINES RECOMBIANTES.....	109
TABLEAU 42 :	PROTOCOLE DE CYTOMETRIE EN FLUX, DU MARQUAGE CELLULAIRE A L'ACQUISITION SUR CYTOFLEX.....	116

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte en France. Cette hémopathie est, généralement, de bon pronostic mais l'évolution est très hétérogène. L'elligibilité au traitement dépend du stade de la maladie. Le traitement de la LLC a longtemps reposé sur la chimiothérapie par agents analogues des purines et alkylants, associée à l'immunothérapie ciblée par anti-CD20, avec l'introduction du Rituximab en 1998. Cependant ces traitements ne ciblent pas spécifiquement les lymphocytes B pathologiques et engendrent, de ce fait, une cytotoxicité non négligeable. Au cours de ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension de la biologie de la LLC et plus particulièrement dans les mécanismes physiopathologiques impliqués, ce qui a permis l'émergence de nombreuses thérapies ciblées. Ces nouveaux agents thérapeutiques très efficaces, associés à une meilleure caractérisation de la pathologie sur le plan moléculaire, ont significativement amélioré la survie à long terme des patients. Cependant, à ce jour, aucun traitement ne permet une rémission complète et durable et les récurrences sont fréquentes. Par conséquent, la découverte de nouveaux mécanismes impliqués dans les voies de survie des cellules de LLC, pourrait aboutir à de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes pour la prise en charge des patients atteints de LLC et notamment ceux ayant des facteurs de mauvais pronostic.

Ce travail aura pour objectif de faire un point bibliographique sur les connaissances actuelles concernant les différentes cibles thérapeutiques de la LLC.

Nous décrirons dans une première partie de thèse, les connaissances actuelles disponibles sur la démarche diagnostique, les marqueurs à visée pronostique et les dernières recommandations sur les stratégies thérapeutiques dans la prise en charge de la LLC.

La seconde partie permettra, après un rappel sur les différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans la pathogénèse de la LLC, de détailler les cibles thérapeutiques qui sont directement liées à ces mécanismes physiopathologiques et qui ont permis le développement de thérapies ciblées. Cette partie se limitera aux cibles thérapeutiques ayant fait l'objet de développement de thérapies évaluées ou en cours d'évaluation dans des essais cliniques.

Enfin dans une troisième partie, nous nous focaliserons plus particulièrement sur une cible thérapeutique potentielle liée à la survie cellulaire que constitue le potentiel d'oxydoréduction des cellules de la LLC. Ce mécanisme pourrait également contribuer au développement de nouvelles thérapies permettant de cibler plus spécifiquement les cellules malignes. Cette stratégie fait actuellement l'objet d'un essai clinique en cours au CHU de la Conception dans lequel je me suis personnellement impliquée au cours de mon stage d'hématologie.

I. Diagnostic, Pronostic et Stratégie thérapeutique de la Leucémie Lymphoïde Chronique

1. Définition

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une hémopathie maligne définie par l'accumulation et la prolifération de lymphocytes B monoclonaux matures dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes. Selon les critères d'IWCLL 2008 et 2018 (International Workshop on CLL)^{1,2}, la lymphocytose sanguine monoclonale doit être supérieure à 5 G/L et persistante plus de 3 mois. Les lymphocytes de LLC présentent un aspect cytologique et des marqueurs membranaires particuliers : ils expriment les marqueurs panB (CD19 et CD20), présentent une expression diminuée des marqueurs CD22, CD79b et de la chaîne légère restreinte de l'immunoglobuline, co-expiment le CD5 et le CD23 et n'expriment pas le marqueur FMC7. Le score de Matutes est établi selon la présence ou l'absence de ces marqueurs. La LLC est définie par un score de Matutes supérieur ou égal à 4.^{3,4}

D'après la classification OMS des tumeurs hématopoïétiques, la LLC est associée à deux entités très proches : le lymphome lymphocytaire (Small Lymphocytic Leukemia, SLL) et le lymphome B monoclonale (score de Matutes = 4/5). La LLC et le SLL sont considérés comme une même entité, la différence portant sur une présentation principalement leucémique pour la LLC et une présentation principalement lymphomateuse pour le SLL. En effet, le SLL est défini par la présence de lymphadénopathies et/ou d'une splénomégalie associée à une infiltration de cellules B monoclonales présentant un immunophénotypage similaire aux cellules de la LLC, mais avec une absence de lymphocytose dans le sang périphérique. Le diagnostic doit être confirmé sur l'examen histopathologique d'une biopsie des ganglions lymphatiques ou d'une

biopsie des autres tissus.⁵ D'autre part, en l'absence de manifestations auto-immunes, de syndrome tumoral et de cytopénies, la mise en évidence d'un clone de lymphocytes B inférieur à 5 G/L présentant un phénotype caractéristique de LLC, définit la lymphocytose B monoclonale (Monoclonal B Lymphocytosis (MBL)) dont la progression vers une LLC est estimée à 1 à 2 % par an.⁶ Il s'agit de la phase « pré-leucémique » de la LLC, des études de cohortes ayant montré que la MBL précède toujours le diagnostic de LLC.⁷

2. Épidémiologie

La LLC représente 30% de toutes les leucémies et est la plus fréquente des leucémies de l'adulte dans les pays occidentaux. L'incidence standardisée estimée sur la population mondiale est de 4,4 pour 100 000 personnes-année chez l'homme et de 2,2 pour 100 000 personnes-année chez la femme, avec une fréquence élevée en Europe et en Amérique du Nord et beaucoup plus rare en Asie et en Afrique.⁸ La France compte 4 500 nouveaux cas incidents estimés en 2012 (environ 2 700 chez les hommes et 1 800 chez les femmes).⁸ Son incidence augmente avec l'âge avec plus de 44% des cas survenant chez les plus de 75 ans et seuls de rares cas surviennent avant 30 ans. L'âge médian au diagnostic est de 71 ans chez l'homme et 74 ans chez la femme avec une prédominance masculine : elle affecte l'homme dans 56,5%.^{9,8}

Certaines études de population ont montré une survie globale nettement meilleure chez les femmes que chez les hommes quel que soit le groupe d'âge.^{10, 11} En effet, la survie nette à 5 et 10 ans est plus élevée chez la femme que chez l'homme : 81% contre 76% à 5 ans et 62% contre 53% à 10 ans. Par ailleurs, elle diminue avec l'âge avec, dans la cohorte des femmes, une survie nette à 5 ans estimée à 93% pour les patientes de 45 à 55 ans contre 66% chez les patientes de plus de 75 ans¹². L'évolution clinique de la LLC est hétérogène : un tiers de la population ne nécessitera jamais de traitement, un tiers sera symptomatique et nécessitera un traitement d'emblée, et le dernier tiers sera traité au cours du suivi.¹³ De plus, certaines études supposent fortement l'existence d'une prédisposition génétique dans la LLC avec des cas de LLC « familiale ». Dans l'étude de Yuille et al, des antécédants familiaux de trouble lymphoprolifératif chez un parent du premier degré ont été décrits chez 12% des patients atteints de LLC.¹⁴ Dans les familles avec des individus affectés sur deux générations, une diminution de l'âge au diagnostic a été observée avec la description d'un phénomène d'anticipation.¹⁵ Les parents au premier degré de patients atteints de LLC présentent un risque 8,5 fois plus élevé de développer cette maladie.¹⁶ D'autre part, des cellules monoclonales présentant le phénotype

aberrant retrouvé sur les cellules de LLC, CD5+CD19+, sont détectées chez 3,5% des personnes en bonne santé avec une NFS normale. Ce contingent B monoclonal minoritaire est encore plus répandu dans les familles de patients atteints de LLC et serait donc indicatif d'une prédisposition héréditaire.¹⁷

3. Diagnostic

Le diagnostic de LLC se fait dans plus de 80% des cas de manière fortuite, devant une lymphocytose anormale sur la numération formule sanguine chez un patient asymptomatique. Dans de plus rares cas, le patient peut présenter dès le diagnostic des signes évocateurs : des adénopathies périphériques, une splénomégalie, une anémie et/ou une thrombopénie. Ces manifestations peuvent s'accompagner de signes cliniques non spécifiques tels que des sueurs nocturnes, une altération de l'état général, une fièvre, une perte de poids, etc... La présence d'adénopathies et/ou de cytopénies représente la base de la classification clinique en 3 stades établie par JL Binet en 1981.¹⁸ Le diagnostic exige la persistance de lymphocytes B ≥ 5 G/L dans le sang périphérique pendant au moins 3 mois et devra être établi sur la base d'un examen morphologique du frottis sanguin associé à un immunophénotypage des lymphocytes circulants par cytométrie en flux. En cas d'atypie morphologiques ou immunophénotypiques, la réalisation d'examens complémentaires (analyses cytogénétiques et moléculaires et /ou histologie ganglionnaire) est nécessaire pour éliminer d'autres syndromes lymphoprolifératifs. En effet avant de poser le diagnostic de la LLC, l'exploration phénotypique par le score de Matutes est indispensable afin d'écarter les autres syndromes lymphoprolifératifs B comme la leucémie à tricholeucocytes ou les disséminations sanguines d'un lymphome du manteau, d'un lymphome folliculaire, d'un lymphome de la zone marginale ou d'un lymphome splénique de la zone marginale.

3.1 Numération Formule Sanguine (NFS)

Le point d'appel de la LLC est une **hyperleucocytose franche entre 30 et 50 x10⁹/L avec lymphocytose (de 70 à 90 %)**. Cependant d'autres anomalies de la numération peuvent être associées. L'anémie est fréquente et peut avoir différentes origines : l'anémie hémolytique auto-immune, la séquestration splénique lors de la présence d'une splénomégalie ou encore l'érythroblastopénie. Une thrombopénie peut également être associée et son origine sera soit centrale, due à un défaut de production, soit périphérique.

3.2 Le frottis sanguin

Dans la forme typique de la LLC (cf.figure 1), on retrouve des lymphocytes matures d'aspect monomorphe, de petite taille, caractérisés par une étroite bordure de cytoplasme, homogène, faiblement basophile et dépourvu de granulation. Le noyau est dense, dépourvu de nucléole et présente des renforcements sombres nettement séparés par des espaces plus clairs, donnant une impression de mottes chromatiniennes. En parallèle, des noyaux nus sont souvent observés et correspondent à des ombres de Gümprrecht. Ils sont liés à l'écrasement des lymphocytes lors de la réalisation des frottis de sang, en raison d'un défaut de la vimentine, protéine du cytosquelette essentielle pour la rigidité et l'intégrité du lymphocyte. Il a été démontré qu'un pourcentage faible d'ombre de Gümprrecht ($\leq 20\%$) était un facteur pronostique défavorable.¹⁹ Un petit pourcentage de cellules atypiques : soit des cellules de plus grande taille présentant un nucléole, de type prolymphocyte, soit un contingent de cellules à noyau encoché ou à flexion plasmocytaire, peut être associé aux cellules typiques de la LLC. Ces cellules atypiques doivent représenter moins de 10% des lymphocytes pour les prolymphocytes et moins de 15% pour le second contingent.

Le concept de la LLC atypique a vu le jour dès 1989 par Bennett et coll. et décrit deux formes variantes à la LLC :

- la LLC/LPL caractérisée par la présence d'un contingent de prolymphocytes représentant entre 10 et 55% des lymphocytes totaux (cf.figure 2a). (La présence de plus de 55% de prolymphocytes sera en faveur du diagnostic de leucémie prolymphocytaire.)
- la LLC mixte avec un mélange de petits et de grands lymphocytes avec plus de 15% de lymphocytes à noyau encoché ou à flexion plasmocytaire (cf.figure 2b).^{20, 21}

Les variations morphologiques de la LLC atypique sont associées à une progression plus rapide de la LLC et à des caractéristiques immunophénotypiques et cytogénétiques différentes de celles habituellement décrites dans la LLC.²² Il a été démontré qu'une proportion significative de prolymphocytes circulants supérieure à 10% est associée à la présence d'aberrations génétiques de mauvais pronostic (mutation NOTCH1, absence de délétion 13q, Gènes IGVH non mutés etc...) et donc à une forme de LLC plus agressive, avec une transformation en lymphome de haut grade de malignité (syndrome de Richter) plus fréquente.²³

LLC typique :

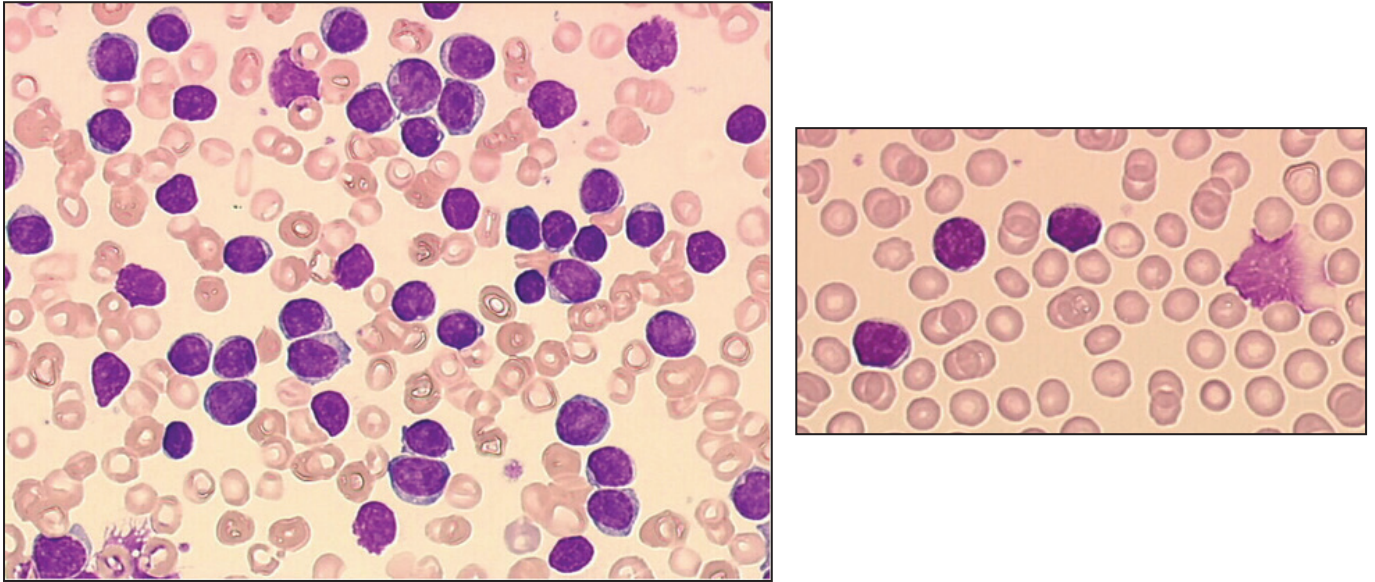


Figure 1 : Frottis sanguin montrant de petits lymphocytes de la LLC typique d'aspect bien différencié (1a, figure de gauche) associés à une ombre de Gümprécht (1b, figure de droite) (microscopie optique x50).

LLC atypique :

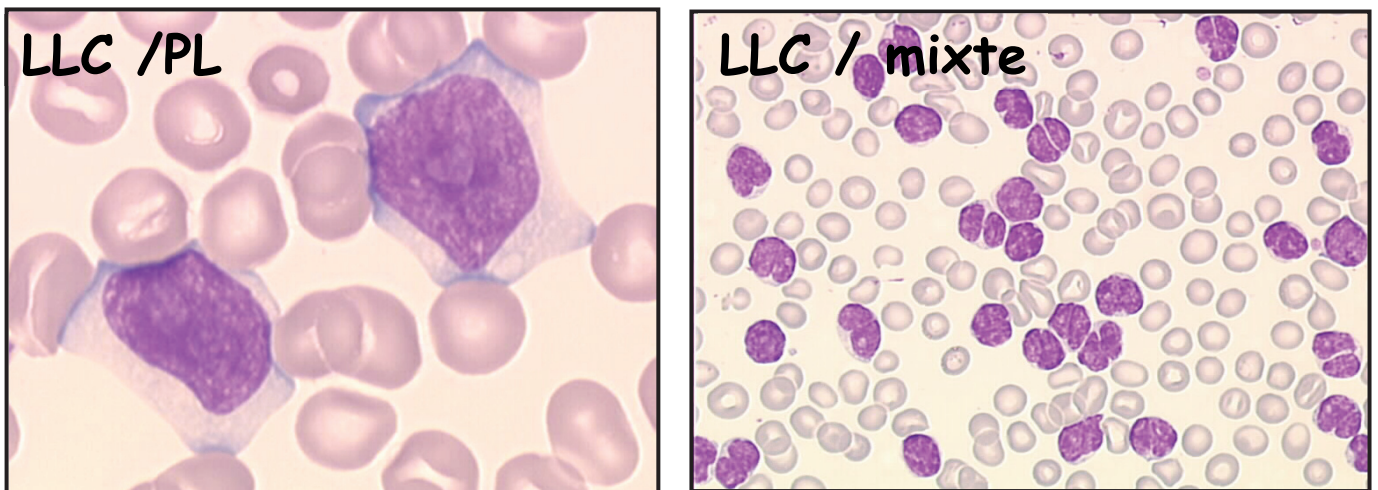


Figure 2 : Frottis sanguin montrant des prolymphocytes (2a, figure de gauche) et des cellules clivées (2b, figure de droite) (microscopie optique x50).

3.3 L'immunophénotypage

L'immunophénotypage des lymphocytes du sang, de la moelle ou des ganglions lymphatiques, réalisé en cytométrie en flux (CMF), permet de confirmer la monoclonalité des lymphocytes B et de distinguer la LLC des autres types de syndromes lymphoprolifératifs B. Les cellules de LLC co-expriment l'antigène de surface CD5 des lymphocytes T (également présent à la surface de certaines cellules B auto-réactives), les antigènes de surface CD19, CD20, CD22, caractéristiques de la lignée B, et le CD23 qui est un récepteur de faible affinité pour les IgE. Chaque clone de cellule leucémique est caractérisé par l'expression d'un seul type de chaînes légères d'immunoglobuline (Ig) kappa (κ) ou lambda (λ). L'expression du CD20, du CD22, du CD79b et des immunoglobulines de surface (IgM avec ou sans IgD) par le clone leucémique est plus faible à la surface des cellules de LLC que des lymphocytes B normaux. Le FMC7 est absent contrairement à la plupart des autres syndromes lymphoprolifératifs B.

Le Docteur Estella Matutes a mis en place un score en 1994, modifié en 1997, permettant de diagnostiquer une LLC, basé sur 5/6 marqueurs immunophénotypiques^{3,4} :

- La co-expression des marqueurs CD5 et CD23 fortement exprimés
- La faible expression de l'Ig de surface monotypique kappa ou lambda
- La faible expression du CD22 et du CD79b
- L'absence de FMC7

Ce score varie de 0 à 5 selon la présence ou l'absence de ces différents marqueurs :

- Un score ≥ 4 est en faveur d'une LLC.
- Un score égal à 3 correspond à une « LLC atypique » : le diagnostic de LLC peut être retenu si le CD5, le CD23 sont positifs, si le CD20 est faible et après l'élimination des phases leucémiques du lymphome du manteau et du lymphome de la zone marginale.
- Un score < 3 exclut formellement le diagnostic de LLC et est en faveur d'une phase leucémique d'un autre syndrome lymphoprolifératif B chronique.

Un effort d'harmonisation récent a confirmé qu'un panel CD19, CD5, CD20, CD23, κ et λ est généralement suffisant pour établir le diagnostic et recommande dans les cas limites, afin d'affiner le diagnostic, les marqueurs suivants : le CD79b, le CD43, le CD200, le CD81, le CD10, le CD38, et le ROR1²⁴. Le CD43 et le CD200 sont fortement positifs dans la LLC, contrairement au CD81 qui est faiblement exprimé dans la LLC alors qu'il est présent physiologiquement à la surface de tous les lymphocytes B. Le CD200 représente un marqueur

important dans le diagnostic différentiel avec la phase leucémique du lymphome du manteau dans lequel il est négatif, et est particulièrement intéressant dans le cas des LLC atypiques avec un CD23 faible ou négatif. Une étude a proposé un algorithme en 2014 permettant de classer les néoplasies B matures en fonction de l'expression du CD200, du CD11c, du statut des chaînes lourdes d'immunoglobuline (IGH) et du score de Matutes. Dans cette étude, le CD11c était constamment négatif ou faiblement exprimé chez les patients atteints de lymphome du manteau, alors qu'il était exprimé dans un tiers des cas de LLC²⁵. Le CD10 est négatif dans la LLC mais est positif dans la phase leucémique du lymphome folliculaire, le lymphome B diffus à grandes cellules et le lymphome de Burkitt qui présentent généralement un profil CD5-/CD10+. Le CD38 n'est pas un marqueur de la lignée lymphoïde B, mais il est exprimé au cours de la maturation des lymphocytes B, principalement à la surface des lymphoplasmocytes et des plasmocytes. Dans la LLC, le CD38 est un marqueur de mauvais pronostic qui sera détaillé plus loin. Enfin, les cellules de la LLC de la plupart des patients expriment l'antigène de surface onco embryonnaire ROR1²⁶. Ce marqueur sera détaillé dans la 2^{ème} partie de la thèse.

3.4 Principaux diagnostics différentiels¹³

La présence d'une lymphocytose implique avant tout d'écarter un contexte réactionnel (infections virales) généralement caractérisé par une lymphocytose d'aspect polymorphe transitoire, et incitant à réaliser des sérologies. Si la chronicité de la lymphocytose est confirmée et/ou en cas d'anomalies cytologiques particulières, le diagnostic différentiel devra être réalisé avec les autres syndromes lymphoprolifératifs et la distinction sera basée sur l'analyse morphologique, l'immunophénotypage (cf. tableau 1) et l'analyse du caryotype. Les **autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B** comprennent :

- Le lymphome à cellules du manteau (LCM) : le diagnostic est à évoquer devant des cellules B monotypiques CD5+ et CD23- avec un score de Matutes ≤ 3 . La cellule classique du manteau est de taille moyenne avec un contour nucléaire irrégulier. La cycline D1 est surexprimée dans le LCM et mise en évidence en biologie moléculaire. Sur le caryotype, on retrouve la translocation t(11;14) (q13;q32) (IGH/ CCND1).
- La leucémie prolymphocytaire (LPL-B) : elle est rare, survient de novo ou au décours d'une LLC et est caractérisée par la présence de plus de 55% de prolymphocytes B dans le sang. Elle s'accompagne la plupart du temps d'une lymphocytose majeure (>100 G/L). La morphologie du prolymphocyte B se définit par une cellule de taille

moyenne avec un noyau régulier présentant un volumineux nucléole central. Le score de Matutes est < à 3.

- Le lymphome de la zone marginal (LZM) : la population lymphoïde est d'aspect hétérogène et les cellules lymphomateuses sont le plus souvent négatives pour le CD5 et le CD23 avec une forte expression du CD180 et du CD11c dans le LZM splénique.

- Le lymphome folliculaire (LF) : se définit par une infiltration médullaire fréquente mais un envahissement sanguin plus rare. Le frottis sanguin montre des cellules clivées qui sont phénotypiquement négatives pour le CD5 et le CD23 dans la plupart des cas avec une expression du CD10. La translocation t(14;18)(q32;q21) est très évocatrice et est associée à une hyperexpression de *BCL2*.

- La leucémie à tricholeucocytes (HCL : « Hairy Cell Leukemia ») : se définit par une prolifération de cellules lymphoïdes de taille intermédiaire, à cytoplasme étendu et peu basophile avec des prolongements donnant un aspect chevelu à la cellule. Le score de Matutes est en général égal à 0 et la positivité d'au moins 3 marqueurs sur 4 parmi les marqueurs suivants : CD25, CD103, CD11c et CD123 permet de poser le diagnostic.

L'expression des marqueurs phénotypiques permettant le diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs B est résumé dans le tableau 1 :

Marqueurs	LLC	LPL-B	LCM	LZM	HCL	LF
Ig de surface	+ faible	+++	+++	++	+++	++
CD19	+ faible	+	+	+	+	+
CD5	+	±	+	-/+	-	-
CD22	± faible	+	+	+	+	+
CD23	+	-	-	-	-	±
FMC7	-	+	+	+	+	+
CD79b	± faible	+	+	+	+	+
CD10	-	±	-	-	-	±
CD25	±	-	-	±	+	±
CD103	-	-	-	-	+	-
CD43	++	-	++	±	-	-
CD11c	±	-	-	±	+	±
CD200	++	±	-	±	++	+
CD180	±	-	±	++	-	-

Tableau 1 : Diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs B basé sur les marqueurs phénotypiques

3.5 Examens complémentaires

Myélogramme et Biopsie ostéo-médullaire

La réalisation d'un myélogramme ou d'une biopsie ostéo-médullaire n'est généralement pas utile au diagnostic. Le myélogramme présente généralement une infiltration par plus de 30% de cellules lymphoïdes matures et l'infiltration sur la biopsie médullaire est nodulaire au début de la maladie puis devient progressivement diffuse. Un examen de la moelle est recommandé chez les patients présentant une cytopénie persistante en cours de traitement pour déterminer si celle-ci est liée à la maladie ou au traitement instauré.

Biopsie ganglionnaire

La biopsie ganglionnaire n'est pas réalisée habituellement en présence d'une forme circulante du clone LLC. Cependant elle est indiquée en cas de suspicion de SLL ou d'une évolution en syndrome de Richter. Les pseudofollicules, ou centre de prolifération, sont caractéristiques des ganglions lymphatiques de patients atteints de LLC ou de SLL.

Électrophorèse des protéides sériques

Une hypogammaglobulinémie est présente chez 10% des patients au diagnostic et contribue à l'état d'immunodépression du patient au cours de l'évolution de la LLC. Un pic monoclonal d'Ig (principalement IgM) est retrouvé dans 10% des cas.

4. Évolution de la maladie

4.1 Complications auto-immunes

Les complications auto-immunes sont fréquentes dans la LLC et surviennent chez 25% des patients. Dans la LLC, l'auto-immunité cible principalement les lignées hématologiques et entraîne une anémie hémolytique auto-immune (AHAI), une thrombocytopénie immunitaire, une aplasie des globules rouges pure et une granulocytopenie auto-immune. L'AHAI est cependant la complication auto-immune la plus fréquente. Elle survient chez 7 à 10% des patients au cours de l'évolution de la maladie et la thrombopénie auto-immune complique la LLC dans 1 à 5% des cas. En revanche la survenue d'une érythroblastopénie ou d'une neutropénie auto-immune est beaucoup plus rare (<1%)²⁷.

Les cytopénies auto-immunes secondaires dans un contexte de LLC sont principalement dues à la sécrétion d'anticorps polyclonaux IgG de haute affinité par des lymphocytes B non pathologiques. Ces anticorps sont dirigés contre les antigènes des globules rouges et des plaquettes voire de la lignée granuleuse et des érythroblastes. Plus rarement, les cellules B tumorales peuvent produire des auto-anticorps monoclonaux de type IgM pouvant conduire à une hémolyse intravasculaire. Par ailleurs, les cellules de LLC produisent des cytokines qui peuvent entraîner une inhibition de l'érythropoïèse ou de la mégacaryopoïèse, aboutissant donc à une anémie et une thrombopénie. Enfin l'échappement à la surveillance immune serait facilité par une dysfonction des lymphocytes T, notamment des lymphocytes T régulateurs avec un déséquilibre sanguin du ratio TH17/Treg impliqué dans le développement de cellules auto-immunes²⁸. Dans de plus rares cas, la responsabilité du traitement dans les manifestations auto-immunes a également été évoquée. En effet, la chimiothérapie à base d'analogues de purines telle que la Fludarabine peut être à l'origine d'une AHAI,²⁹ et il semblerait également que l'Alemtuzumab (anti-CD52) soit à l'origine de cas de thrombopénie auto-immune³⁰.

Les corticostéroïdes constituent le traitement initial des cytopénies auto-immunes. Le traitement de 2^{ème} ligne comprend du Rituximab (Anti-CD20) en monothérapie ou un traitement immunosuppresseur par de la Ciclosporine.

4.2 Complications infectieuses

La LLC est caractérisée par des déficits progressifs de l'immunité du fait de l'apparition fréquente d'une hypogammaglobulinémie, et des défauts quantitatifs et fonctionnels des lymphocytes B et T³¹. Le risque infectieux augmente avec la progression de la maladie et avec l'aggravation de l'hypogammaglobulinémie. Cette déficience immunitaire peut être exacerbée par les effets immunosuppresseurs de la chimiothérapie, des anticorps monoclonaux anti-CD20 et des inhibiteurs des kinases. De ce fait, les complications infectieuses représentent une cause fréquente de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de la LLC³². Les infections sont généralement de nature bactérienne et impliquent fréquemment les voies respiratoires. Le traitement de substitution par immunoglobuline intraveineuse chez les patients atteints d'hypogammaglobulinémie, peut atténuer le risque infectieux³³ et la mise en place d'une antibiothérapie prophylactique peut prévenir les infections opportunistes³⁴. Les vaccins vivants ne sont pas recommandés chez les patients LLC à risque élevé de développer des infections graves ou récurrentes.

4.3 Transformations

Dans une faible proportion des cas, la LLC se transforme en formes plus agressives :

Une de ces formes est le **syndrome de Richter** qui correspond au développement d'un lymphome agressif dans la plupart des cas sous la forme d'un lymphome B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) ou plus rarement d'un lymphome de Hodgkin (LH). Le diagnostic et la distinction de ces deux entités se feront par une analyse histopathologique. La suspicion clinique de cette transformation chez les patients atteints de la LLC est basée sur une altération de l'état général avec l'apparition ou l'aggravation des symptômes tels que la fièvre, les sueurs nocturnes, une croissance rapide des ganglions lymphatiques ou d'une masse lymphoïde extra-nodale ou encore une augmentation excessive du taux de lactate déshydrogénase (LDH). L'imagerie par tomographie par émission de positrons (TEP) peut guider le choix d'effectuer ou non une biopsie³⁵. Environ 2 à 7% des patients atteints de la LLC développent un syndrome de Richter.

Les anomalies génétiques retrouvées dans les cas de Richter type LBDGC sont les mutations *NOTCH1*, *TP53*, *CDKN2A* et *MYC*³⁶. L'expression *MYC* retrouvée dans 30 à 40%³⁷ est fréquemment associée à l'expression *BCL2* et le variant LBDGC exprime dans la plupart des cas PD-1 (Programmed cell Death 1) contrairement à la LLC et au LBDGC *de novo*³⁸. D'un point de vue immunophénotypique, les cellules du syndrome de Richter de type LBDGC sont CD20+, n'expriment le CD5 que dans environ 30% des cas et le CD23 dans environ 15% des cas³⁹. La plupart des syndromes de Richter de type LBDGC ont un phénotype de cellules post-centre germinatif (positivité IRF4) alors que seulement 5 à 10% présentent un phénotype type centre germinatif avec une expression du CD10.

Dans le cas du variant type LH, le diagnostic repose sur la présence de cellules de Reed-Sternberg de phénotype CD30+, CD15+, CD20-⁴⁰.

Le pronostic du syndrome de Richter est généralement sombre en particulier chez les patients fortement prétraités pour la LLC. Le facteur pronostique le plus important est la relation clonale entre la LLC et les clones de lymphome agressif, une transformation impliquant des lymphocytes non clonalement liés à la LLC étant de meilleur pronostic³⁶.

La **transformation prolymphocytaire** des cellules B est un évènement rare mais qui demeure une évolution possible de la LLC. Cette maladie se manifeste par une splénomégalie symptomatique et une majoration de la lymphocytose avec plus de 55% des lymphocytes qui

sont des prolymphocytes. La clinique de la leucémie à prolymphocytes est généralement plus agressive que celle de la LLC.³²

Enfin on note plus rarement, suite à des traitements de chimio-immunothérapie à base d'analogues des purines, l'apparition de leucémies aiguës (LA) ou de syndromes myélodysplasiques (SMD) dans environ 5% des cas et notamment chez les patients ayant subi une greffe autologue de cellules souches.³² Dans ce cas, les complications n'ont pas de lien clonal avec la LLC.

4.4 Cancers solides associés

Les patients atteints de LLC ont une incidence accrue de tumeurs malignes comparés aux sujets témoins de même âge et de même sexe, en particulier pour des cancers de la peau (notamment des mélanomes malins), des sarcomes, des cancers de l'estomac, du rein et de la prostate.⁴¹ Le contexte d'immunodépression associée à la LLC peut contribuer à ce risque accru.⁴² Dans ces cas, le diagnostic de la LLC semble conférer un pronostic défavorable aux patients atteints de cancer secondaire.⁴³ Les patients atteints de MBL semblent partager ce risque accru de cancers secondaires avec les patients LLC et devraient également participer aux programmes de dépistage appropriés.⁴⁴

5. Marqueurs pronostiques

5.1 Anomalies cytogénétiques et mutation TP53

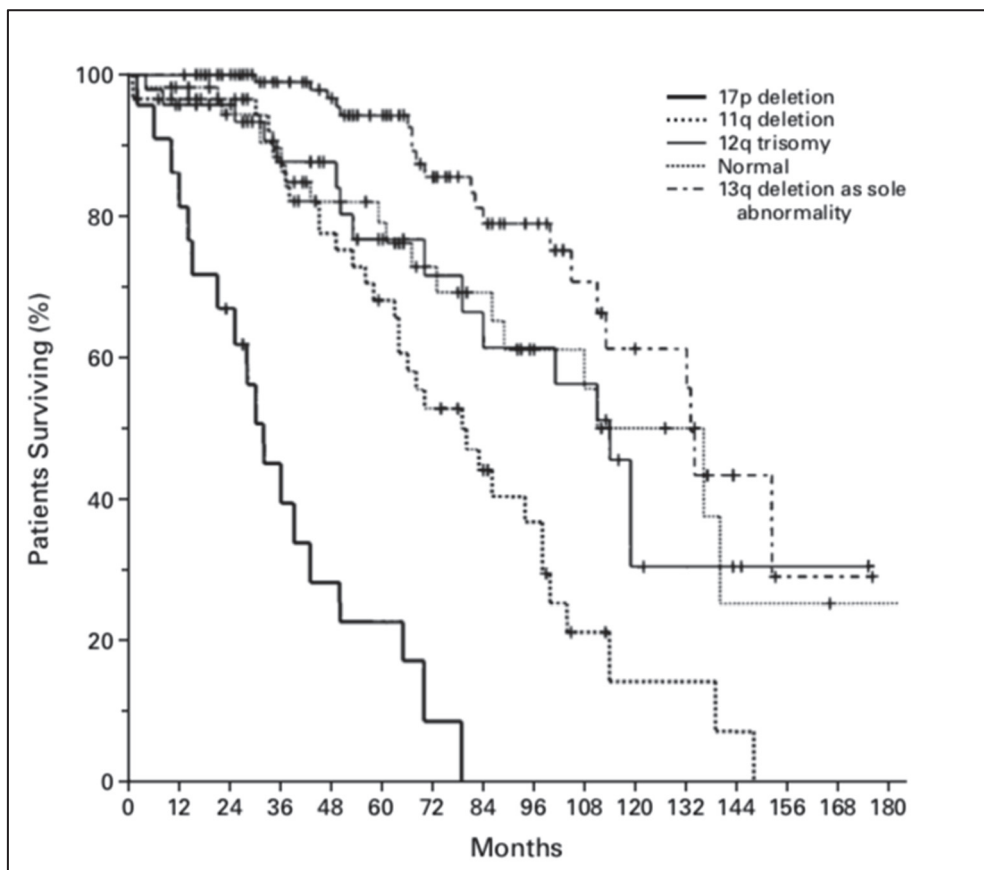
La recherche des anomalies cytogénétiques se fait par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur noyaux interphasiques. Cette technique moléculaire a permis de mettre en évidence des aberrations chromosomiques récurrentes dans 80% des cas de LLC avec, par ordre de fréquence, les délétions 13q14 (55%), les délétions 11q22 (18%), la trisomie 12 (16%), la délétion 17p13 (7%). Döhner a démontré en 2000, l'importance de ces anomalies clonales et a défini une hiérarchisation de la sévérité présentée dans le tableau 2:

del (17p) > del (11q) > trisomie 12 > absence d'anomalie > del (13q) isolée.⁴⁵

Anomalie	Incidence (%)	Pronostic	Survie médiane (mois)	Clinique/Morphologie/Résistance au traitement
del 13q14	55	Favorable	133	/
del 11q22	18	Défavorable	79	Adénopathies+++ et Chimiorésistance
trisomie 12	16	Intermédiaire	114	Morphologie atypique ++ et association à d'autres anomalies cytogénétique (trisomie 18 et 19, del 14q ou t(14;19)) ⁴⁶
del 17p13	7	Très défavorable	32	Morphologie atypique et Chimiorésistance+++

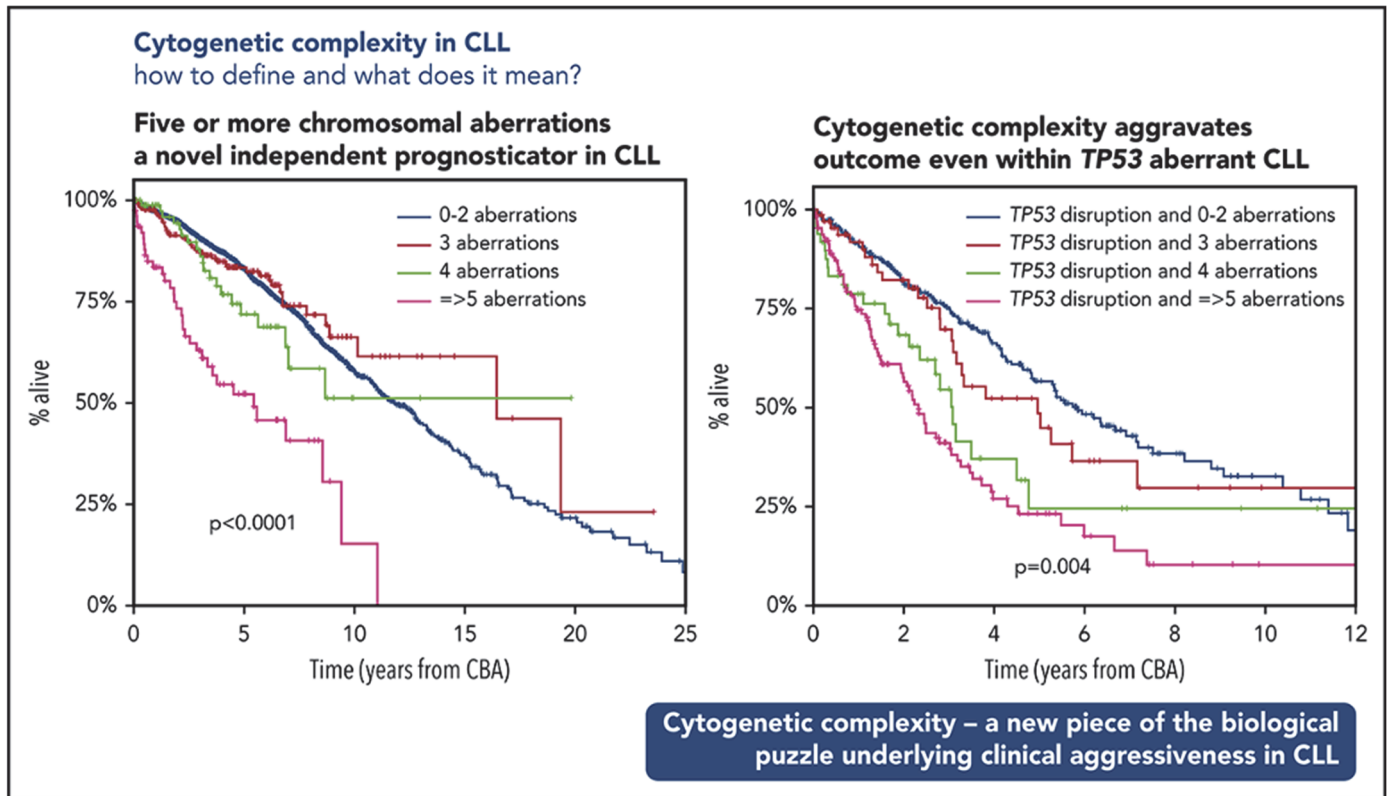
Tableau 2 : Répartition des principales anomalies cytogénétiques dans la LLC

Döhner *et al* ont démontré une relation très significative entre la survie médiane et l'anomalie cytogénétique impliquée comme le montre la figure 3 :



*Figure 3 : Impact des principales anomalies cytogénétiques sur la survie des patients atteints de LLC, d'après Döhner et al., 2000.*⁴⁵

Récemment, il a également été montré que le nombre d'anomalies cytogénétiques avait un impact important sur la survie y compris en présence d'anomalies *TP53*, le temps de survie étant inversement proportionnel au nombre d'aberrations chromosomiques présentes. (cf. figure 4).



*Figure 4 : Impact du nombre d'anomalies cytogénétiques sur la survie de patients atteints de LLC sans tenir compte des anomalies *TP53* et en présence de mutations *TP53*, d'après Baliakas et al., 2019 ⁴⁷*

Les mutations du gène *TP53* ont un impact défavorable sur l'évolution de la LLC avec une survie globale et une survie sans traitement raccourcies et font partie des marqueurs pronostiques les plus pertinents.⁴⁵

La délétion 17p13, aberration chromosomique classée comme la plus péjorative dans la LLC, est retrouvée dans 5 à 10% des patients au diagnostic et 15-20% des patients de stade B/C, et est associée dans la majorité des cas à des mutations *TP53* sur l'autre allèle du gène.⁴⁸ Son incidence augmente chez les patients réfractaires au traitement atteignant jusqu'à 40 % des cas, ce qui en fait l'anomalie la plus fréquemment acquise après traitement.⁴⁹ D'après certaines études, la survie sans progression (SSP) et la survie globale (SG) des patients seraient inversement proportionnelles à la taille du clone possédant la délétion 17p, déterminée par la technique de FISH ciblée.⁵⁰ Des mutations *TP53* détectées par technique classique de

séquençage (Sanger) en l'absence de délétion 17p sont retrouvés dans 5% des cas, au diagnostic.⁵¹ Il a été démontré que le pronostic péjoratif des patients atteints de LLC est similaire chez les patients porteurs d'une del(17p) et chez les patients porteurs d'une mutation *TP53*, détectée par séquençage Sanger en l'absence de del (17p).⁵²

Des clones minoritaires porteurs de mutations *TP53* ont été mis en évidence par NGS chez moins de 10% des patients non traités, sans être détectés par séquençage Sanger. Il a été démontré que ces sous-clones *TP53* mutés ont le même impact pronostique que ceux identifiés par méthodes de séquençage classique.⁵³

De plus, il a été démontré que la présence de ≥ 3 anomalies chromosomiques est associée à un pronostic défavorable dans la LLC, la complexité du caryotype étant associée à une survie diminuée⁴⁷ comme le montre la figure 4. Les caryotypes complexes sont présents chez 14 à 34% des patients atteints de la LLC non traités et des études ont montré que le statut IGVH non muté, les anomalies del(17p) / *TP53* ou encore del(11q) / *ATM* sont plus fréquemment observés chez les patients LLC avec un caryotype complexe. De plus, ces études ont révélé que le délai avant le premier traitement et la survie sans progression étaient significativement plus courts chez les patients avec à la fois une del (17p) et un caryotype complexe par rapport aux del (17p) isolées.^{54, 55, 56}

5.2 Statut IGVH

Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines constituées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, chacune étant composée d'une région variable et d'une région constante. Le gène codant pour la chaîne lourde est localisé sur le chromosome 14 et se compose de quatre segments géniques : trois segments qui codent pour le domaine variable : V, D, J et un segment pour le domaine constant C. La diversité des immunoglobulines s'explique par le réarrangement de ces segments dans la moelle osseuse ainsi que par le processus d'hypermutation somatique dans les organes lymphoïdes secondaires. Le gène codant pour les parties variables des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IGVH) des cellules leucémiques peut ou non avoir subi des mutations somatiques dans le centre germinatif du follicule lymphoïde secondaire. L'analyse des réarrangements d'IGVH et de l'état mutationnel se fait par PCR sur ADN complémentaire synthétisé à partir de l'ARN extrait des cellules tumorales puis séquençage direct. Les séquences nucléotidiques déterminées sont ensuite comparées à des bases de séquence de référence qui sont des gènes IGVH de cellules germinales n'ayant pas encore subi de phénomène d'hypermutation somatique. Les séquences présentant plus de 98%

d'homologie sont considérées comme non mutées. Il s'agit d'une technique d'analyse complexe et onéreuse.

Le statut IGVH est un marqueur pronostique des plus pertinents dans la LLC, la forme mutée (environ 50% des patients) étant de meilleur pronostic que la forme non mutée. Des études ont montré que la médiane de survie est de 24 ans pour les patients avec un statut IGVH muté alors qu'elle n'est que de 8 ans pour les patients avec un statut IGVH non muté.^{57,58} De plus, le locus IGVH non muté est souvent associé à une résistance à la chimiothérapie ainsi qu'à la présence d'aberrations chromosomiques défavorables comme la délétion 11q et se traduit par une maladie plus agressive.⁵⁹ En revanche, un statut IGVH muté est plus fréquemment associé à un stade A de Binet et à la présence d'une délétion 13q.⁶⁰ Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence des sous-groupes de patients avec des mutations somatiques spécifiques de la région codée par le segment IGVH3-21, associées à un pronostic défavorable similaire à celui des patients IGVH non muté et cela indépendamment du statut mutationnel.⁶¹

5.3 Marqueurs phénotypiques

CD38

Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire qui possède une activité ectoenzymatique ainsi qu'un rôle dans l'adhésion et la signalisation des leucocytes par le biais de l'interaction avec des ligands de surface tel que le CD31. Il ne s'agit pas d'un marqueur de la lignée lymphoïde B, mais il est exprimé au cours de la maturation des lymphocytes B, principalement à la surface des lymphoplasmocytes et des plasmocytes.⁶² Le CD38 est aussi un marqueur pronostique dans les leucémies et notamment un marqueur prédictif du temps de survie : une forte expression du CD38 ($\geq 20\%$) est associée à une incidence élevée d'atteinte ganglionnaire, à une infiltration diffuse de la moelle osseuse, à une anémie plus profonde, à une hépatomégalie et à un taux de $\beta 2$ microglobuline élevé.⁶³ Une étude menée en 2005 a recherché le seuil de positivité le plus pertinent du CD38 chez des patients au diagnostic et il s'est avéré qu'une expression $\geq 7\%$, lors du diagnostic, était corrélée à une survie sans traitement plus courte et serait un paramètre important pour l'identification des LLC précoces à risque évolutif défavorable, l'expression du CD38 restant stable dans le temps.⁶⁴ De plus, son expression sur les lymphocytes tumoraux a été le premier marqueur à être corrélé au statut mutationnel des IGVH. En effet en 1999, *Damle et al* mettent en évidence dans une cohorte de patients atteints de LLC, un pourcentage significativement plus élevé de cellules exprimant fortement le CD38 dans le groupe de patients avec un statut IGVH non muté que dans le groupe IGVH muté (63,9%

contre 7,3%).⁵⁸ D'après cette étude, l'expression du CD38 aurait un poids pronostique similaire à celui du statut mutationnel IGVH. Chez les patients exprimant au moins 30% de CD38 sur le clone de cellules CD5+ CD19+ la médiane de survie est plus courte par rapport aux patients ne l'exprimant pas (<30%) (10 ans vs non atteinte).

ZAP 70

La protéine ZAP 70 (Zeta-Associated-Protein-70) est une tyrosine kinase intracellulaire de la famille Syk normalement présente dans les lymphocytes T et NK et favorise le signal d'activation délivré par les récepteurs de surface. Cette protéine n'est physiologiquement pas exprimée par les lymphocytes B circulants, l'expression de ZAP 70 par les cellules LLC étant une aberration phénotypique. L'expression de ZAP 70 déterminée par cytométrie en flux, est également corrélée avec l'absence de mutation des IGVH, une progression rapide de la maladie et une survie raccourcie des patients.⁶⁵ Plusieurs méthodes permettent de mesurer l'expression de ZAP-70 telles que la RT-PCR, l'immunoblot, l'immunohistochimie et la cytométrie en flux. La CMF est la technique la plus utilisée et sa réalisation technique nécessite une perméabilisation de la membrane cellulaire, en raison de la localisation intracellulaire de ZAP70. Actuellement, en France, ZAP70 n'est plus recherchée en routine du fait d'une analyse trop contraignante et d'une meilleure accessibilité du statut mutationnel des IGVH.

CD49d

Il s'agit de la sous unité $\alpha 4$ de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ qui est une molécule de surface dont l'expression induit la prolifération médiée par le microenvironnement des cellules leucémiques. D'après une équipe, le CD49d serait un marqueur pronostique puissant prédictif de la SG et de la survie sans traitement.⁶⁶ Son expression est associée aux formes progressives de LLC et à une SG et sans traitement plus courte.

5.4 Marqueurs sériques

La $\beta 2$ microglobuline

Il s'agit d'une protéine extracellulaire qui est une composante du complexe d'histocompatibilité de classe I, dont elle constitue la chaîne légère à la surface des cellules nucléées de l'organisme. La $\beta 2$ microglobuline est présente physiologiquement en petite quantité dans le sérum et l'urine et son taux s'élève en cas d'infections virales, notamment à l'EBV et au CMV, de maladies auto-immunes ou encore dans les tumeurs malignes. En effet,

cette protéine synthétisée par les lymphocytes, est un marqueur sérique reflétant l'activité tumorale et est corrélée au stade de la maladie chez les patients atteints de LLC ainsi qu'au degré d'infiltration de la moelle. Il s'agit donc d'un facteur pronostique défavorable.^{67, 68} Dès les années 1980, il a été établi une corrélation entre le taux sérique de $\beta 2$ microglobuline et la progression tumorale des cellules de LLC.⁶⁹ Cependant, sa concentration sérique est dépendante de la fonction rénale du fait de sa filtration glomérulaire à 95% et de sa réabsorption tubulaire à 99,9%. Ainsi le taux de $\beta 2$ microglobuline doit toujours s'interpréter en fonction du taux de filtration glomérulaire.⁷⁰ Malgré la découverte de nouveaux marqueurs biologiques d'évolutivité, la $\beta 2$ microglobuline reste un marqueur prédictif simple et indépendant de la survie globale et de la survie sans traitement chez les patients atteints de LLC et elle est intégrée dans les scores cliniques récents comme le CLL IPI.⁷¹

La Thymidine Kinase (TK)

Il s'agit d'une enzyme cellulaire catalysant la phosphorylation de la thymidine en thymidine monophosphate, un précurseur essentiel à la synthèse de l'ADN.⁷² La forme prédominante de la TK est présente dans les cellules en division uniquement, ce qui fait de cette enzyme un marqueur potentiel de l'activité proliférative des cellules tumorales. Un taux élevé de TK est corrélé à un stade clinique avancé et à une maladie progressive. Une étude décrit une relation entre la TK et le statut mutationnel IGVH et montre qu'un taux ≥ 15 U/L est significativement associé au statut mutationnel IGVH non muté.⁷³ Outre le statut mutationnel, le taux de TK est associé à de nombreux autres marqueurs de mauvais pronostic tels que CD38, ZAP 70 ou un taux de $\beta 2$ microglobuline élevé.⁷⁴ Cependant, l'utilisation de ce facteur pronostique reste limitée du fait de son manque de spécificité. De plus, l'activité sérique TK diminue avec l'âge, et l'interprétation de son taux doit donc se faire en fonction de l'âge du patient, d'autant plus que la LLC est une hémopathie du sujet âgé.⁷⁵

CD23 soluble

Le CD23, récepteur de faible affinité des IgE, est un marqueur de surface des cellules de LLC. Cette glycoprotéine transmembranaire peut être clivée en fragments solubles de taille variée, les CD23 solubles (CD23s). Selon quelques publications, CD23s serait un marqueur sensible et spécifique de la LLC et son taux est corrélé au temps de doublement des lymphocytes, au degré d'infiltration diffuse de la moelle osseuse et au stade clinique reflétant la progression de la maladie.⁷⁶ De plus une étude prospective évaluant la valeur prédictive du

taux de CD23s sur la SG et sur le temps d'évolution des patients de stade A vers les autres stades de la LLC a montré que les patients de stade A de Binet avec une concentration de CD23s supérieure à la valeur de 574 U/mL, ont un pronostic significativement plus défavorable avec un temps de progression plus court que les patients présentant un taux inférieur à ce seuil.⁷⁷ Ce marqueur est classiquement mesuré par technique ELISA et n'est pas utilisé en routine. Cependant, une équipe a mis au point une méthode de dosage par CMF du CD23s.⁷⁸

5.5 Temps de doublement des lymphocytes (TDL)

Il s'agit d'une méthode simple de mesure de la progression de la maladie. Des études montrent que les patients ayant un TDL inférieur ou égal à 12 mois, ont une médiane de survie plus courte par rapport à un TDL de plus de 12 mois.^{79, 80} Le TDL est un marqueur de maladie évolutive. Il fait parti des critères de mise en route du traitement lorsque la lymphocytose est supérieure à 15 G/L.

5.6 Classifications pronostiques

Les deux principales classifications pronostiques utilisées en clinique sont celle de Rai⁸¹ et Binet¹⁸. Ces deux systèmes de classification sont simples, s'appuyant uniquement sur des examens physiques et des tests de laboratoire standards. Ils ont été décrits dans les années 80 et restent aujourd'hui encore valables malgré l'apparition de nouveaux marqueurs pronostiques.

Classification de Rai

La classification de Rai est très utilisée aux Etats-Unis depuis 1975 et distingue 5 stades différents en fonction de la présence ou non d'adénopathie, d'une hépatomégalie et/ou une splénomégalie et la présence de cytopénie.

Stade	Caractéristiques	Survie médiane en 1975 (en mois)
0	Lymphocytose sanguine et médullaire isolée	> 150
I	Lymphocytose + adénopathies	101
II	Lymphocytose + splénomégalie et/ou hépatomégalie	71
III	Lymphocytose + anémie < 11 g/dL	19
IV	Lymphocytose + thrombopénie < 100 G/L	19

Tableau 3 : Classification de Rai selon Rai et al.⁸¹

Par la suite, cette classification a été modifiée pour réduire le nombre de groupes pronostiques de 5 à 3:

Risque	Caractéristiques
Faible	Lymphocytose sanguine et médullaire isolée
Intermédiaire	Lymphocytose et adénopathies et/ou hépatosplénomégalie
Elevé	Lymphocytose et anémie et/ou thrombopénie

Tableau 4 : Classification de Rai modifiée selon Scarfo et al. ⁴³

Classification de Binet

La classification de Binet est largement utilisée en Europe depuis 1981. Elle définit 3 stades (A, B et C) et est basée sur le nombre d'aires ganglionnaires atteintes à l'examen clinique (définies par la présence de ganglions lymphatiques hypertrophiés ≥ 1 cm de diamètre ou d'organomégalie) ainsi que sur la présence de cytopénie (anémie et/ou thrombocytopénie). Les aires ganglionnaires impliquées sont les aires cervicales, axillaires et inguinales, l'hépatomégalie et la splénomégalie.

Stades	Caractéristiques
A	Absence d'anémie (Hb > 100 g/L) ou de thrombocytopénie (Plt > 100 G/L) et jusqu'à 2 aires ganglionnaires atteintes
B	Absence d'anémie (Hb > 100 g/L) ou de thrombocytopénie (Plt > 100 G/L) et plus de 2 aires ganglionnaires atteintes
C	Anémie (Hb < 100 g/L) ou thrombocytopénie (Plt < 100 G/L) quel que soit le nombre d'aires ganglionnaires atteintes

Tableau 5 : Classification de Binet selon Binet et al. ¹⁸

Cependant ces deux classifications ne permettent pas de distinguer parmi les patients de stade précoce, ceux qui auront une évolution rapide de ceux qui resteront stables. C'est pourquoi des marqueurs pronostiques plus récents de nature cytogénétique, moléculaire, phénotypique et sérique, ont été développés et doivent être pris en compte pour estimer la vitesse de progression de la maladie.

Classification de Rossi

En 2013, Rossi a proposé une approche différente en intégrant le statut mutationnel de quatre gènes fréquemment mutés dans la LLC ainsi que les principales anomalies cytogénétiques.⁸²

Cette classification distingue quatre groupes pronostiques différents rassemblés dans le tableau 5:

Stades	Caractéristiques	Survie à 10 ans
Haut risque	Anomalie de <i>TP53</i> et/ou mutation de <i>BIRC3</i>	29%
Risque intermédiaire	Mutation <i>SF3B1</i> et/ou <i>NOTCH1</i> et/ou del(11q)	37%
Faible risque	Absence d'anomalie au caryotype ou trisomie 12	57%
Très faible risque	del(13q)	69%

Tableau 6 : Classification de Rossi selon Rossi et al.⁸²

CLL-IPI (CLL International Prognostic Index)

En 2016, le “CLL-IPI study group” a proposé un index en étudiant la valeur pronostique de 27 facteurs au diagnostic sur une cohorte de 3472 patients n'ayant jamais reçu de traitement.⁷¹ Cinq marqueurs pronostiques indépendants ont été retenus (cf.tableau 7) :

- le statut *TP53* (avec ou sans délétion 17p),
- le statut mutationnel IGVH,
- la concentration sérique en $\beta 2$ microglobuline,
- le stade clinico-biologique
- l'âge.

Facteurs pronostiques	Points
Del (17p) et/ou mutation <i>TP53</i>	4
Statut IGVH non muté	2
$\beta 2$ microglobuline > 3,5 mg/L	2
RAI I à IV ou Binet B ou C	1
Age > 65 ans	1

Tableau 7 : Critères et calcul du CLL-IPI selon the international CLL Working Group⁷¹

Un index pronostique comportant 4 catégories a pu être déterminé en fonction du nombre de points obtenu. La survie globale à 5 ans est directement liée à la catégorie CLL-IPI comme le montre le tableau 8 :

Score CLL-IPI	Catégorie de risque	SG à 5 ans (%)
0-1	Faible	93,2
2-3	Intermédiaire	79,3
4-6	Elevé	63,3
7-10	Très élevé	23,3

Tableau 8 : Catégories de risque et survie sans traitement selon le score CLL-IPI ⁷¹

Le CLL-IPI est actuellement le score pronostique le plus pertinent, vérifié dans différentes études de cohorte. ^{83, 84} Ce score montre la pondération pronostique des divers facteurs directement liés à la survie. Malgré son intérêt au diagnostic il est peu utilisé par les cliniciens dans leur pratique courante. Il est surtout établi par les cliniciens avant la mise en route de la 1^{ère} ligne de traitement.

6. Stratégie thérapeutique

6.1 Indication thérapeutique ⁸⁵

Seules les formes évolutives (stades B et C) justifient un traitement. En effet, en pratique générale, les patients atteints d'une maladie asymptomatique à un stade précoce (Rai 0, Binet A) doivent être surveillés sans traitement. Jusqu'ici les études sur la maladie à un stade précoce n'ont pas pu mettre en évidence le bénéfice des interventions thérapeutiques précoces.^{86, 87} Ainsi, lors de la rédaction des guidelines de l'IWCLL 2008, les indications au traitement ont intégré les patients présentant des signes de maladie évolutive ou symptomatique définis comme « maladie active ». Ces indications thérapeutiques ont été mises à jour en 2018 et seuls les patients qui correspondent aux critères IWCLL 2018 pour l'initiation du traitement peuvent être éligibles à un traitement.

Au moins un des critères suivants doit être présent :

- Insuffisance médullaire progressive (Hb < 100 g/L et /ou plaquettes < 100 G/L).
- Splénomégalie massive (≥ 6 cm sous l'aube costal) ou splénomégalie progressive ou symptomatique.
- Adénopathie de grande taille (≥ 10 cm) ou lymphadénopathie progressive ou symptomatique.
- Progression rapide de la lymphocytose avec une augmentation $\geq 50\%$ en 2 mois ou un temps de doublement < 6 mois ; les patients dont le nombre initial de lymphocytes dans le sang est <30 G/L peuvent nécessiter d'une période plus longue pour déterminer le temps de doublement. Lors d'une infection ou d'une corticothérapie systémique, une nouvelle numération est nécessaire pour confirmer la progression lymphocytaire à distance.
- Anémie hémolytique ou thrombopénie hémolytique auto-immune ne répondant pas à un traitement standard.
- Atteinte extranodale symptomatique ou fonctionnelle (ex : peau, rein, poumon, moelle épinière)
- Présence de signes généraux incluant un ou plusieurs des signes suivants :
 - Perte de poids non volontaire de plus de 10% au cours des 6 derniers mois
 - Fatigue significative
 - Fièvre > 38°C durant 2 semaines sans infection documentée
 - Sueurs nocturnes pendant plus d'un mois sans infection documentée

6.2 Stratégie thérapeutique pour le traitement de 1^{ère} ligne

Concernant les patients ne répondant pas aux critères IWCLL 2018 pour l'initiation du traitement, et dans l'hypothèse où le score CLL-IPI ait été calculé, la prise en charge est la suivante ⁸⁵ :

- Les patients de la catégorie à risque faible et intermédiaire CLL-IPI (75%) doivent suivre une surveillance de la progression de la maladie tous les 6 à 12 mois.
- Les patients de la catégorie à haut et très haut risque (25%) doivent suivre une surveillance de la progression tous les 3 à 6 mois.

Concernant les patients qui répondent aux critères IWCLL 2018 pour initier le traitement, ces derniers doivent se voir proposer un traitement quel que soit le groupe à risque CLL-IPI

auquel ils appartiennent. Ainsi, avant l'initiation de la 1^{ère} ligne de traitement, selon les dernières recommandations IWCLL, la recherche des délétions 17p, 11q, 13q et la trisomie 12 (par méthode FISH) ainsi que la recherche du statut *TP53* (par Séquençage Sanger ou NGS) et IGVH (par PCR) doivent être réalisées afin d'adapter le protocole thérapeutique. Étant donné qu'environ 3 à 5% des patients auront une mutation *TP53*, en l'absence de del(17p), il est important de réaliser ces deux techniques.

Patients présentant une del(17p) et/ou une mutation du gène *TP53*

En cas d'anomalie de *TP53*, la chimiothérapie ne sera pas efficace et le choix se portera en première intention sur l'Ibrutinib (inhibiteur de la voie du BCR). Un traitement par Vénétoclax (inhibiteur de BCL2)-Obinutuzumab (anti CD20) (selon les dernières recommandations 2019) ou par Rituximab-Idelalisib (inhibiteur de la voie du BCR) peut être indiqué en cas de contre-indication à l'Ibrutinib. Ces différentes options offrent généralement un bon contrôle de la maladie bien que non définitif. L'ensemble des données sur ces thérapeutiques sera développé dans la 2^{ème} partie de thèse. De plus, tous les patients présentant une mutation *TP53* sont présentés à un expert en thérapie cellulaire afin de discuter des options de traitement potentielles par une greffe de cellules souches allogéniques ou une thérapie par cellules T de récepteur d'antigène chimérique (CAR-T) dans le cadre d'essais cliniques.

Patients sans del(17p13) et/ou mutation du gène *TP53*

Chez les patients ne présentant pas d'anomalie de *TP53*, l'immunochimiothérapie est indiquée. Le choix du traitement sera fonction du statut IGVH, de l'âge du patient et de ses comorbidités. En effet, nous distinguerons les patients présentant une altération de l'état physique, des patients en bonne condition physique tels que définis par une clairance normale de la créatinine et un faible score à l'échelle cumulative de cotation des maladies « Cumulative Illness Rating Scale » (CIRS) ⁸⁸.

L'association Rituximab, Fludarabine (analogue des purines), Cyclophosphamide (alkylant) (RFC) doit rester le traitement de référence pour les patients jeunes et en bonne santé en particulier lorsque le clone leucémique présente un statut IGVH muté.

Les patients de plus de 65 ans en bon état général doivent se voir proposer l'association Bendamustine (alkylant)-Rituximab (BR), du fait d'une forte toxicité infectieuse et hématologique du RFC.

Les patients avec une condition physique altérée, peuvent se voir proposer l'association Vénétoclax-Obinutuzumab (selon les dernières recommandations 2019) ou Ibrutinib en monothérapie ou Chlorambucil-Obinutuzumab. Le Chlorambucil (alkylant) étant fréquemment associé à une forte toxicité myéloïde et gastro-intestinale, l'Obinutuzumab en monothérapie peut être utilisée sans perte d'efficacité.⁸⁹

Chez le sujet jeune, en bon état général avec un statut IGVH non muté, l'Ibrutinib est privilégié lors de la présence de mutations défavorables (tel que del(11q)), tandis que le RFC peut être utilisés lors de mutations associées à risque standard (del(13q) ou trisomie 12).

Catégorie	Del (17p) et/ou mutation TP53	Etat physique	IGVH	Traitement
Stade A-B Binet ou Stade 0-II RAI ou maladie inactive	/	/	/	Aucun
Maladie active ou stade C Binet ou stade III-IV RAI	Oui	/	/	Ibrutinib ou Venetoclax + Obinutuzumab * ou Idelalisib + Rituximab (si Ibrutinib CI)
	Non	Bon	Muté	RFC (BR si > 65 ans) ou Ibrutinib
			Non muté	Ibrutinib ou RFC (BR si > 65ans)
	Non	Altéré	Muté	Venetoclax + Obinutuzumab * ou Chlorambucil + Obinutuzumab ou Ibrutinib
Non muté			Venetoclax + Obinutuzumab * ou Ibrutinib ou Chlorambucil + Obinutuzumab	

* dernières recommandation juin 2019, CI= contre indications

Tableau 9 : Recommandations sur la 1^{ère} ligne de traitement de la LLC adapté selon Kipps et al, 2019.⁹⁰

6.3 Définition de la rechute et de la maladie réfractaire

On parle de **rechute** lors d'une preuve de progression de la maladie chez un patient qui a précédemment atteint les critères de rémission complète ou de rémission partielle sur une période ≥ 6 mois. En revanche, **la maladie réfractaire** est définie comme un échec du traitement ou comme une progression de la maladie dans les 6 mois suivant la dernière dose de traitement.

L'évaluation de la réponse au traitement doit inclure un examen physique, une évaluation du sang et de la moelle afin de confirmer l'absence d'infiltrat de maladie clonale, une évaluation de la maladie résiduelle minimale et une échographie de l'abdomen. Cette évaluation doit être réalisée au moins deux mois après la fin du traitement pour les thérapies avec une durée de traitement définie. Pour les thérapies continues ou les stratégies de traitement avec une phase d'entretien, l'évaluation de la réponse doit être effectuée au moins deux mois après que les patients aient atteints leur réponse maximale (aucune amélioration supplémentaire pendant au moins deux mois de traitement) ou à un moment prédéfini dans le protocole.

Selon les critères d'IWCLL 2018, la **maladie progressive (MP)** est caractérisée par **au moins un** des éléments suivants :

- Une progression ou une réapparition d'une hypertrophie des ganglions lymphatiques ($\geq 1,5$ cm), d'une splénomégalie (augmentation de la taille de la rate $\geq 50\%$ ou augmentation d'au moins 2 cm par rapport à l'inclusion), d'une hépatomégalie ou tout autre infiltrat d'organes.
- Une augmentation du nombre de lymphocytes sanguins $\geq 50\%$ avec au moins 5 G/L de lymphocytes B ; sauf dans le cadre de certaines thérapies comme les inhibiteurs de kinase qui peuvent provoquer une lymphocytose reflétant une redistribution des cellules leucémiques des tissus lymphoïdes vers le sang.⁹¹
- Une transformation vers une histologie plus agressive (syndrome de Richter).
- La progression ou l'apparition de cytopénie directement attribuable à la LLC (en dehors de toute thérapie et sans rapport avec une cytopénie auto-immune).

La **réponse complète** (RC) est définie par la présence de **tous** les critères suivants :

- Lymphocytes du sang périphérique < 4 G/L
- Absence de lymphadénopathie significative, de splénomégalie et d'hépatomégalie à l'examen physique
- Absence de symptôme constitutionnel lié à la maladie
- Absence de cytopénie : Polynucléaires Neutrophiles $\geq 1,5$ G/L, Plaquettes ≥ 100 G/L, Hémoglobine ≥ 11 g/dL (en dehors de toute transfusion)
- MRD indétectable
- Biopsie de moelle normocellulaire, sans preuve de lymphocytes typiques de la LLC, selon les critères morphologiques.

On parle de **réponse partielle** (RP) lorsqu'au moins deux paramètres du groupe A et un paramètre du groupe B (cf.tableau 10) ne sont pas atteints, s'ils étaient précédemment anormaux.

Groupe	Critères	RC	RP	MP
A	Lymphadénopathies	Aucune > 1,5 cm	Diminution $\geq 50\%$	Augmentation $\geq 50\%$
	Hépatosplénomégalie	Taille de la rate < 13 cm et taille du foie normal	Diminution $\geq 50\%$	Augmentation $\geq 50\%$
	Autres symptômes	Aucun	Plusieurs	Plusieurs
	Lymphocytes circulants	< 4G/L	Diminution $\geq 50\%$	Augmentation $\geq 50\%$
B	Plaquettes	≥ 100 G/L	≥ 100 G/L (ou augmentation $\geq 50\%$)	Diminution $\geq 50\%$
	Hémoglobine	≥ 11 g/dL	≥ 11 g/dL (ou augmentation $\geq 50\%$)	Diminution ≥ 2 g/dL
	Moelle osseuse	Normocellulaire, pas de cellules de LLC	Présence de cellules de LLC	Augmentation des cellules de LLC $\geq 50\%$

RC : Réponse complète ; RP : réponse partielle ; MP : maladie progressive

Tableau 10 : Critères de réponse complète, partielle et de maladie progressive selon l'IWCLL 2018

6.4 La maladie résiduelle dans la LLC

6.4.1 Définition de la maladie résiduelle minimale (MRD)

La quantification de la maladie résiduelle minimale après traitement est un marqueur pronostique indépendant de la SSP et de la SG, démontrée dans des études de standardisation.^{92,93} L'utilisation de la CMF, de la PCR ou du séquençage de nouvelle génération permet la détection de la MRD chez les patients ayant obtenu une réponse clinique complète. En effet, la majorité des patients atteints de LLC chez lesquels une réponse clinique complète est observée après traitement, conservent une maladie persistante, à bas niveau appelée MRD, non détectée par l'imagerie ou les techniques de laboratoire de routine. Ce sont ces cellules résiduelles, qui peuvent persister après traitement dans un ou plusieurs sites de la maladie (moelle, sang, ganglions lymphatiques, foie, rate), qui sont responsables, à plus ou moins long terme, de la rechute des patients. On parle de MRD indétectable lorsque le nombre de cellules de LLC évalué par CMF ou par PCR est < 1 cellule leucémique pour 10 000 leucocytes ($< 10^{-4}$ ou 0,01%) dans le sang et/ou la moelle. Cependant certaines thérapies éliminent préférentiellement les cellules pathologiques du sang plutôt que celles de la moelle telles que les anticorps monoclonaux. Par conséquent, il est préférable de confirmer que la MRD soit également négative dans la moelle lorsque la négativité a été démontrée dans le sang.⁴⁴ L'évaluation de la MRD doit être réalisée au moins 3 mois après la fin du traitement.

L'objectif souhaité est l'éradication complète de la leucémie mais celle-ci est rare dans la LLC. L'utilisation des inhibiteurs de la voie de signalisation du BCR n'a abouti qu'à des RP pour la plupart des patients, principalement du fait d'une persistance de la maladie dans la moelle osseuse, même si leur association à des traitements cytotoxiques type immunochimiothérapie permet d'augmenter la proportion de patient obtenant une rémission profonde.⁹⁴ Cependant, il a été démontré que certaines combinaisons incluant les inhibiteurs de BCL2 (Vénétoclax) sont capables d'induire une MRD indétectable dans la moelle osseuse, l'éradication de la maladie devenant ainsi une perspective envisageable pour les patients atteints de LLC.⁹⁵

6.4.2 Méthodes de détection de la MRD dans la LLC

Deux méthodes sont actuellement standardisées et considérées équivalentes pour la détection de la MRD avec un seuil de détection de 10^{-4} : la CMF et les méthodes de RQ-PCR.

L'initiative européenne de recherche sur la LLC (ERIC) a établi un protocole harmonisé de CMF multiparamétrique en 2007, constamment optimisé au cours des dernières années^{92, 96, 93, 24}. Rawstron *et al* ont commencé par normaliser et optimiser une technique de CMF à 4 couleurs avec une sensibilité $\geq 10^{-4}$ nécessitant une acquisition $\geq 500\ 000$ événements. L'évolution technologique permet de réaliser des protocoles en augmentant le nombre de paramètres simultanément analysés et donc d'effectuer des analyses de haute sensibilité et spécificité en allongeant les temps d'acquisition. Ainsi selon le protocole ERIC, une combinaison CD19/CD5/CD20/CD43/CD79b/CD81 est actuellement considérée comme suffisante et non redondante pour détecter une MRD à un seuil de 10^{-5} dans la LLC.⁹⁷ Ce test ne nécessite pas d'échantillons de prétraitement et peut être adapté à chaque laboratoire possédant un cytomètre à 6 couleurs ou plus. Si l'utilisation de combinaisons de 6 ou 8 marqueurs est maintenant courante dans de nombreux laboratoires en France, le seuil de 10^{-4} reste celui permettant de définir une maladie résiduelle indétectable selon les recommandations de l'IWCLL. Bien que cela ne soit possible dans que dans certains laboratoires, une sensibilité de 10^{-6} peut être atteinte avec la CMF.

Une limite de détection inférieure à 10^{-5} peut également être obtenue par PCR quantitative en temps réel (**RQ-PCR**) avec des amorces spécifiques pour chaque patient.^{98, 99} Dans cette méthode, avant traitement, le gène IGVH du clone malin est séquencé et des sondes oligonucléotidiques spécifiques de l'allèle (ASO) sont synthétisées. Après traitement, l'utilisation de ces amorces permet l'amplification du gène du clone leucémique (cf. figure 5).

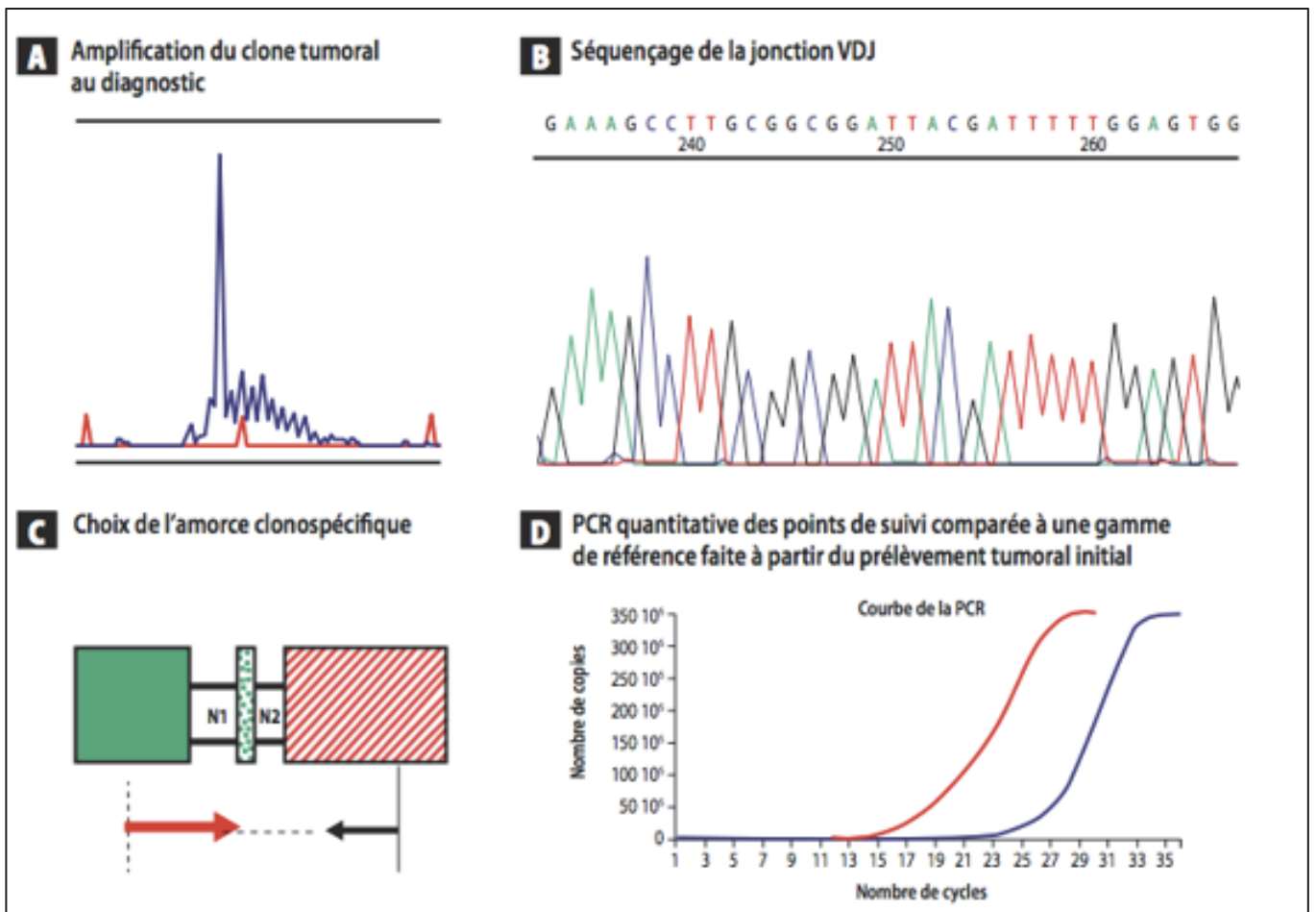


Figure 5 : Différentes étapes de la quantification par PCR clonospcifique

Une étude de 530 prélèvements a confirmé l'équivalence des techniques ASO-PCR et CMF 4 couleurs pour une détection de maladie résiduelle à la sensibilité de 10^{-4} .⁹⁸ La méthode par PCR est moins largement utilisée car plus longue et plus coûteuse. Cependant, contrairement à la CMF, elle peut être réalisée sur moins de matériel et des échantillons non frais ou congelés.

Une 3^{ème} méthode de détection de la MRD basée sur l'ADN et ne nécessitant pas d'amorce spécifique au patient est le séquençage haut débit ou séquençage de nouvelle génération (NGS) qui utilisent des amorces consensuelles pour l'amplification et la quantification de la séquence IGVH spécifique de la maladie.¹⁰⁰ Avec cette approche, une limite de détection de la MRD de 10^{-6} peut être obtenue (1 cellule leucémique détectée sur 1 million). Du fait de son coût, le séquençage haut débit peut être justifié uniquement dans le cas d'une stratégie thérapeutique visant à l'éradication de la maladie comme l'allogreffe ou une thérapie par CarT cell.

L'ensemble des avantages et inconvénients de ces 3 techniques est détaillé dans le tableau 11 :

Technique	CMF	RQ-PCR	NGS
Sensibilité	4 couleurs : 10^{-4} 5 ou 6 couleurs : 10^{-5}	10^{-5}	10^{-6}
Méthode	Détection d'antigènes de surface par le biais d'une combinaison d'anticorps permettant de distinguer les cellules normales des cellules LLC	Séquençage du gène IGVH du clone malin par des amorces spécifiques pour chaque patient puis amplification de l'ADN après traitement	Identification de mutations spécifique du gène IGVH du clone malin puis amplification et séquençage après de l'ensemble des segments du gène par l'utilisation d'amorces consensuelles
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Quantitative - Largement disponible - Rapidité de rendu du résultat - Haute standardisation - Pas de nécessité d'échantillon de référence (avant traitement) - Coût 	<ul style="list-style-type: none"> - Haute sensibilité - Viabilité des leucocytes non requise 	<ul style="list-style-type: none"> - Haute sensibilité - Viabilité des leucocytes non requise - Détection simultanée de plusieurs mutations
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessité d'échantillons frais < 48h - Perte de sensibilité sur les prélèvements hypocellulaires 	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode non directement quantitative - Nécessité d'un échantillon de référence - Analyse longue et coûteuse 	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode non directement quantitative - Nécessité d'un échantillon de référence - Analyse coûteuse

Tableau 11 : Caractéristiques des différentes méthodes d'évaluation de la MRD¹⁰¹

6.4.3 Évaluation de la maladie résiduelle après traitement dans les essais cliniques

Plusieurs études ont démontré la valeur pronostique de la négativité de la MRD en termes de SG et de SSP indépendamment du type et de la ligne de traitement ainsi que des facteurs pronostiques connus y compris les anomalies cytogénétiques. En 2016, une étude le montre sur une cohorte de 133 patients en RP ou en RC après traitement par chimio-immunothérapie de 1^{ère} ligne : la SSP à 10 ans est de 65% et la SG de 70% pour les patients MRD négatifs contre respectivement 10 et 30% pour les patients MRD positifs démontrant l'avantage à long terme de la mise en évidence d'une MRD négative.¹⁰² Dans les études CLL8 et CLL10, la SSP ne diffère pas entre les patients en RC et ceux en RP du moment que la MRD est négative alors que la SSP est plus longue pour le patient en RP MRD négative que pour le patient en RC MRD positive.¹⁰³ De plus, une étude américaine portant sur une cohorte de patients traitée par RFC

en première ligne et disposant d'une évaluation médullaire de la maladie résiduelle minimale après 3 et 6 cycles a été publiée. Il apparaît que la SSP des patients stoppant le traitement après 3 cycles avec une MRD indétectable n'est pas différente de celle des patients ayant une MRD indétectable à l'issue des 6 cycles. Un arrêt du traitement après 3 cycles de RFC en situation de MRD négative permettrait de réduire l'exposition à la chimiothérapie cytotoxique, réduisant ainsi les complications secondaires associées comme les infections, la myélosuppression, le syndrome myélodysplasique, la leucémie aiguë ou l'apparition d'autres tumeurs malignes.¹⁰⁴

6.4.4 Intérêt et utilisation de la maladie résiduelle post greffe

Plusieurs équipes ont démontrés qu'une MRD négative à 12 mois après l'allogreffe était un très bon indicateur prédictif d'une survie plus longue et sans rechute et ainsi d'un contrôle à long terme de la maladie. Des études prouvent que la surveillance quantitative de la MRD pourrait être très utile pour guider l'immunothérapie préventive après l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, en particulier après un conditionnement d'intensité réduite. En effet, la surveillance de la MRD après l'allogreffe permettrait de diminuer le risque de rechute en modulant l'immunosuppression par la réduction progressive de la thérapie immunosuppressive ou par les perfusions de lymphocytes du donneur. L'essai CLL3X a montré que l'effet protecteur de la négativité de la MRD à 12 mois était encore plus prononcé avec une meilleur SSP, si la diminution de la MRD ne survient qu'après l'arrêt de l'immunosuppression, suggérant un important effet « greffon contre leucémie ».¹⁰⁵

En conclusion, la MRD est un puissant outil pronostique pour prédire l'issue des patients atteints de LLC dans le cadre de plusieurs essais cliniques et représente désormais un outil d'évaluation de l'efficacité thérapeutique largement utilisé. De plus, depuis l'utilisation des nouveaux agents, l'éradication de la maladie devient un objectif réalisable. Cependant, l'évaluation de la MRD n'est toujours pas recommandée dans la pratique clinique de routine mais elle est incluse dans de nombreux essais cliniques dans l'objectif de définir un paramètre fiable capable d'évaluer l'efficacité et les décisions thérapeutiques, avec une modulation du type, de la dose et de la durée du traitement en fonction de la réponse de chaque patient. En effet, la MRD pourrait devenir l'outil le plus approprié pour étudier la cinétique de la maladie, guider les décisions de traitement en évitant le sur-traitement et en limitant la toxicité d'un côté et en évitant la rechute précoce d'un autre côté.

6.5 Traitement des patients en rechute ou réfractaire

Lorsque la présence d'une maladie progressive a été confirmée, la recherche d'une éventuelle anomalie de *TP53* doit être réitérée car celle-ci est plus fréquente en situation de rechute. Il convient également d'exclure une transformation de Richter avant l'instauration du traitement de 2^{ème} ligne. Le statut mutationnel de *TP53* n'influera pas le choix du traitement étant donné que tous les nouveaux agents utilisés en 2^{ème} ligne ont une excellente efficacité dans ce groupe de patient, cependant, la fréquence de suivi, la surveillance de la progression de la maladie et le bénéfice attendu de la SSP seront différents suivant qu'il existe une anomalie de *TP53*. Les inhibiteurs du BCR comme l'Ibrutinib et l'Idélalisib ainsi que les antagonistes de BCL2 comme le Vénétoclax permettent d'obtenir des rémissions prolongées dans les LLC réfractaires ou en rechute y compris en cas d'anomalies génétiques défavorables. En règle générale, chez les patients en rechute, le traitement de première intention peut être répété si la durée de la première rémission dépasse 36 mois. Cependant, cela est différent dans la LLC réfractaire au traitement. En effet, le protocole thérapeutique initial doit être modifié car la 2^{nde} rémission est généralement plus courte.

Les options possibles sont les suivantes :

- Vénétoclax seul ou combiné au Rituximab,
- Ibrutinib seul ou combiné au Vénétoclax,
- Idelalisib + Rituximab,
- Lénalidomide + Rituximab,
- Allogreffe de cellules souches à visée curative,
- Alemtuzumab seul ou en association.

Étant donné l'insuffisance des essais randomisés comparant l'Ibrutinib au Vénétoclax, le choix initial entre ces molécules dans la LLC en rechute ou réfractaire dépend de l'aptitude du patient, de la disponibilité de la molécule et des effets secondaires potentiels. Chez les patients atteints d'une maladie cardio-vasculaire nécessitant un traitement anticoagulant ou présentant un risque élevé de saignement, le Vénétoclax sera préféré à l'Ibrutinib. En revanche, les patients présentant un volume tumoral important courent un risque significatif de développer un syndrome de lyse tumoral avec le Vénétoclax et se verront proposer l'Ibrutinib. Les patients traités par Vénétoclax peuvent potentiellement obtenir une RC avec MRD négative plus précocement que ceux traités par Ibrutinib en monothérapie, mais les données concernant l'arrêt

des nouveaux agents étant inexistantes, cela ne devrait pas rentrer en considération dans le choix thérapeutique. Chez les patients en rechute ou réfractaire présentant une maladie évolutive sous Ibrutinib, il est important de distinguer la transformation de Richter de la LLC progressive. Si la transformation de Richter est exclue, le Vénétoclax est le traitement de choix, associé à un anticorps monoclonal anti-CD20.

Concernant la transformation en syndrome de Richter, si ce dernier n'est pas clonalement lié à la LLC ou si le patient n'a pas reçu de traitement antérieur pour sa LLC, un traitement cytotoxique multi-agents par R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prednisone) peut être un traitement de 1^{ère} intention approprié. Pour les patients développant une transformation après traitement par Ibrutinib ou clonalement liés, avec perturbation TP53 ou mutation NOTCH1, le traitement par inhibiteur de la protéine de mort programmée 1 (PD1), tels que le Pembrolizumab et le Nivolumab, a montré des résultats prometteurs dans des essais cliniques.

Réponse à la 1 ^{ère} ligne de traitement	Etat physique	Traitement
Réfractaire ou progression dans les 3 ans	Bon	Ibrutinib ou Vénétoclax + Rituximab ou Idelalisib + Rituximab ou Lenalidomide (+ Rituximab) ou Alemtuzumab (+ Fludarabine ou dexaméthasone). Discussion de l'allogreffe
	Altéré	Ibrutinib ou Vénétoclax + Rituximab ou Idelalisib + Rituximab ou Lenalidomide (+ Rituximab) ou Alemtuzumab + dexaméthasone ou Rituximab haute dose
Progression après 3 ans	/	Réitérer la 1 ^{ère} ligne de traitement si possible

Tableau 12 : Recommandations sur la 2^{ème} ligne de traitement de la LLC adapté selon Kipps et al.⁹⁰

Les résultats des essais cliniques comparant les nouvelles thérapies ciblées ayant l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans la LLC en 1^{ère} ou 2^e ligne de traitement sont rassemblés dans le tableau 13 :

Treatment	N	Age ^a	ORR	CR %	PR %	uMRD %	PFS ^b	2y-PFS	2y-OS	Reference
Randomized studies in first line treatment										
Ibrutinib	136	73	86%	4%	82	NA	NR	89%	98%	Burger et al. 2015 ¹⁰⁷
Chlorambucil (CLB)	133	72	35%	2%	22	NA	18.9	34%	85%	
Ibrutinib + rituximab	354	58	NA	NA	NA	NA	NA	3 years: 89%	NA	Shanafelt et al. 2018 ¹⁰⁸
FCR	175	57	NA	NA	NA	NA	NA	3 years: 73%	NA	
Ibrutinib	182	71	93%	7%	NA	1%	NR	87%	90%	Woyach et al. 2018 ¹⁰⁹
Ibrutinib + rituximab	182	71	94%	12%	NA	4%	NR	88%	94%	
BR	183	70	81%	26%	NA	8%	41.0	74%	95%	
Ibrutinib + obinutuzumab	113	70	88%	19%	69%	35%	NR	30 m: 79%	30 m-OS: 86%	Moreno et al. 2019 ¹¹⁰
CLB + obinutuzumab	116	72	73%	8%	66%	25%	19.0	30 m: 31%	30 m-OS: 85%	
Venetoclax + obinutuzumab	216	72	85%	50%	35%	76%	NR	88%	92%	Fischer et al 2019 ¹¹¹
CLB + obinutuzumab	216	71	71%	23%	48%	35%	NR	64%	93%	
Randomized studies in treatment of relapsed/refractory CLL										
BR + ibrutinib	289	64	83%	10%	72%	26%	NR	18 m: 79%	3y-OS: 82%	Chanan-Khan et al. ^{112,113}
BR	289	63	68%	3%	65%	6%	13.3	18 m: 24%	3y-OS: 73%	
Venetoclax + rituximab	194	65	92%	8%	84%	62%	NR	85%	92%	Seymour et al. 2018 ¹¹⁴
BR	195	65	72%	4%	69%	13%	17.0	63%	87%	
Idelalisib + rituximab	110	71	81%	0	81%	NA	NR	6 m: 93%	1y-OS: 92%	Furman et al. 2014 ¹¹⁵
Rituximab	110	71	13%	0	13%	NA	5.5	6 m: 46%	1y-OS: 80%	
BR + idelalisib	207	62	70%	1%	69%	NA	20.8	NA	NA	Zelenetz et al. 2017 ¹¹⁶
BR	209	64	45%	0	44%	NA	11.1	NA	NA	

Abbreviations: BR, bendamustine rituximab; CR %, complete response rate; FCR, fludarabine cyclophosphamide rituximab; ORR, overall response rate; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; PR %, partial response rate; uMRD %, rate of patients with undetectable MRD (<10⁻⁴) in PB.
^amedian, years.
^bmedian, months.

Tableau 13 : Résultats d'études randomisées sur le Rituximab, le Chlorambucil, la Bendamustine, l'Obinutuzumab, l'Ibrutinib, l'Idélalisib et le Vénétoclax, d'après Kipps et al., 2019⁹⁰

6.6 Place de l'allogreffe

A ce jour, la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétique représente la seule stratégie de guérison de la LLC. D'après plusieurs études prospectives, l'allogreffe doit être réalisée assez précocement chez des patients identifiés de mauvais pronostic au diagnostic ou en rechute précoce après des traitements de référence.^{106, 107, 108, 109, 105} Ces études évaluent l'allogreffe à conditionnement d'intensité réduite. L'objectif principal est de trouver l'équilibre optimal entre la maladie du greffon contre l'hôte et l'effet du greffon contre la leucémie, l'un des principaux facteurs étant l'ajustement du conditionnement. L'allogreffe myéloablative dans la LLC peut aboutir à des rémissions complètes, mais avec un taux de mortalité élevé. La procédure d'allogreffe non myéloablative à conditionnement d'intensité réduite a induit des rémissions moléculaires chez des patients atteints de LLC avancée associée à des facteurs

pronostiques très défavorables avec une mortalité liée au traitement moins élevée. Une étude prospective chez des patients ≤ 65 ans atteints de LLC de stade B ou C, a évalué l'efficacité du conditionnement combinant Fludarabine, irradiation corporelle totale et Rituximab avant l'allogreffe allogénique. Les résultats étaient prometteurs en termes de survie globale et de contrôle de la maladie avec cependant un taux élevé de maladie du greffon contre l'hôte (GVH) malgré l'utilisation précoce du Rituximab.¹¹⁰

En 2007, l'EBMT a défini les groupes de patients à haut risque pouvant bénéficier d'une allogreffe : ¹¹¹

- Les patients réfractaires ou présentant une rechute dans les 12 mois après traitement par analogues des purines
- Les patients présentant une rechute dans les 24 mois après avoir obtenu une réponse par une thérapie combinant analogue des purines, alkylant et/ou anticorps monoclonal ou après autogreffe
- Les patients présentant des anomalies TP53 nécessitant un traitement quel que soit la ligne.

Cependant, du fait de l'arrivée des inhibiteurs du BCR (BCRi) puis de l'inhibiteur BCL2 (Vénétoclax), les critères d'allogreffe dans les LLC à haut risque ont été modifiés. En effet, tous les patients atteints de LLC à haut risque doivent se voir proposer un traitement par BCRi ou anti-Bcl2. Une fois la réponse maximale atteinte soit le patient effectue une consolidation par allogreffe soit il continue son traitement par nouveaux agents jusqu'à progression, reportant l'allogreffe à la ligne de traitement suivante. Les preuves de supériorité d'une de ces deux options n'ont pas encore été démontrées. Les conditions susceptibles de favoriser l'allogreffe immédiate dans la LLC à haut risque sont: la présence de mutations *TP53* et/ou *del(17p)* et/ou *del(11q)* chez un patient réfractaire ou en rechute, un âge jeune avec aucune comorbidité significative et la disponibilité d'un donneur compatible.¹¹² Par ailleurs malgré le potentiel curatif de cette méthode, jusqu'à 50% présentent une rechute post allogreffe. L'utilisation de l'Ibrutinib dans le traitement des rechutes post allogreffe a montré un taux de réponse élevé avec la possibilité d'obtenir une MRD négative et cela sans exacerbation de la GVH. Ainsi, la question se pose de l'utilisation de l'Ibrutinib comme traitement pré-emptif précoce post allogreffe en cas de MRD positive dans les 3 à 6 mois.¹¹³ De plus une étude sur des modèles murins a démontré que l'Ibrutinib, inhibiteur irréversible de la Bruton Tyrosine Kinase mais aussi de la tyrosine kinase des lymphocytes T ITK (IL-2 inducible T-cell Kinase), induirait une amélioration de la GVH chronique.¹¹⁴

L'ensemble des molécules utilisées dans le traitement de 1^{ère} et de 2^e ligne cible des mécanismes moléculaires à l'origine de la pathogénèse de la LLC et une connaissance approfondie de ces divers mécanismes est essentielle pour la compréhension des nouvelles thérapies ciblées. A ce jour, la LLC reste une maladie incurable ce qui justifie le développement de nouvelles pistes thérapeutiques basées sur une meilleure compréhension des mécanismes pathogéniques impliqués dans la LLC.

II. Physiopathologie de la LLC et nouvelles cibles thérapeutiques

1. Physiopathologie

Les mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans le développement de la maladie ne sont pas encore bien connus. Cependant, des observations récentes suggèrent que la modulation des signaux de survie interférant avec l'apoptose, ainsi que la stimulation antigénique du BCR et l'interaction des cellules leucémiques avec le microenvironnement ganglionnaire joueraient un rôle essentiel dans la pathogénèse de la LLC.

1.1 Génétique

Dans la LLC, les altérations génétiques peuvent inclure :

- des altérations chromosomiques,
- des mutations,
- des altérations de l'expression des micro ARN (miR) et
- des modifications épigénétiques.

1.1.1 Altérations chromosomiques : ¹¹⁵

L'anomalie cytogénétique la plus fréquente est la **délétion 13q14** qui est associée à un pronostic favorable lorsqu'il s'agit d'une délétion isolée. Au sein de la région supprimée se trouve le gène d'ARN non codant DLeu2 contenant le cluster miR-15a et miR16-1, qui régule l'expression des protéines ayant un rôle dans l'inhibition de l'apoptose ou impliquées dans la progression du cycle cellulaire (cf. figure 6). Ces deux microARN (miR) sont dérégulés dans environ 60% des cas de LLC.

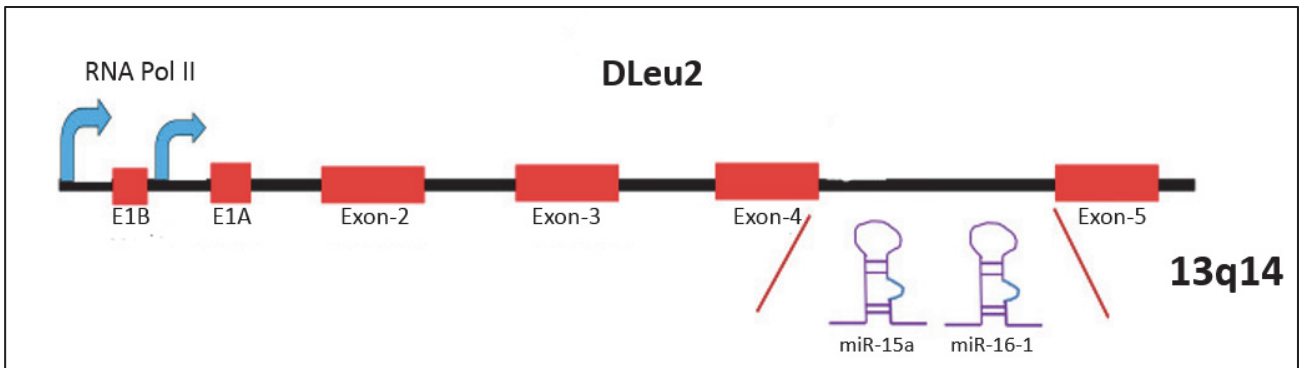
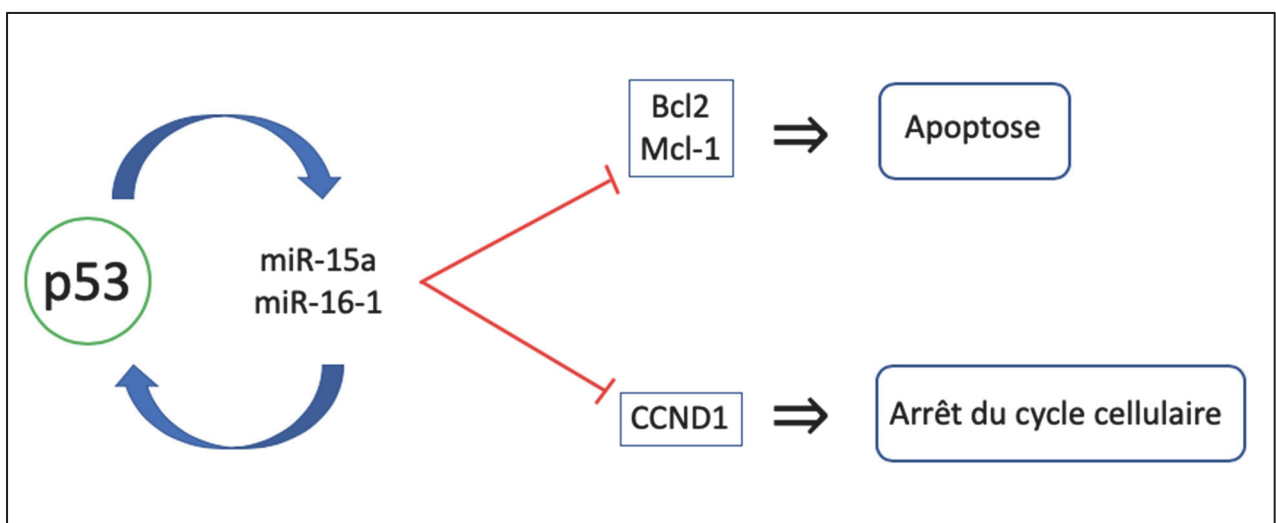


Figure 6 : Localisation génomique de miR-15/miR-16-1 dans la partie minimale délétée du chromosome 13 adapté d'après MJ Ramaiah et al 2018.¹¹⁶

Ces micro-ARN jouent un rôle dans la régulation négative de l'expression des gènes *BCL2* et *MCL-1* au niveau post-transcriptionnel qui codent pour les protéines anti-apoptotiques bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) et mcl-1 (Myeloid cell factor 1), ainsi que du gène *CCND1* qui code pour la cycline D1, impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi par la répression de ces gènes, ces microARN induisent l'apoptose, et semblent donc jouer un rôle suppresseur de tumeur (cf. figure 7).^{117, 118, 119} De ce fait, la suppression de ces miRs dans les cellules de LLC avec délétion 13q, favorise la survie et le cycle des cellules tumorales B dans la LLC.

De plus, les sites de liaison de *TP53* se trouvent en amont des loci génomiques miR-15/16 sur le chromosome 13 et le chromosome 3 et la liaison de *TP53* améliore l'expression de miR-15/16. Il existe donc une boucle de rétroaction positive entre miR-15/16 et la protéine p53 (cf. figure 7). Dans la LLC, même en l'absence de délétion 13q, p53 étant à un niveau très bas, l'activation transcriptionnelle des miRs est donc minimale.



*Figure 7 : Schéma illustrant la régulation négative de l'expression des gènes *BCL-2*, *MCL-1* et *CCND1* par miR-15/miR-16-1 et le mécanisme de rétroaction entre miR-15/miR-16-1 et *TP53*.*

La **délétion 11q22-23** est associée à une lymphadénopathie volumineuse, une progression plus rapide de la maladie ainsi qu'à la présence de marqueurs de mauvais pronostic comme le statut non muté des gènes IGVH, ce qui fait de cette anomalie un marqueur pronostique défavorable.⁵⁹ La région minimale délétée se situe en 11q22-q23 et contient le gène *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), dont les mutations prédisposent les patients aux tumeurs malignes lymphoïdes.¹²⁰ Le gène *ATM* code pour une protéine qui agit en amont de *P53* dans l'identification et la réparation des dommages de l'ADN.¹²¹ Il protège l'intégrité du génome en régulant l'arrêt du cycle cellulaire à G1/S et G2/M pour empêcher le traitement de l'ADN endommagé. Il active les voies de réparations de l'ADN ou, alternativement, induit l'apoptose si les dommages de l'ADN ne peuvent être réparés. D'autres gènes cibles peuvent être impliqués dans le rôle physiopathologique de cette aberration chromosomique.¹²² La délétion 11q22-23 contient toujours le gène *ATM*. Elle peut être primaire ou secondaire dans l'évolution de la maladie et est également à l'origine d'une résistance au traitement par agents alkylants ou analogues des purines.

Des données récentes ont révélé que la délétion 11q pourrait également impliquer le gène *BIRC3*, qui a un rôle dans la régulation négative de NFκB, et est situé en 11q22.2. Une corrélation existerait entre l'incidence de la délétion et/ou la mutation de *BIRC3*, qui reste très peu fréquente, et la présence des mutations *ATM*. L'inactivation de *BIRC3* est mutuellement exclusive de la mutation *TP53* et est également associée à une résistance accrue aux chimiothérapies.¹²³

La trisomie 12 est considérée comme un marqueur de pronostic intermédiaire d'après le modèle pronostique hiérarchique initialement proposé par Döhner *et al* en 2000.⁴⁵ La région minimale de duplication correspondant au segment 12q13q22 contient un grand nombre de gènes candidats pouvant expliquer les particularités phénotypiques (*MDM2*, *CDK2*, *CDK4*...). Cependant, les phénomènes physiopathologiques associés à cette anomalie restent, à l'heure actuelle, encore mal connus.¹²⁴

La **délétion 17p13** est associée à un gène suppresseur de tumeur *TP53*. Les mutations/délétions *TP53* sont retrouvées dans de nombreux cancers et conduisent à la perte d'activité de la protéine p53, qui est une protéine suppresseur de tumeur, favorisant ainsi la progression tumorale. La p53, dont le gène est situé sur le bras court du chromosome 17, joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en cas d'endommagement de l'ADN, comme le gène *ATM*. Selon le type d'anomalie génique, l'impact fonctionnel sur la

protéine sera différent. En effet, certaines anomalies comme les délétions 17p, les mutations « décalage de lecture », les mutations « stop » ou les mutations « faux sens » aboutissent à la perte d'expression de la p53 alors que d'autres mutations peuvent entraîner un gain de fonction de la protéine mutée comme la mobilité cellulaire ou l'inhibition de l'apoptose, favorisant la prolifération tumorale.¹²⁵ Les mutations du gène *TP53* ont donc un impact défavorable sur l'évolution de la LLC et ces anomalies sont responsables d'une chimiorésistance lors de l'utilisation d'agents alkylants et d'analogues de purines. Cette résistance s'explique par le fait que ces molécules agissent sur les cellules leucémiques par l'induction de l'apoptose dépendante de p53. Ainsi lorsque la cellule est dépourvue d'une voie p53 normale, elle va se libérer du processus apoptotique et la prise d'un traitement pourra même entraîner l'acquisition d'anomalies supplémentaires.

En plus des altérations chromosomiques habituellement décrites dans la LLC et participant à la physiopathologie de la maladie, il existe des mutations somatiques de plusieurs gènes qui ont été décrites et qui sont impliquées dans diverses voies cellulaires.

1.1.2 Mutations somatiques

L'application récente des techniques de séquençage massif a permis de mettre en évidence **l'importante hétérogénéité génétique et épigénétique présente dans la LLC**. Le séquençage de l'exome entier a révélé de nouvelles mutations génétiques communes, potentiellement impliquées dans l'histoire naturelle de la LLC.¹²⁶ Les mutations somatiques les plus fréquentes touchent des gènes impliqués dans les voies cellulaires critiques décrites sur la figure 8, telles que:

- la réparation des dommages de l'ADN ou le contrôle du cycle cellulaire (*TP53, ATM, POT1, BIRC3*),
- le traitement de l'ARNm (*SF3B1, DDX3X, XPO1, RPS15*),
- la modification de la chromatine (*CHD2, ZMYM3, IKZF3*),
- la signalisation NOTCH (*NOTCH1, FBXW7*),
- la signalisation WNT
- les voies inflammatoires (*MYD88, MAPK1*).¹²⁷

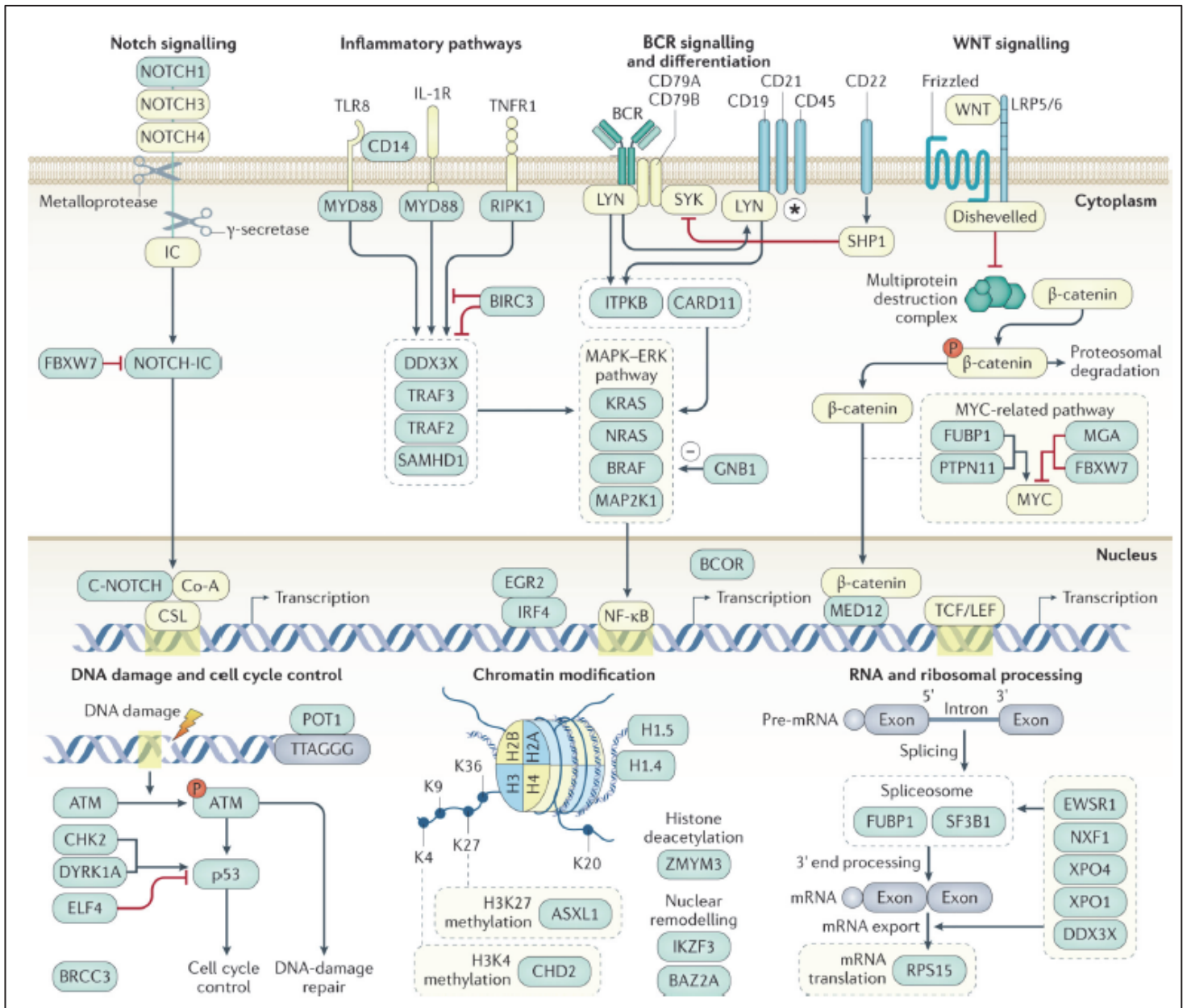
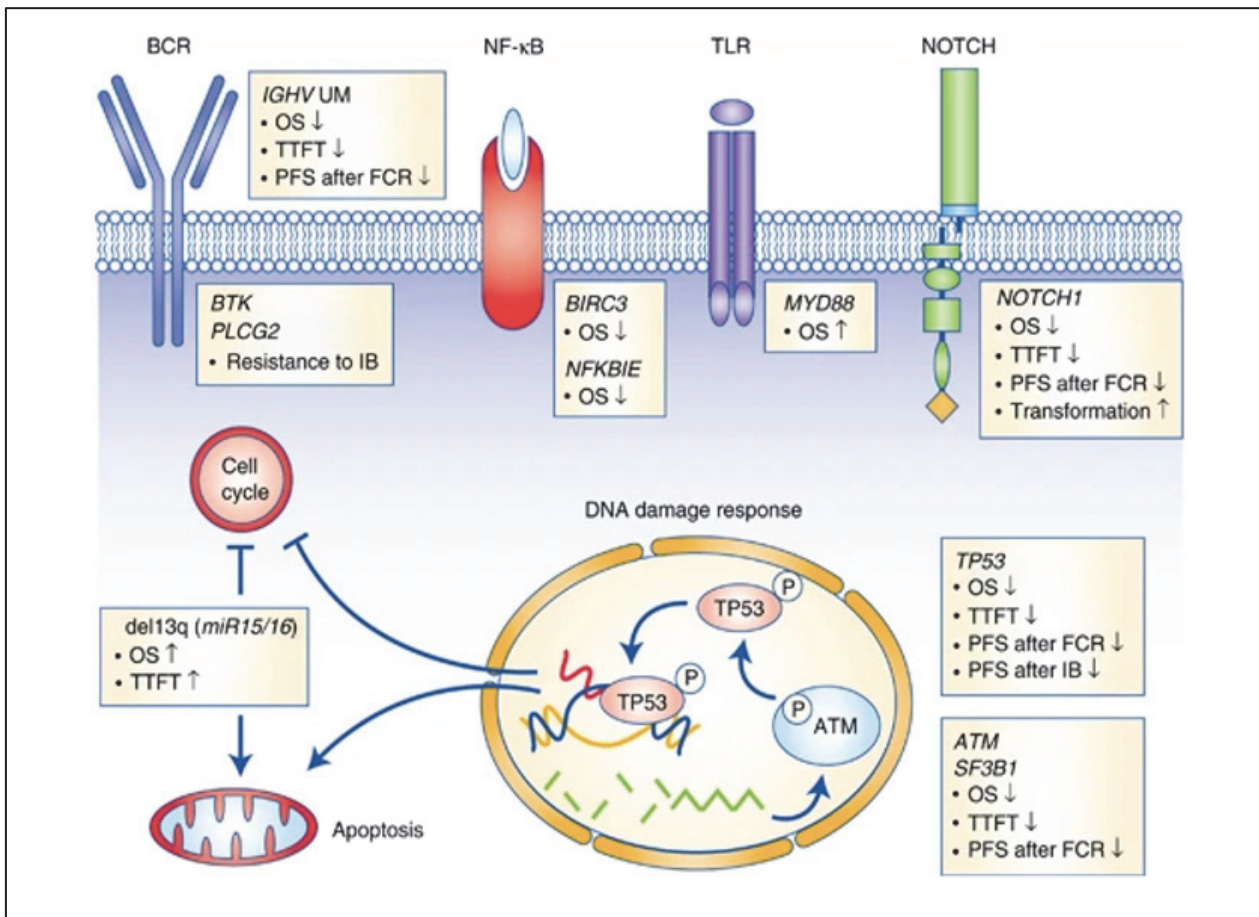


Figure 8 : Schéma des différentes mutations somatiques et des voies de signalisation impliquées dans la LLC d'après Kipps et al. 2017. ³²

D'après des études génomiques, les gènes les plus fréquemment mutés dans la LLC sont : *SF3B1* (5-18%), *ATM* (11-25%), *TP53* (9%), *NOTCH1* (8%), *BIRC3* (4%). Ces fréquences augmentent chez les patients dont la maladie progresse ou qui sont réfractaires aux traitements, sachant que l'évolution clonale est souvent conditionnée par les traitements.⁴³ Certaines anomalies s'excluent mutuellement alors que d'autres sont fréquemment associées. La mutation *NOTCH1* est fréquemment associée à la trisomie 12, au statut IGVH non muté, à une évolution clinique agressive et à un risque accru de transformation en syndrome de Richter. La mutation *NOTCH1* est également associée à une diminution de l'expression du CD20 à l'origine d'une

moindre sensibilité aux anticorps anti-CD20.¹²⁸ La mutation *BIRC3* s'exclue mutuellement avec la mutation *TP53*. Il a été montré pour certains gènes : *SF3B1*, *TP53*, *NOTCH* et *BIRC3* un rôle pronostique sur la SG, la SSP ou la TTFT (cf. figure 9). Ces gènes ont même été intégrés, dans l'index pronostique élaboré par Rossi *et al.* associant anomalies cytogénétiques et géniques.⁸²

Le rôle fonctionnel des différents gènes mutés dans la LLC a été mis en évidence : On peut donc citer les mutations *TP53* et *ATM* qui jouent un rôle dans les réparations des dommages de l'ADN comme détaillé précédemment. Le gène *POT1* a un rôle dans la protection des télomères, et sa mutation conduit à de nombreuses anomalies chromosomiques, en plus du développement de télomères anormaux. Des mutations de *SF3B1* se sont avérées être associées à un épissage d'ARN aberrant¹²⁹. Les mutations activatrices de *NOTCH1* semblent conférer aux cellules de LLC une augmentation de leur chimiotactisme ainsi que de leur prolifération ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les cellules primaires de LLC porteuses de mutations *NOTCH1* ont une forte expression de c-MYC, acteur crucial de la prolifération cellulaire.¹³⁰ On peut également citer *RPS15*, qui code pour la protéine ribosomale 40S S15, et qui est muté de façon récurrente chez environ 20% des patients qui rechutent après une chimiothérapie combinée.¹³¹ De plus, des mutations au niveau d'un amplificateur situé sur le chromosome 9p13 entraînent une expression réduite du facteur de transcription spécifique aux cellules B *PAX5*.¹³² De nombreuses mutations de la voie WNT, essentielle pour la prolifération de nombreux types de cellules dont les lymphocytes B, ont été mise en évidence dans les cellules de LLC et impactent sur la survie cellulaire.¹³³ Des mutations du gène *MYD88* codant pour une protéine adaptatrice cytosolique, essentielle dans la voie de signalisation de l'Interleukine-1 et des TLR (Toll-like receptor), entraînent des anomalies de la régulation de l'activation de nombreux gènes pro-inflammatoires.¹³⁴



OS: overall survival; TTFT: predict survival and time to first treatment; PFS: progression free survival

Figure 9 : Schéma des voies de signalisation affectées par les anomalies moléculaires les plus fréquentes dans la LLC et implications cliniques de ces mutations géniques d'après Rossi et al 2016.¹³⁵

En plus des anomalies génétiques, il a été montré que l'épigénétisme jouait également un rôle important dans la pathogénèse des cellules de la LLC.

1.1.3 Epigénétique

La dérégulation du contrôle transcriptionnel causé par la méthylation aberrante de l'ADN et/ou les modifications des histones, est une caractéristique des cellules cancéreuses.¹³⁶ L'épigénome des cellules de LLC montre une hypométhylation génomique globale combinée à une hyperméthylation locale dans les régions transcrites.¹³⁷ L'augmentation de l'hétérogénéité de la méthylation est associée à une complexité génique accrue en raison de l'acquisition de mutations sous clonales dans la LLC, reliant évolution génomique et méthylomique. En effet, une méthylation localement désordonnée dans la LLC pourrait améliorer la capacité d'adaptation évolutive des cellules de LLC, offrant ainsi des possibilités accrues de mutations

somatiques au sein du clone leucémique. Par conséquent, il a été mis en évidence une association entre l'évolution de la méthylation et l'évolution clinique défavorable.^{138, 139}

Sur la base du statut de méthylation de 5 sites CPG uniques, une nouvelle classification épigénétique de la LLC a récemment été proposée, classant les patients atteints de LLC en 3 sous-groupes clinico-biologiques différents : les cellules B mémoires (m-CLL), les cellules B naïves (n-CLL) et les cellules intermédiaires (i-CLL). Ces profils de méthylation ont été étudié suivant le statut mutationnel IGVH, et les patients m-CLL et n-CLL correspondent respectivement à des patients porteurs de gènes IGVH mutés et non mutés.¹⁴⁰ La diversité de la probable origine des cellules de LLC met en évidence l'hétérogénéité biologique et phénotypique de cette maladie. Ainsi, la programmation épigénétique dépendante des facteurs de transcription a un rôle potentiellement important dans le développement de la LLC.

Par ailleurs, de multiples études ont montré qu'une régulation altérée des enzymes modificatrices des histones contribue de manière significative à l'initiation et à la progression du cancer. L'histone méthyltransférase EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) induit une répression génique en catalysant la triméthylation de l'histone 3 lysine 27 (H3K27me3) et sert d'intermédiaire pour le silençage des gènes cibles impliqués dans les processus cellulaires fondamentaux. Dans la LLC, l'expression et les mutations aberrantes d'EZH2 affectant les composants des complexes de remodelage de la chromatine, semblent être impliquées dans la pathogénèse de la maladie. La surexpression de *EZH2* dans la LLC touche principalement les cas IGVH non mutés, et est associé à une survie et une prolifération cellulaire accrue.¹⁴¹ De plus, les mutations de gènes codant pour des composants des complexes de remodelage de la chromatine peuvent également être impliquées dans la pathogénèse de la LLC. Ces gènes permettent la régulation de la réparation de l'ADN, la réplication et la transcription. Par exemple les mutations de *ARID1A* codant une sous-unité d'un complexe de remodelage de la chromatine, sont retrouvées dans environ 2% des LLC. Des études récentes ont établi que *ARID1A* avait un rôle en tant que gène suppresseur de tumeur potentiel et régulateur du cycle cellulaire. Des mutations de *CHD2* (Chromodomain Hélicase DNA binding protein 2), un autre gène impliqué dans le remodelage de la chromatine, ont été identifiées dans environ 5% des cas de LLC, la majorité étant associées à un statut IGVH muté et à un pronostic favorable.¹³⁶

1.1.4 Altération des microARN (miR)

Les miRs sont des petits ARN non codants qui régulent l'expression génique post-transcriptionnelle, et la dérégulation des miRs est un autre évènement important contribuant au

développement de la LLC. Plus précisément, le *miR-15a* et le *miR-16-1*, présents sur le chromosome 13, sont dérégulés chez environ 60% des patients atteints de LLC, lors de la présence de la délétion 13q, comme déjà détaillé ci-avant.¹⁴² Par ailleurs, la perte ou l'expression réduite de tout ou d'une partie de certains miRs qui ciblent la région non traduite 3' de *TCL1A* (T-cell leukemia/lymphoma 1A), comme par exemple *miR-29a,b,c*, *miR-34b*, *miR-181b*, *miR-3676*, peut conduire à une expression accrue de *TCL1A*, qui lorsqu'elle est exprimée de façon constitutive dans les cellules B matures, favorise le développement de la LLC.^{143, 144} En effet, *TCL1* est une protéine oncogène qui joue un rôle central dans la lymphomagenèse en agissant comme co-activateur des kinases Akt et NF-κB. De plus, une expression accrue de *miR-155* est associée à une augmentation de la signalisation BCR, à la prolifération des lymphocytes B et à la lymphomagenèse¹⁴⁵ (son rôle précis sera développé plus loin).

Comme décrites dans la figure 8 p.67, de nombreuses anomalies sont impliquées dans les voies cellulaires critiques de la cellule de LLC. Une autre voie importante a été bien détaillée depuis ces dernières années avec l'avancée des connaissances dans la physiopathologie de la LLC, il s'agit de la voie de signalisation du BCR, voie fondamentale de la cellule B.

1.2 Voies de signalisations du BCR

1.2.1 *La maturation B et la signalisation du BCR en situation physiologique*

Le récepteur des cellules B (BCR) est un complexe récepteur transmembranaire qui est composé d'une immunoglobuline de surface spécifique de l'antigène associée à un fragment de transduction du signal sous forme d'hétérodimères (CD79A/B). Il est indispensable au processus de maturation d'une cellule B normale. Les lymphocytes B sont les principaux acteurs de la réponse humorale. Les différentes étapes de la maturation des lymphocytes B ont pour but la sélection de ceux capables de reconnaître un antigène spécifique grâce au BCR de haute affinité tout en éliminant ceux reconnaissant les antigènes du soi ou répondant avec une trop faible affinité. La différenciation des lymphocytes B s'effectue en deux étapes. La première est antigène-indépendante et s'effectue dans la moelle osseuse, organe lymphoïde primaire, conduisant à la cellule B immature et aboutissant au réarrangement des chaînes lourdes puis légères des immunoglobulines. Avant leur sortie de la moelle osseuse les cellules B immatures

vont subir une sélection négative permettant l'élimination des lymphocytes B auto-réactifs afin d'établir la tolérance. La maturation de ces précurseurs va se poursuivre dans les follicules B de la rate et des ganglions, il s'agit de la phase antigène-dépendante. Après reconnaissance d'un antigène spécifique, présenté par une cellule présentatrice d'antigène dans le centre germinatif, les lymphocytes B folliculaires interagissent avec les lymphocytes T conduisant à leur activation et à leur prolifération. L'acquisition des mutations somatiques ainsi que la commutation isotypique vont permettre la production de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes sécrétant des anticorps de haute affinité.¹⁴⁶

Le devenir des cellules B est déterminé par leur exposition à l'antigène, qui de part sa fixation à l'immunoglobuline de surface du BCR va provoquer une cascade de phosphorylations et d'activation de molécules effectrices ayant pour finalité l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B.¹⁴⁷ Comme illustré sur la figure 10, initialement, il se produit une activation de la tyrosine kinase de la rate (Syk) et de la tyrosine kinase Lyn, membres de la famille des kinases Src, qui entraîne la phosphorylation des motifs d'activation intracellulaires de la tyrosine (ITAM) sur CD79A/B, puis la phosphorylation de Syk qui est une étape clé dans la cascade de phosphorylation du BCR. Syk recrute à son tour, un complexe de signalisation associé à la membrane plasmique avec implication de plusieurs tyrosines kinases comprenant la Bruton Tyrosine Kinase (BTK) et des molécules régulatrices telle que la protéine de liaison des cellules B (BLNK). S'ensuit l'activation de la phospholipase Cy2 (PLCy2) et de la protéine Ras. Ras se lie et active la kinase Raf qui propage ensuite le signal vers la kinase régulée extracellulaire (ERK). La PLCy2 va à son tour mettre en jeu la signalisation du calcium, la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) et la signalisation de la protéine kinase C (PKC), conduisant à l'activation des facteurs de transcription nécessaires à la prolifération tels que NFkB et Myc. Parallèlement, la voie phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) va permettre le maintien de l'activation du BCR par l'activation d'Akt (protéine kinase B).^{148, 149} Certaines phosphatases telles que SHP1 et SHIP1/2 ainsi que les co-récepteurs CD22 et CD5 vont jouer le rôle de régulateurs négatifs de la signalisation B et participer à une modulation qualitative et quantitative fine du signal.¹⁵⁰

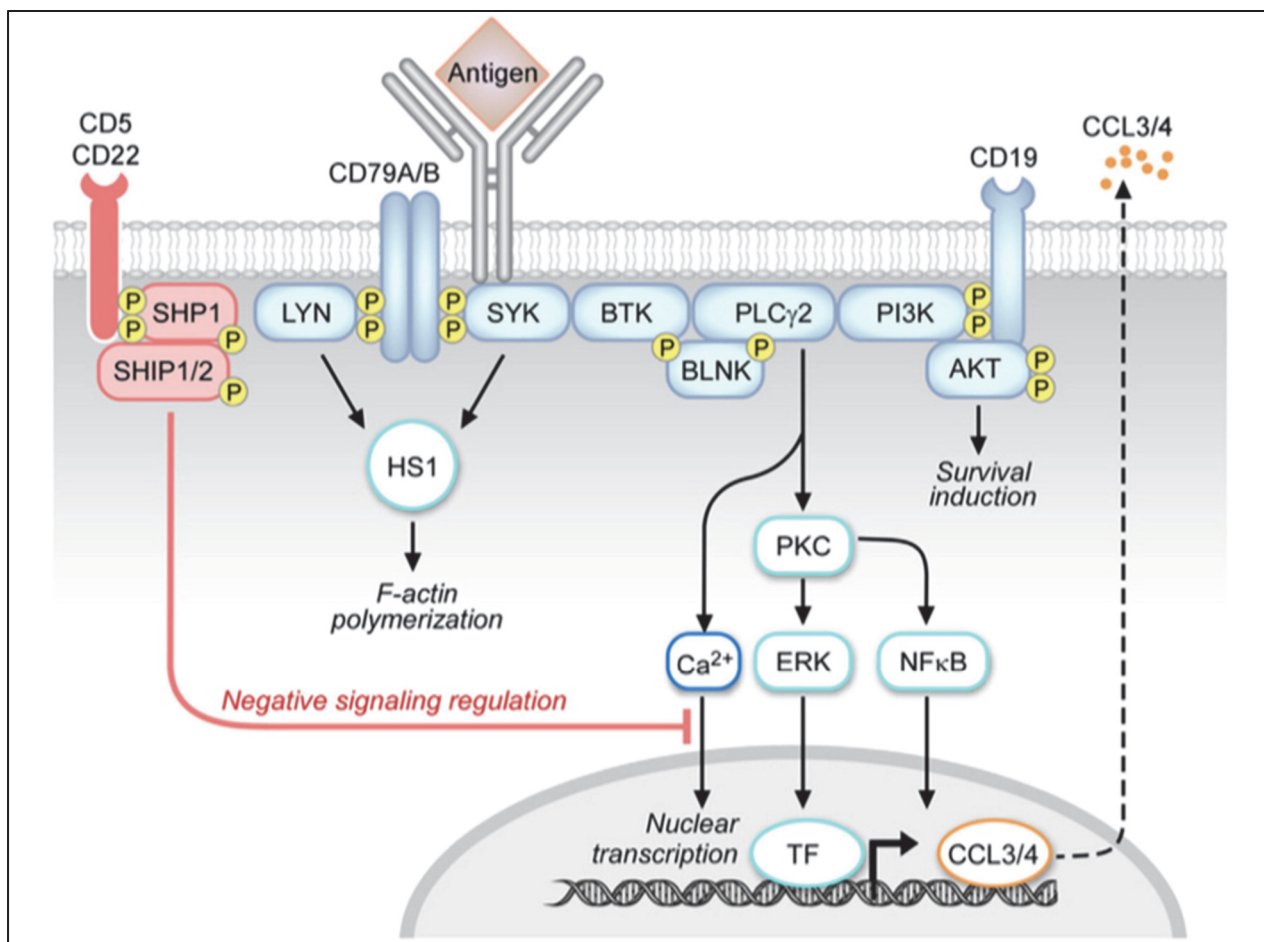


Figure 10 : Voies de signalisation du BCR d'après Ten Hacken et Burger, 2016.¹⁴⁹

1.2.2 La signalisation du BCR dans la LLC

La reconnaissance antigénique par le BCR joue un rôle primordial dans la pathogénèse de la LLC.

Deux sous-types de LLC se distinguent selon le statut mutationnel des gènes de chaînes lourdes d'immunoglobuline (IGHV). Dans 50% des cas, les cellules leucémiques ont acquis des mutations somatiques des gènes IGHV (M-CLL) et pourraient dériver des lymphocytes B naïfs ayant rencontré l'antigène de manière T dépendante dans le centre germinatif. Chez les patients avec un statut IGHV non muté (U-CLL), les cellules B naïves seraient issues d'une réponse immunitaire T-indépendante à l'extérieur des centres germinatifs. L'évolutivité de ces deux sous types est très différente et il est avéré que le statut IGHV non muté est un facteur pronostique défavorable lié à une plus grande capacité de prolifération et à une maladie plus agressive.¹⁵¹ De plus des études ont montré que ZAP 70 est généralement exprimée à des niveaux plus élevés dans les U-CLL que dans les M-CLL (cf. Figure 11)^{65, 152}.

Par ailleurs, le type d'antigène reconnu par le BCR varie entre les M-CLL et les U-CLL : les U-CLL ont un BCR polyréactif, capable de reconnaître plusieurs antigènes polyspécifiques, de nature non protéique. L'affinité des cellules leucémiques pour l'antigène est plus importante dans les M-CLL, dans lesquelles le BCR est monoréactif et reconnaît des antigènes protéiques.¹⁵³ Des études ont démontré l'importance de la capacité de signalisation du BCR dans l'évolutivité de la LLC par des méthodes de stimulation *in vitro* reproduite en exposant les cellules à un anticorps anti-IgM immobilisé. En effet, les M-CLL ne répondent pas ou très peu à la stimulation *in vitro* du BCR. Ces patients sont dits « non répondeurs » avec une faible activité métabolique, une réponse à l'apoptose non modifiée et présentent dans la majorité des cas une maladie indolente. En revanche, les U-CLL présentaient, après fixation de l'anti-IgM, une activation cellulaire avec une entrée en phase G1, une activité métabolique accrue et une inhibition de l'apoptose spontanée, conduisant à l'activation des effecteurs du BCR et donc à l'augmentation de la survie cellulaire et de la progression de la maladie. Ces patients sont appelés « répondeurs ».¹⁵⁴ (cf. Figure 11)

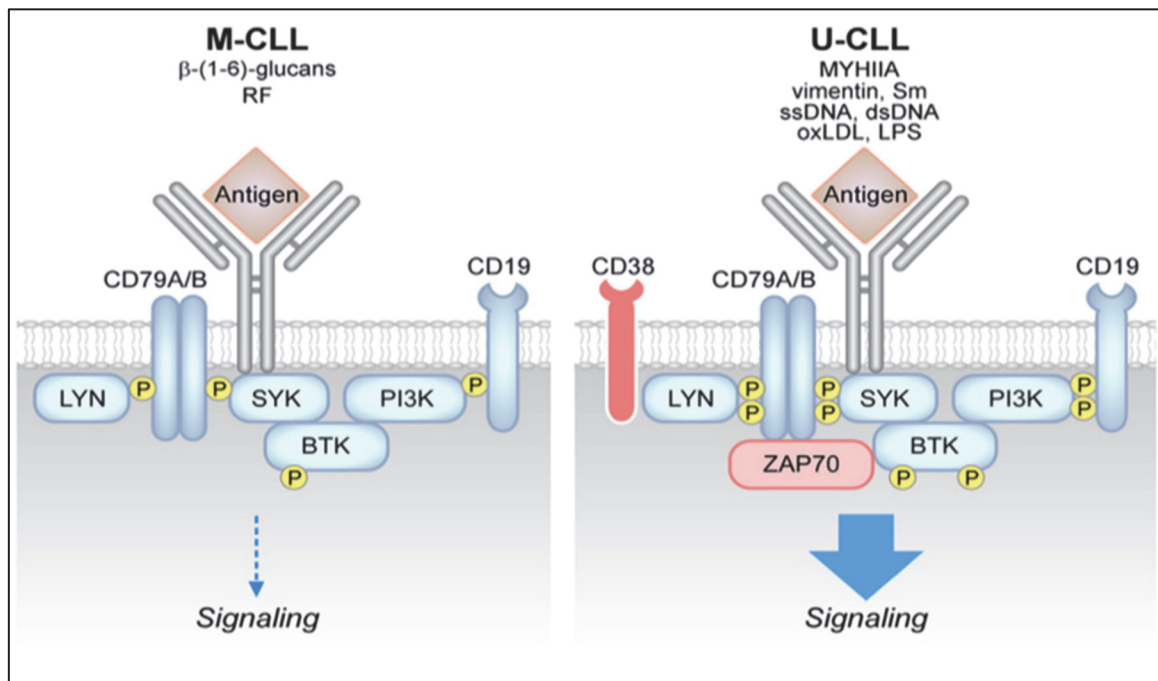


Figure 11 : Différence entre la voie de signalisation des cellules M-CLL et celle des cellules U-CLL d'après Ten Hacken et Burger, 2016¹⁴⁹

De plus, toutes les cellules B de LLC, présentent une phosphorylation constitutive des protéines de signalisation, et une activation constitutive du facteur de transcription NFAT, cependant sa capacité de liaison à l'ADN est améliorée lors de la stimulation des IgM dans les cellules U-LLC uniquement. Ainsi l'inhibition de l'activation du NFAT ou d'un intermédiaire de la voie de signalisation en amont transformerait les cellules des cas répondeurs en cas non répondeurs et représente donc une voie privilégiée pour des traitements ciblés de la LLC.¹⁵⁵

1.3 Rôle du microenvironnement

Si les cellules ont une survie prolongée *in vivo*, elles entrent pourtant spontanément et rapidement en apoptose *in vitro*, ce qui laisse supposer que le microenvironnement, notamment ganglionnaire, joue un rôle important dans la survie et dans la prolifération des cellules *in vivo*. En effet, la coculture des cellules leucémiques avec des cellules stromales prolonge leur survie *in vitro*. Les cellules de LLC interagissent avec différents types de cellules stromales telles que les MSC (Mesenchymal Stem Cells), les NLC (NurseLike Cells), d'autres cellules stromales comme les fibroblastes réticulaires ganglionnaires ainsi que les cellules T, formant ainsi le microenvironnement. La prolifération des lymphocytes B pathologiques se fait dans les « pseudo-follicules » correspondant aux ganglions lymphatiques à la structure désorganisée suite à l'invasion par les cellules de la LLC.¹⁵⁶ Dans les ganglions lymphatiques, ces cellules stromales jouent un rôle primordial dans la survie et la prolifération des cellules leucémiques, siège de la stimulation antigénique. En effet, les différentes cellules du microenvironnement transmettent des signaux de survie aux cellules de LLC notamment via le facteur d'activation des cellules B (BAFF) et d'un ligand induisant la prolifération (APRIL). La survie des cellules LLC peut également être favorisée *via* l'interaction entre le CD38 et le CD31 présents à la surface des cellules NLC et *via* l'interaction CD40-CD40L pour la coopération des cellules de LLC avec les lymphocytes T. Les cellules stromales NLC induisent une chimiotaxie et favorisent la survie des cellules de LLC par la sécrétion de chimiokines tel que CXCL12. En effet la migration des cellules de LLC dans le tissu lymphoïde est principalement médiée par CXCL12 et son récepteur CXCR4. Leur migration dans les ganglions lymphatiques se produit également via le récepteur CC-chimiokine 7 (CCR7) en réponse aux ligands CCL19 et CCL21, qui sont produits par les cellules endothéliales des HEV (High Endothelial Venules). La survie des cellules LLC peut également être favorisée par la production par les cellules stromales de facteurs WNT, qui peuvent interagir avec ROR1 et ROR2. D'autre part, les cellules MSC fournissent des signaux de survie et de migration aux cellules leucémiques, les protégeant de l'apoptose spontanée et favorisant la résistance aux médicaments. Le contact des cellules de LLC avec les cellules MSC est établi par le biais des interactions d'adhérence des protéines vasculaires 1 (VCAM1)- α 4 β 1.

A leur tour, les cellules LLC peuvent sécréter des chimiokines, telles que CCL3 et CCL4, permettant le recrutement des cellules T et des cellules précurseurs de NLC (monocytes) dans le microenvironnement tissulaire. Les cellules T activées peuvent fournir aux cellules de LLC des signaux prolifératifs via l'interaction CD40L-CD40 et la sécrétion de plusieurs cytokines, telles que IL-2, IL-4 et IL-10. A leur tour, les cellules LLC activées sécrètent CCL12 et CCL22, qui attirent davantage de lymphocytes T dans le microenvironnement ³² (cf.figure 12).

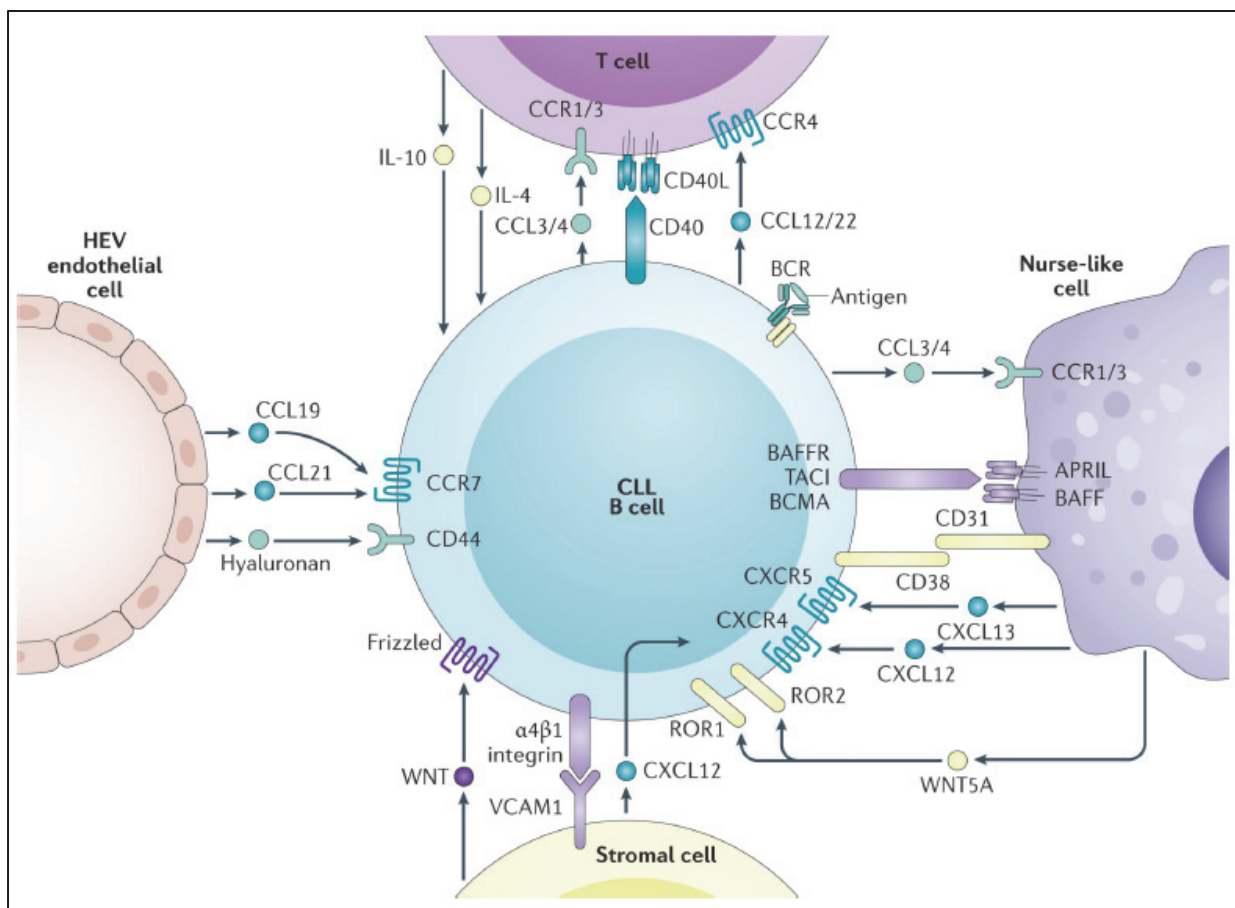


Figure 12 : Le microenvironnement des cellules de LLC d'après Kipps et al., 2017 ³²

De plus, suite à l'activation du BCR, les cellules stromales induisent une up-régulation des marqueurs agressifs de la maladie tels que ZAP70 et CD38 et une down-régulation de l'expression du CXCR4 et du CD62L (récepteur aux sélectines) à la surface des cellules tumorales conduisant à leur rétention intra-ganglionnaire par diminution de la migration ganglionnaire et de l'adhésion aux cellules endothéliales lymphatiques.^{149, 157}

Par ailleurs, très récemment, Griggio *et al* ont découvert l'implication du complexe protéique hypoxia-inductible factor 1 (HIF-1 α) dans la modulation des interactions des cellules de LLC avec le microenvironnement.¹⁵⁸ De manière physiologique, HIF-1 α permet la détection de la disponibilité en oxygène et ainsi une adaptation de la réponse cellulaire lors d'une hypoxie. L'hypoxie étant largement impliquée dans la biologie tumorale, la surexpression de HIF-1 α dans les cancers, est associée à un comportement agressif des cellules cancéreuses et est corrélée à une SG diminuée. Comme illustré dans la figure 13, il a été démontré que le contact des cellules de LLC avec les cellules stromales induit l'expression du facteur HIF-1 α via l'induction de la signalisation de la PI3K et de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK). Outre la transcription accrue de ce facteur, Griggio *et al* ont observé que des dans la

LLC, l'activité constitutivement plus élevée de HIF-1 α dans les cellules de LLC, est aussi due à une réduction du produit du gène von Hippel-Lindau (pVHL), qui est responsable de la dégradation de HIF-1 α . La régulation à la baisse du pVHL a été attribuée à l'activité inhibitrice du miR-155, un micro-ARN très abondant dans la LLC comme développé précédemment, contribuant à la stabilité de HIF-1 α dans les cellules leucémiques. De plus il a été démontré que la présence des mutations TP53 et FBXW7 chez les patients atteints de LLC était également associé à une stabilité accrue de HIF-1 α . Dans leurs travaux, Griggio et al ont montré que HIF-1 α régule l'interaction des cellules de LLC avec leur microenvironnement. Il a déjà été découvert que HIF-1 α induit une régulation à la hausse des récepteurs des chimiokines, tels que CXCR4, et des molécules d'adhésion cellulaire qui contrôlent l'interaction des cellules leucémiques avec la moelle osseuse et les microenvironnements lymphoïdes. A l'inverse, l'inactivation de HIF-1 α altérerait la chimiotaxie et l'adhésion cellulaire au stroma. Dans cette optique, HIF-1 α pourrait représenter une nouvelle cible dans la stratégie thérapeutique de la LLC.

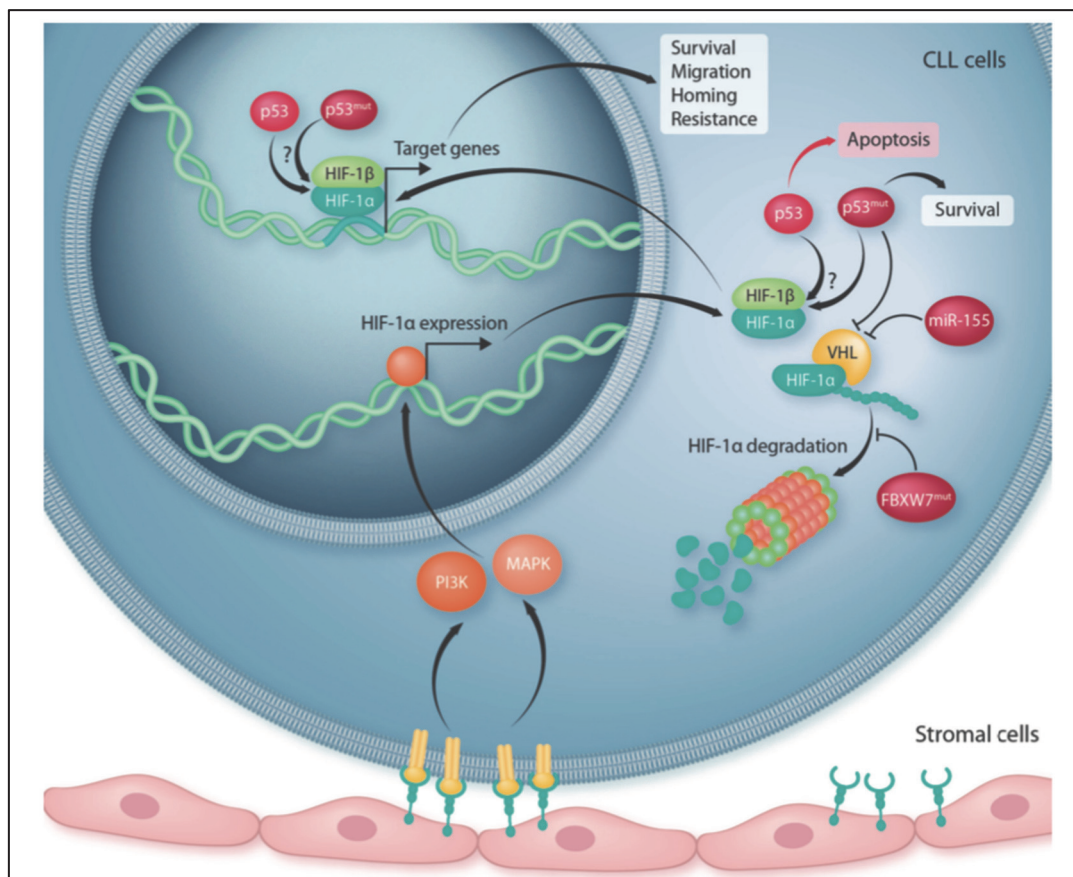


Figure 13 : Schéma des mécanismes régulant HIF-1 α dans la LLC, selon Martina Seiffert hematologica 2020 ¹⁵⁹

En conclusion, la capacité des cellules tumorales de LLC à proliférer est dépendante de leur capacité à répondre à une stimulation antigénique et à transmettre un signal par la voie du BCR. De plus, l'interaction entre les cellules leucémiques et le microenvironnement joue un rôle primordial dans leur rétention ganglionnaire, leur prolifération et leur survie par le biais de nombreuses petites molécules représentant des cibles potentielles.

1.4 Résistance à l'apoptose

1.4.1 Voie de l'apoptose dépendante des caspases

La machinerie apoptotique cellulaire comprend deux voies d'activation principales (les voies extrinsèque et intrinsèque) conduisant à une voie commune centrale, et une phase d'exécution médiée par des protéases de la famille des caspases (cf. Figure 14).

La voie extrinsèque est déclenchée par la liaison des récepteurs TNF-R, Fas, DR4 avec leurs ligands respectifs TNF (Tumoral Necrosis Factor), Fas L, TRAIL, et le recrutement des molécules adaptatrices à l'origine de l'activation de la caspase-8.

La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale, intègre divers signaux intracellulaires au niveau de la membrane mitochondriale et est régulée par les protéines de la famille Bcl-2. Les membres antiapoptotiques de cette famille (bcl-2, bcl-xl, bcl-w, mcl-1) séquestrent les membres proapoptotiques Bax (Bcl-2 associated X protein) et Bak (Bcl-2-antagonist/killer 1). Lors de la stimulation apoptotique, les membres de la famille BH3-only (Bim, Puma, Bid, Bad, Noxa, etc...) se lient aux protéines antiapoptotiques et s'y opposent. Les Bax et Bak séquestrés, sont libérés de leur ligand puis sont activés. Leur activation induit la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale externe. La perméabilisation membranaire qui en résulte favorise la libération cytoplasmique de facteurs apoptogènes, dont le cytochrome c. Ce dernier interagit avec l'adaptateur Apaf-1 qui permet d'activer la protéine initiateur caspase 9. A leur tour, les caspases 8 et 9 déclenchent l'activation des caspases effectrices. Ces protéases peuvent être inactivées par des inhibiteurs endogènes de la protéine d'apoptose (IAP) qui agissent en séquestrant ces caspases. L'IAP lié à l'X (XIAP) joue un rôle majeur dans l'inactivation des caspases. Le facteur endogène induisant l'apoptose, SMAC (Second Mitochondrial derived Activator of Caspases) est une protéine mitochondriale qui est libérée dans le cytosol en réponse aux stimuli apoptotiques. SMAC fonctionne comme un antagoniste endogène de la protéine IAP et agit par liaison compétitive à l'XIAP. Ainsi ce mécanisme a justifié le développement de Smac mimétiques comme agents anti-cancéreux.

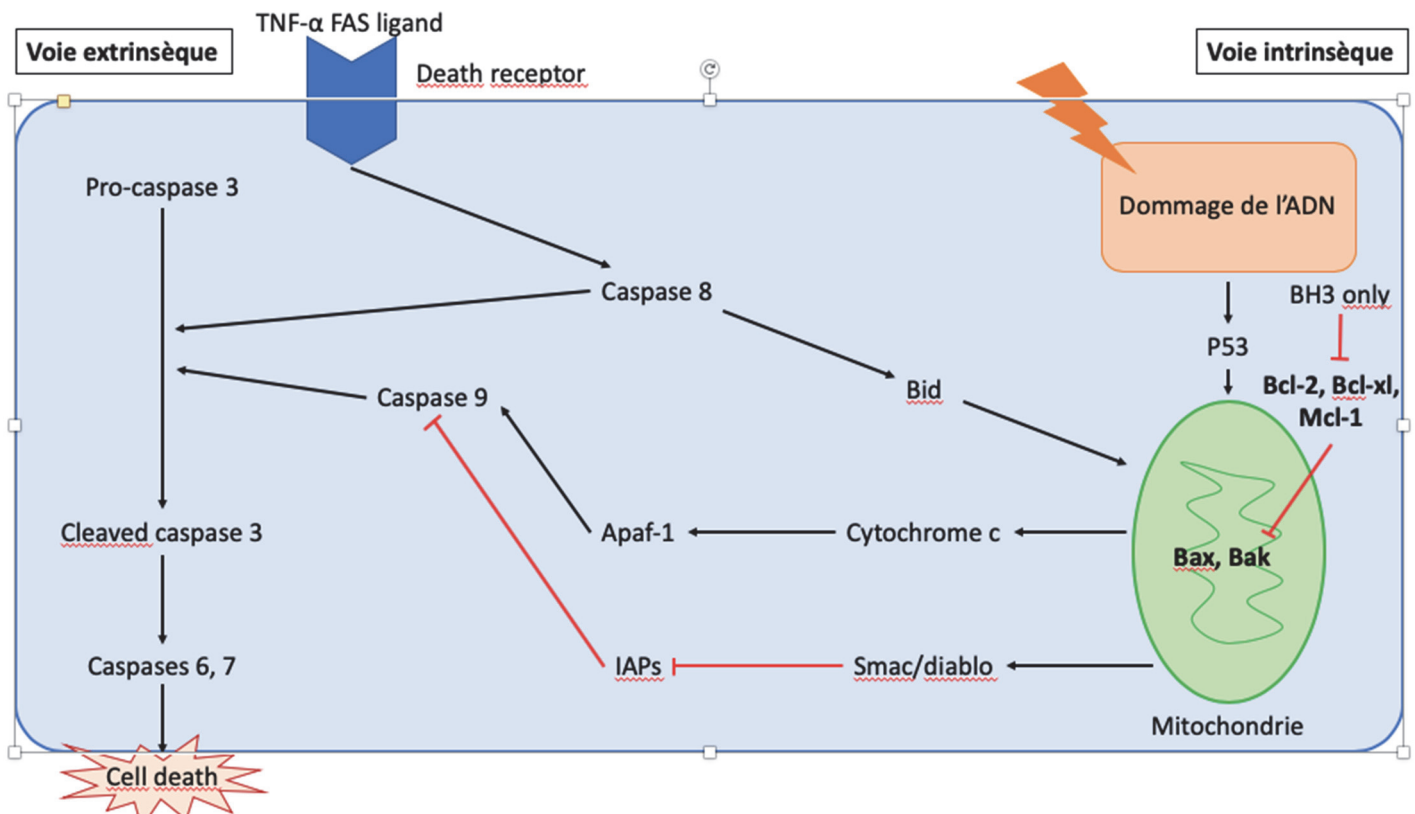


Figure 14 : Voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque caspases dépendantes, adapté d'après S.Yokobori et al 2014 ¹⁶⁰

Par ailleurs, plusieurs voies de signalisation sont connues pour interférer indirectement avec l'apoptose. Il s'agit notamment de la voie du facteur nucléaire-kappaB (NF-kB), qui active la transcription des protéines antiapoptotiques (telles que Mcl-1 et IAPs), et la voie de la PI3K/AKT qui phosphoryle plusieurs cibles protéiques pertinentes pour l'apoptose. Ces deux voies régulent ainsi à la baisse l'apoptose dépendante de la caspase. En revanche, la voie p53 est un intégrateur du stress cellulaire et est capable de stimuler l'apoptose notamment par l'activation transcriptionnelle des protéines proapoptotiques (telles que Puma et Noxa). ¹⁶¹

1.4.2 Voie de l'apoptose dépendante des caspases dans la LLC

Un phénomène de résistance accrue à l'apoptose serait à l'origine d'une accumulation des cellules clonales de LLC *in vivo*. Comme vu précédemment, les cellules stromales produisent des chimiokines et des cytokines qui activent les voies de survie telles que NF-kB ou PI3K/Akt. Ces voies sont constitutivement activées dans les cellules LLC, conduisant à des altérations génétiques et à la surexpression de protéines antiapoptotiques clés et notamment les membres des familles Bcl-2 et IAP. Les protéines membres de la famille Bcl-2 sont les principales molécules impliquées dans cette résistance à l'apoptose. En effet les protéines pro-apoptotiques (bax, bak, BH3) et anti-apoptotiques (bcl-2, bcl-xL, bcl-w, mcl-1) de la famille Bcl-2 sont des

régulateurs critiques de l'apoptose dans la LLC.¹⁶² La protéine Bcl-2 en particulier, est devenue la protéine la plus importante pour prédire la survie parmi 11 protéines impliquées dans le contrôle de l'apoptose, de la prolifération et de la différenciation des cellules de LLC ce qui en fait une cible thérapeutique possible.¹⁶³ D'autres membres de cette famille de protéines anti-apoptiques comme Bcl-xL et Mcl-1 sont surexprimées alors que les protéines pro-apoptotiques telles que Bax sont sous-exprimées.¹⁶⁴

La translocation du gène *BCL2* (*18q21*) est fréquente dans les lymphomes non hodgkiniens à cellules B mais rare dans les LLC malgré une expression élevée de *BCL2*. Cette surexpression de *BCL2* dans les cellules de LLC était initialement expliquée par une hypométhylation du promoteur du gène *BCL2*¹⁶⁵ mais par la suite, comme déjà évoqué précédemment, il a été démontré que les micro-ARN miR15 et miR16 jouaient un rôle dans la régulation négative de l'expression de *BCL2* au niveau post-transcriptionnelle. Ces micro-ARN sont situés sur le chromosome 13q14, une région délétée ou sous-exprimée dans la majorité des LLC et donc responsable d'une accumulation de la protéine Bcl-2.^{118, 117}

Des études ont mis en évidence qu'un rapport bax/bcl-2, déterminé par CMF, était souvent corrélé à une maladie agressive ou à une chimiorésistance. Il a été démontré qu'un rapport $> 1,5$ était associé à des facteurs pronostiques favorables (RAI bas, taux de bêta-microglobuline et de CD23 soluble faible associé à un profil cytogénétique de faible risque). A l'inverse un rapport bax/bcl2 $< 1,5$ est corrélé à des mutations défavorables (*IGVH* non muté, *NOTCH1* muté, *TP53* muté).¹⁶⁶

1.5 Le potentiel d'oxydo-réduction des cellules de LLC

D'après de récentes études, certaines mutations somatiques de l'ADN des cellules de LLC pourraient entraîner une surexpression de gènes mitochondriaux impliqués dans la phosphorylation oxydative. Cette surexpression est à l'origine d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène appelés ROS (Reactive Oxygen Species), impliqués dans la peroxydation des lipides membranaires ce qui entraîne la production d'aldéhydes apoptogéniques. Cela conduit à l'accumulation progressive de mutations génétiques au niveau des oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeurs.¹⁶⁷ La production d'aldéhydes toxiques est à l'origine de lésions de l'ADN et d'une instabilité génétique. Cependant, les cellules de LLC ont souvent une surexpression d'aldéhydes déshydrogénases, conduisant à une diminution des dommages oxydatifs et donc à une résistance à l'apoptose.¹⁶⁸

Cette notion sera d'avantage développée dans la 3^{ème} partie du travail de thèse qui portera sur le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire qui pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique.

La figure 15 ci-après résume les différents mécanismes physiopathologiques décrits précédemment, jouant un rôle dans la pathogénèse de la LLC. Ce schéma décrit l'impact de lésions génétiques fondatrices qui vont être responsables de l'expansion clonale favorisée par les interactions des cellules leucémiques avec leur microenvironnement, différents mécanismes de résistance à l'apoptose et de survie cellulaire. Au cours de l'évolution de la maladie, certains patients acquièrent des altérations géniques supplémentaires qui confèrent un degré plus élevé d'agressivité clinique.

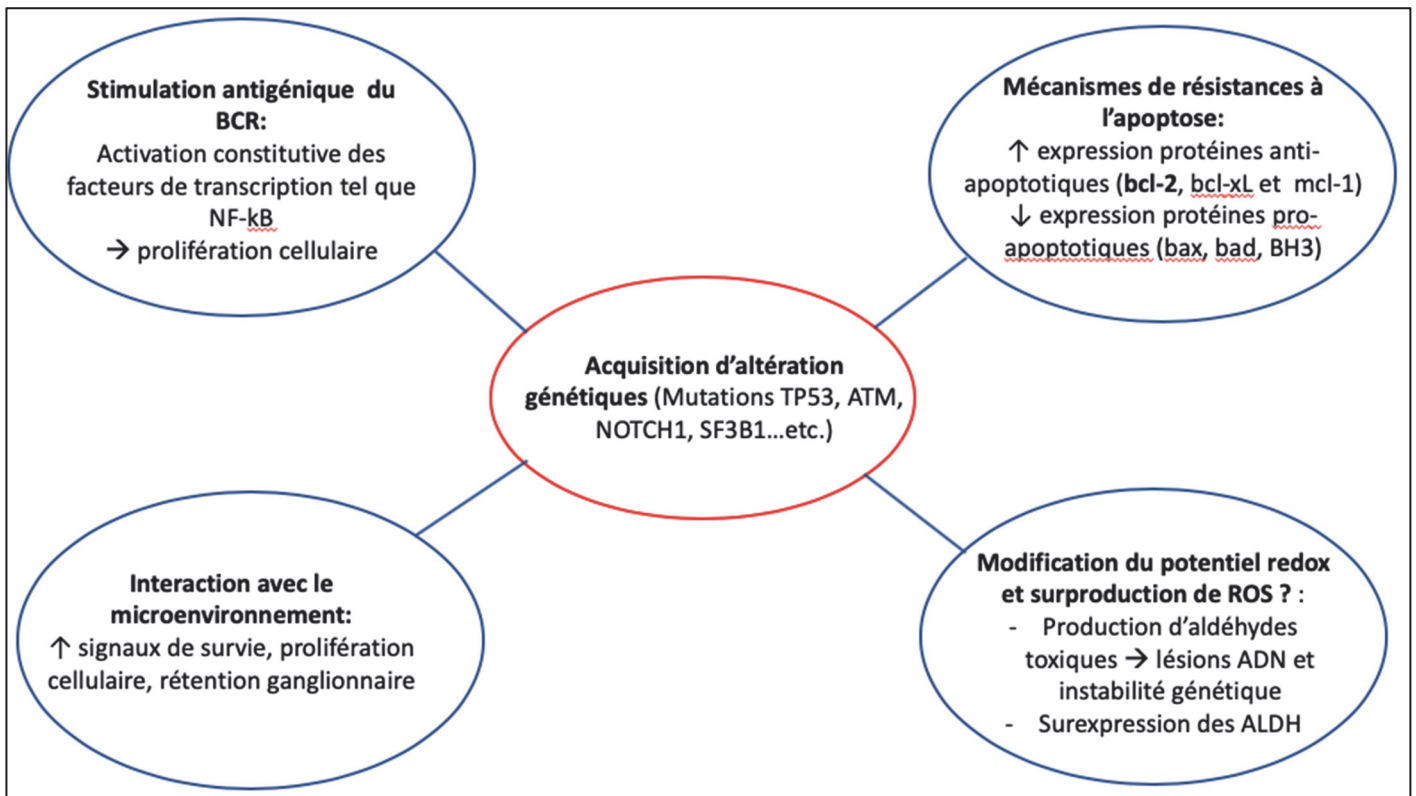


Figure 15 : Schéma des différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans la pathogénèse de la LLC

Avec les connaissances grandissantes sur les mécanismes physiopathologiques de la LLC de nombreuses cibles thérapeutiques potentielles voient le jour et contribuent au développement de thérapies ciblées par les laboratoires pharmaceutiques. Certaines ont aujourd'hui l'AMM et sont utilisées dans la stratégie thérapeutique de première ou de deuxième ligne dans la LLC telles que les inhibiteurs de la voie du BCR ou encore le Vénétoclax comme inducteur de l'apoptose, tandis que d'autres font actuellement l'objet d'essais cliniques.

2. Cibles et stratégies thérapeutiques issues des connaissances sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la LLC

Les nouvelles stratégies thérapeutiques s'éloignent du schéma habituel de la chimiothérapie qui repose sur des agents analogues des purines et alkylants. Nous verrons dans cette partie les stratégies thérapeutiques stratifiées en fonction de la physiopathologie de la LLC, avec à la fois des molécules dont les mécanismes d'action sont assez généraux alors que d'autres seront plus spécifiques d'une voie physiopathologique donnée. On peut citer notamment les inhibiteurs de la voie du BCR, les anticorps monoclonaux ciblant soit des marqueurs de la cellule B soit les interactions avec le microenvironnement, ainsi que les inducteurs de l'apoptose. Nous développerons les cibles et les thérapies ciblées associées ayant fait l'objet d'essais cliniques dans la LLC.

2.1 Stratégies thérapeutiques non spécifiques de la physiopathologie de la LLC

2.1.1 Agents cytotoxiques

La monothérapie avec des agents alkylants a servi de thérapie initiale de première ligne pour la LLC et le Chlorambucil a été la référence thérapeutique pendant plusieurs décennies malgré sa toxicité après une utilisation prolongée (cytopénies prolongées, myélodysplasie et leucémie aiguë secondaire).⁸⁷ Trois analogues de la purine sont encore utilisés dans la LLC : Fludarabine, Pentostatine et Cladribine. La Fludarabine (Fludara®) a induit plus de rémissions et des rémissions plus complètes (7-40%) que d'autres chimiothérapies conventionnelles mais n'a pas amélioré la survie globale (SG) lorsqu'elle est utilisée en monothérapie.¹⁶⁹ Deux agents alkylants, la Bendamustine (Levact®) et le Chlorambucil (Chloraminophène®), ont été comparés dans un essai randomisé et il a été démontré que la Bendamustine produit des réponses améliorées mais une plus grande toxicité et aucun bénéfice sur la SG. Le taux de RG et la SSP étaient respectivement de 67% et 22 mois pour la Bendamustine vs 30% et 8 mois pour le Chlorambucil.¹⁷⁰ De plus, un autre essai a comparé la Bendamustine à la Fludarabine chez les patients atteints de LLC récidivante et le taux de RG était de 76% avec la Bendamustine et 62% avec la Fludarabine associée à des taux de réponse clinique complète de 27% et 9% respectivement suggérant que la Bendamustine reste un puissant agent pour le traitement de la LLC.¹⁷¹ De plus, des études précliniques ont démontré que l'exposition des cellules de LLC à la Fludarabine et au Cyclophosphamide entraînait une cytotoxicité synergique.¹⁷²

2.1.2 Marqueurs transmembranaires des lymphocytes B et thérapies ciblées associées

CD20

Le CD20 est une phosphoprotéine glycosylée transmembranaire exprimée à la surface des lymphocytes B à partir du stade pré-B. Il est présent dans plus de 90% des lymphomes non hodgkiniens (LNH). C'est pourquoi les anticorps monoclonaux anti-CD20 sont fréquemment utilisés dans de nombreuses hémopathies lymphoïdes B.

L'introduction en 1998 du premier antiCD20, Rituximab (Mabthera®), à la chimiothérapie conventionnelle a permis d'améliorer nettement le pronostic des patients atteints de LLC et l'association RFC est devenue le traitement de référence pour une grande partie des patients. Le Rituximab induit une apoptose directe ainsi qu'une cytotoxicité médiée par les cellules dépendante des anticorps (appelée ADCC) dans les cellules B néoplasiques. Il est moins actif en monothérapie dans la LLC que dans d'autres LNHs comme le lymphome folliculaire, cependant l'association du Rituximab avec la chimiothérapie s'est révélée être une combinaison très efficace. L'essai CLL8, qui est une étude de phase 3 comparant le RFC au FC en 1^{ère} ligne de traitement, a montré des résultats probants avec une SSP de 56,8 mois et une SG médiane non atteinte lorsque les patients recevaient un traitement par RFC.^{173, 174} L'essai CLL10, essai de phase 3 comparant le RFC au BR (Bendamustine et Rituximab) a montré de meilleurs résultats avec le traitement par RFC que par BR bien qu'une toxicité infectieuse et hématologique plus importantes ait été rapportée avec le RFC. Ainsi le BR est privilégié seulement chez les patients de plus de 65 ans.¹⁷⁵

De nouveaux anticorps monoclonaux anti-CD20 voient le jour ⁹⁰ :

L'Ofatumumab (HuMax-CD20®) est un anticorps monoclonal entièrement humanisé de type I, ciblant un épitope unique de la molécule CD20. Il en résulte une affinité de liaison accrue pour le CD20 et une augmentation de la destruction cellulaire en raison d'une activité d'apoptose via le complément (appelée CDC) plus importante et d'une activité ADCC similaire par rapport au Rituximab.¹⁷⁶ Une étude a testé l'Ofatumumab chez des patients réfractaires à la Fludarabine et à l'Alemtuzumab (anti CD52) montrant un taux de réponse globale de 58% dans ce groupe de patients.¹⁷⁷ Une étude de phase 3 a été menée chez des patients naïfs de traitement présentant une maladie active. Elle a permis de tester l'association du Chlorambucil et de l'Ofatumumab qui a montré une amélioration significative de la SSP.¹⁷⁸ Par ailleurs, un essai de phase 2 a montré que l'Ofatumumab en association à la Bendamustine est un traitement efficace avec un taux de réponse élevé et un profil d'innocuité acceptable.¹⁷⁹ Enfin, l'association de l'Ofatumumab et l'Ibrutinib a été testé chez des patients atteints de LLC en rechute/réfractaire selon 3 schémas : Ofatumumab puis introduction de l'Ibrutinib, début concomitant, Ibrutinib puis introduction de l'Ofatumumab. Cette étude a montré un délai de

réponse plus rapide qu'avec l'Ibrutinib en monothérapie avec des taux de réponse très élevés et durables avec les 3 séquences d'administration étudiées.¹⁸⁰ Cependant, la commission européenne a retiré l'AMM en 2019.

L'Obinutuzumab (GA101, Gazyvaro®) est un anticorps monoclonal humanisé de classe II présentant, en comparaison au Rituximab, une apoptose directe majorée en raison d'une affinité plus élevée pour l'épitope du CD20 conduisant à une augmentation de l'activité ADCC associée à une faible activité CDC.¹⁸¹ Son utilisation en association avec le Chlorambucil a montré un bénéfice clinique chez les patients non éligibles à une chimiothérapie par analogue des purines. L'essai CLL11 a montré une amélioration significative de la SSP ainsi que des taux de réponse complète et de réponse moléculaire plus élevés avec le Chlorambucil associé à l'Obinutuzumab par rapport au Rituximab.¹⁸²

Les études répertoriées dans la littérature concernant les différents anti-CD20 ayant l'AMM, sont résumées dans le tableau 14 :

Molécule	Phases	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats		
Rituximab	Voir tableau 13, p.59					
Ofatumumab	1/2	NCT0121774 9 Jaglowski <i>et al.</i> ¹⁸⁰	Ofatumumab + Ibrutinib dans la LLC R/R	Ib → Of : RG : 100% SSP à 12 mois : 89%	Ib/Of RG : 79% SSP à 12 mois : 85%	Of → Ib RG : 71% SSP à 12 mois : 75%
	2	NCT0152092 2 Offner <i>et al.</i> ¹⁷⁹	Ofatumumab + Bendamustine en 1 ^{ère} intention et dans la LLC en rechute	LLC non traitée : RG : 95% RC : 43% avec MRD neg : 56% Délai médian de réponse : 0,95 mois	LLC en rechute : RG : 74% RC : 11% avec MRD neg : 0 Délai médian de réponse : 0,95 mois	
	2	NCT0034934 9 Wierda WG <i>et al.</i> ¹⁷⁷	Monothérapie chez les patients réfractaires à la Fludarabine et à l'Alemtuzumab	RG : 58% SSP : 5,9 mois Résolution complète des symptômes : 57%		
	3	NCT0074818 9 Hillmen <i>et al.</i> ^{178, 183}	Ofatumumab + Chlorambucil vs Chlorambucil seul chez des patients LLC jamais traités	RG : 82% RC : 13% MRD neg : 3,8% SSP : 22,4 mois SG : 28,9 mois		
Obinutuzumab	Voir tableau 13p.59					

Tableau 14 : Synthèse des essais cliniques des anti CD20 ayant l'AMM dans la LLC.

RG : réponse globale ; RP : réponse partielle ; RC : réponse complète ; RO : réponse objective ; SSP : survie sans progression ; RN : réponse nodale ; RNP : réponse nodale partielle, DCT : diminution charge tumorale ; MS : Maladie stable ; SMG : survie médiane globale ; SST : survie sans traitement ; RMT : réduction de la masse tumorale ; / : résultats non reportés.

L'Ublituximab (TGTX-1101) est un nouvel anticorps monoclonal anti-CD20 de type I qui se lie à un épitope unique sur l'antigène CD20, distinct du Rituximab, de l'Obinutuzumab et de l'Ofatumumab. Dans les études *in vitro*, l'Ublituximab a démontré une ADCC médiée par les cellules NK, 100 fois plus élevée que le Rituximab dans les cellules de LLC.¹⁸⁴ Une étude de phase 1/2 a évalué l'activité antitumorale de l'Ublituximab chez des patients en rechute ou réfractaires au Rituximab et a montré des résultats prometteurs.¹⁸⁵ De plus, plusieurs essais ont étudié l'association de l'Ublituximab avec l'inhibiteur de PI3K- δ , Umbralisib, chez des patients atteints de LNH ou LLC en rechute/réfractaires et ont montré une efficacité prometteuse de cette combinaison thérapeutique.¹⁸⁶ Enfin un essai de phase 2 a montré que l'Ublituximab en association avec l'Ibrutinib entraîne des taux de réponse rapides et élevés.¹⁸⁷ Le bénéfice clinique à long terme de cette association sera défini par un essai de phase 3 actuellement en cours (NCT02301156).

Les études concernant le nouvel anti CD20, Ublituximab, sont répertoriées dans le tableau 15 :

Molécule	Phases	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Ublituximab	1	NCT02006485 Matthew Lunning <i>et al.</i> ¹⁸⁶	Umbralisib + Ublituximab dans la LLC R/R	RG : 46% RC : 17% Durée médiane de réponse : 20 mois
		NCT03801525	Umbralisib + Ublituximab en association au Vénétoclax	En cours
	1/2	Sawas <i>et al.</i> ¹⁸⁵	Monothérapie chez des patients avec LNH/LLC réfractaires fortement pré-traités par Rituximab	Dans la LLC (sur 6 patients): RG : 50% Réduction lymphocytaire >50% en 7j chez tous les patients
	2	NCT02013128 Jeff P. Sharman <i>et al.</i> ¹⁸⁷	Ublituximab + Ibrutinib dans la LLC R/R	Totalité des patients : RG : 88% à 6 mois RC : 5% RP : 83% Patients à haut risque : -RG : 95% - RC : 10% - RP : 85% - MRD neg : 15% Délai médian de réponse : 8 semaines
	3	NCT02301156	Ublituximab + Ibrutinib vs Ibrutinib seul chez des patients LLC réfractaires et à haut risque	En cours
	3	NCT00564512 Stephane Lepretre <i>et al.</i> ¹⁹⁰	RFC vs Alemtuzumab + FC	RFC : RG : 91% RC : 33,8% SSP à 3 ans : 82,6%

Tableau 15 : Synthèse des essais cliniques de l'Ublituximab

CD52

Le CD 52 est une glycoprotéine hautement exprimée, présente à la surface de quasiment tous les lymphocytes B et T normaux et malins, et dans une moindre mesure des lymphocytes NK, des monocytes et macrophages.

L'**Alemtuzumab (MabCampath®)** est un anticorps monoclonal recombinant, entièrement humanisé, dirigé contre l'antigène CD52. Cette molécule s'est révélée efficace, y compris chez les patients présentant des marqueurs génétiques à haut risque,¹⁸⁸ mais n'est absolument pas spécifique des lymphocytes B de LLC et entraîne donc une lymphopénie profonde et parfois durable. Une étude, comparant Alemtuzumab au Chlorambucil, a montré une rémission clinique plus élevée et une SSP supérieure pour l'Alemtuzumab.¹⁸⁹ Cependant une décision stratégique a conduit au retrait de la licence d'Alemtuzumab en 2012. De plus, des essais de phase 3 testant l'Alemtuzumab en association avec la combinaison FC en comparaison au RFC a montré une mortalité plus élevée avec l'Alemtuzumab avec une efficacité similaire¹⁹⁰ (cf.tableau 16).

Molécule	Phases	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats	
Alemtuzumab (MabCampath®)	3	Hillmen <i>et al.</i> 2007 ¹⁸⁹	Alemtuzumab vs Chlorambucil en 1 ^{ère} ligne de traitement		
	3	NCT00564512 Stephane Lepretre <i>et al.</i> ¹⁹⁰	RFC vs Alemtuzumab + FC	RFC : RG : 91% RC : 33,8% SSP à 3 ans : 82,6%	FCA : RG : 90% RC : 19,2% SSP à 3 ans : 72,5%

CLB: Clhorambucil, FCA: Fludarabine, cyclophosphamide, Alemtuzumab

Tableau 16 : Synthèse des essais cliniques de l'Alemtuzumab

CD19

Le CD19 est un marqueur spécifique de la lignée B, exprimé à tous les stades de la lignée B, y compris sur les plasmocytes normaux. Il s'agit d'une glycoprotéine appartenant à la super famille des immunoglobulines. Le complexe CD19/CD21 joue un rôle comme corécepteur du BCR ce qui fait du CD19 un important régulateur fonctionnel de la prolifération des lymphocytes B.

Des anticorps anti-CD19 ont donc également été développés et testés dans la LLC. On retrouve, par exemple **MDX-1342** testé dans une étude de phase 1 en monothérapie (NCT00593944) et **MOR00268** évalué dans une étude de 2 en association au lénalidomide (NCT02005289). Le **MED-551** (NCT01466153) a été testé en association à la Bendamustine en comparaison au Rituximab-Bendamustine dans une étude de phase 2. Plus récemment, le **Tafasitamab** a fait l'objet d'une étude dans un essai de phase 2 actuellement en cours, en association à l'Idélalisib ou au Vénétoclax (NCT02639910) (cf.tableau 17).

Molécule	Phases	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
MDX-1342	1	NCT00593944	Monothérapie chez des patients R/R	/
MOR00268 (XmAb5574)	2	NCT02005289	MOR00268 + Lénalidomide chez les patients R/R ou les patients âgés non traités	/
MEDI-551	2	NCT01466153	MEDI-551 + Bendamustine vs Rituximab +Bendamustine	RG : 30% en monothérapie
Tafasitamab (MOR208)	2	NCT02639910	Tafasitamab + Idélalisib ou Vénétoclax chez des patients R/R prétraités par BTKi	/

Tableau 17 : Synthèse des essais cliniques des anticorps anti CD19.

CD22

L'antigène CD22 est une protéine de surface spécifique de la lignée lymphocytaire B et appartenant également à la super famille des Ig. Comme le CD19, le CD22 joue un rôle dans la transduction du signal du BCR. Le CD22 est un marqueur précoce et qui persiste à tous les stades de la différenciation B.

Des immunothérapies à base d'endotoxine ciblant le CD22 ont été développées. On peut citer le **BL22 (CAT-3888)**, qui est une immunotoxine recombinante contenant une forme tronquée d'une toxine bactérienne, l'endotoxine A du *Pseudomonas*, combiné à un fragment variable d'un anticorps monoclonal anti-CD22. Le BL22 a fait l'objet d'un essai clinique de phase 1 en 2005 sur des patients réfractaires. Une activité plus faible a été observée dans la LLC par rapport à d'autres hémopathies malignes comme la leucémie à tricholeucocytes.¹⁹¹ Le **Moxetumomab Pasudotox (CAT-8015)** ciblant également le CD22, est une immunotoxine recombinante de 2^{ème} génération, jusqu'à 50 fois plus active sur les cellules leucémiques de LLC que le BL22.¹⁹² Cette molécule est testée dans des essais de phase 1 et 2 chez des patients en rechute ou réfractaires, atteints de LNHs ou de LLC (NCT01030536) (cf.tableau 18).

Molécule	Phases	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
BL22	1	NCT00126646	Monothérapie chez les patients R/R atteints de LLC, leucémie à prolymphocytes et LNHs	Taux de réponse < 20% dans la LLC
Moxetumomab (CAT-8015)	1/2	NCT01030536	Monothérapie chez les patients R/R atteints de LLC, et de LNHs	/

Tableau 18 : Synthèse des essais cliniques des anticorps anti CD22.

CD23

Le CD23 est un récepteur de faible affinité pour les IgE. La molécule du CD23 est présente sous forme de protéine membranaire ou de fragments solubles circulants et présente des activités biologiques diverses, spécifique des types cellulaires qui l'expriment. Concernant les lymphocytes B, le CD23 joue un rôle dans leur prolifération, la présentation de l'antigène aux cellules T via les IgE spécifiques et la régulation de la synthèse d'IgE. Le CD23 est quasiment toujours présent, avec une forte expression, sur les cellules tumorales B dans la LLC. Le CD23 représente donc une autre cible thérapeutique potentielle dans la LLC.

Le **Lumiliximab** est un anticorps monoclonal anti-CD23 qui potentialise l'apoptose médiée par la Fludarabine et le Rituximab dans les cellules LLC. Une étude multicentrique de phase 1 et 2 a évalué l'association Lumiliximab + RFC chez les patients en rechute et les données suggèrent que cette combinaison peut produire un taux de réponse complète plus élevé que le RFC seul et sans toxicité supplémentaire.¹⁹³ (cf. tableau 19).

Molécule	Phases	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Lumiliximab	1/2	Byrd <i>et al.</i> ¹⁹³	Comparaison Lumiliximab + RFC vs RFC seul chez les patients LLC en rechute.	RG : 71% RC : 48% RP : 10% RP non confirmée : 13%

Tableau 19 : Synthèse des essais cliniques de l'anti CD23, Lumiliximab.

CD74

La chaîne γ du CMH II, aussi appelée CD74 ou fragment Li, est une protéine transmembranaire exprimée, sur les cellules B présentatrices d'antigène. La signalisation via CD74 est impliquée dans la prolifération des cellules B, l'activation de NF-kB et la survie cellulaire. Son expression est augmentée à la surface des cellules B leucémiques.

Le **Milatuzumab** est un anticorps monoclonal humanisé antagoniste au CD74 qui induit une cytotoxicité directe des cellules de LLC par un mécanisme impliquant l'agrégation de CD74 à la surface des cellules. L'incorporation du Milatuzumab dans un immunoliposome accentue son effet cytotoxique sur les cellules de LLC.¹⁹⁴

Molécule	Phases	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Milatuzumab	1/2	NCT00868478	Monothérapie chez les patients LLC réfractaire	/

Tableau 20.: Synthèse des essais cliniques de l'anti CD74, Milatuzumab.

CD37

CD37 est une protéine de surface fortement glycosylée, exprimée de manière constitutive à des niveaux élevés sur les cellules B normales et malignes. Il s'agit d'un marqueur spécifique de la lignée B.

L'**Otlertuzumab** (TRU-016) est une protéine thérapeutique spécifique de CD37. Cette molécule a été testée dans une étude de phase 1/2 en association à la Bendamustine chez des patients atteints de LLC en rechute (NCT01188681). Le taux de RG et la SSP étaient plus élevés avec l'association Bendamustine-Otlertuzumab que Bendamustine seule.¹⁹⁵ Un autre anti-CD37, **B836826**, a fait l'objet d'une étude clinique dans un essai de phase 1, en association à l'Idélalisib dans le traitement de la LLC ¹⁹⁶ (NCT02538614) (cf.tableau 21).

Molécule	Phases	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Otlertuzumab (TRU-016)	1/2	NCT01188681 Tadeusz Robak <i>et al.</i> ¹⁹⁵	Otlertuzumab + Bendamustine vs Bendamustine seule chez patients LLC en rechute	Otler + Benda : RG : 69% SSP : 15,9 mois Benda seule : RG : 39% SSP : 10,2 mois
B836826	1	NCT02538614	B836826 + Idelalisib chez des patients LLC	/

Tableau 21 : Synthèse des essais cliniques des anti CD37.

2.2 Stratégies thérapeutiques issues des connaissances récentes sur la physiopathologie de la LLC

Plus récemment, le traitement de la LLC a considérablement changé avec l'émergence de thérapies orales ciblées très efficaces, y compris en présence d'une altération de la voie TP53 (telles que l'Ibrutinib, l'Idélalisib et le Vénétoclax).

2.2.1 Inhibition de la voie de signalisation du BCR

Les deux inhibiteurs de la voie du BCR (BCRi) ayant l'AMM et ainsi les plus couramment utilisées dans le traitement de la LLC sont l'Ibrutinib (Imbruvica®) et l'Idélalisib (Zydélig®). Ils agissent tous deux en bloquant la cascade de signalisation en aval du BCR, provoquant une fuite ganglionnaire des lymphocytes de LLC vers le sang. Lors de la prise de ces inhibiteurs, une lymphocytose initiale est observée, en parallèle de la fonte ganglionnaire, pouvant persister jusqu'à 3 mois. Le mécanisme d'action étant indépendant d'un effet génotoxique, les LLC porteuses d'anomalies cytogénétiques défavorables ou d'un caryotype complexe, ne présentent pas de résistance à ces traitements. Ces molécules sont administrées par voie orale et sont globalement bien tolérées et peuvent donc être utilisées chez les personnes âgées présentant des comorbidités. Toutefois, leur utilisation peut s'accompagner d'effets indésirables directement liés à leur mécanisme d'action et donc différents de ceux engendrés par la chimiothérapie.

L'utilisation de ces BCRi a été intégrée dans la stratégie thérapeutique de la LLC de façon de plus en plus précoce mais ces molécules n'entraînent pas de RC profonde avec éradication du clone. Ils sont actuellement prescrits jusqu'à progression.

Inhibition de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK) :

La BTK est une tyrosine kinase cytoplasmique située en aval du récepteur BCR dans la transduction du signal et est essentielle à la prolifération et la survie des cellules leucémiques B.

Le chef de file des inhibiteurs de la BTK est l'**Ibrutinib**. Il induit l'apoptose des cellules leucémiques. L'Ibrutinib est le traitement de 1^{ère} intention en cas d'anomalie *TP53* et lors de la présence d'un statut IGVH non muté chez un patient en bon état général. Une étude de phase 2 chez des patients atteints de LLC non traités et présentant une mutation *TP53* a mis en évidence des taux de réponse sans précédent et d'excellents résultats avec cette molécule.¹⁹⁷ Dans l'étude pivot de Byrd en 2014 évaluant l'Ibrutinib chez des patients en rechute ou réfractaire, le taux de RG atteignait 71%. La réponse était indépendante des facteurs de risque cliniques et génomiques présents avant le traitement.¹⁹⁸ Un essai international de phase 3 a

comparé l'Ibrutinib et le Chlorambucil chez des patients âgés non traités atteints de LLC ou de SLL. L'Ibrutinib était supérieur au Chlorambucil selon l'évaluation de la SSP, de la SG et des taux de réponse.¹⁹⁹ L'essai de phase 3 **ILLUMINATE** a récemment comparé les associations Ibrutinib-Obinutuzumab et Chlorambucil-Obinutuzumab en 1^{ère} ligne de traitement de la LLC. Il a montré que l'Ibrutinib-Obinutuzumab est une thérapie combinée efficace chez les patients atteints de LLC, non traités précédemment qui permettent de s'affranchir de la chimiothérapie. La survie sans progression à 30 mois était significativement supérieure dans le bras avec l'Ibrutinib qu'avec le Chlorambucil (79% vs 31%).²⁰⁰ L'essai de phase 3 **RESONATE** a comparé par la suite l'Ibrutinib à l'Ofatumumab chez des patients réfractaires, dont la moitié présentaient une délétion 17p ou une résistance aux analogues de la purine. Cette étude a montré une amélioration significative du taux de SG (90 % à 12 mois vs 81%) avec un taux de SSP et un taux de RG également significativement plus élevés avec l'Ibrutinib.²⁰¹ Par ailleurs, l'étude de phase 3 **HELIOS** a confirmé la supériorité de l'association BR-Ibrutinib par rapport au BR seul en termes de SSP (non atteinte vs 13 mois) et de taux de survie à 18 mois (79% vs 24%).²⁰² Enfin, dans une étude de phase 3, l'association Ibrutinib-Rituximab a entraîné une SSP et une SG supérieures à celles obtenues avec une chimiothérapie par RFC dans le traitement des patients LLC jamais traités auparavant.²⁰³ Cependant, des études comparant l'Ibrutinib à l'association Ibrutinib-Rituximab dans les LLC en rechute ou réfractaire, n'ont montré aucun avantage supplémentaire de l'ajout du Rituximab.^{204, 205}

Par ailleurs, des cas de résistance à l'Ibrutinib, secondaires à des mutations sur la voie du BCR ont été rapportés.²⁰⁶ Il a été mis en évidence une mutation cystéine-sérine sur le site de liaison de l'Ibrutinib sur BTK (mutation C481S de BTK) conduisant à une protéine inhibée seulement de manière réversible par l'Ibrutinib. Ces cellules restent cependant sensibles aux autres inhibiteurs tels que l'Idelalisib. Un autre type de mutation a été identifié, il s'agit de mutations de PLC γ 2 (R665W et L845F), molécule intervenant en aval de BTK et dont la mutation conduit à une résistance aux deux types d'inhibiteurs de la voie du BCR. Ces mutations restent cependant peu fréquentes et sont toujours acquises du fait de la pression sélective imposée par la prise du traitement.

Concernant les effets indésirables, la BTK étant présente dans la signalisation en aval de la voie d'agrégation plaquettaire de la GPVI et de la GPIb, son inhibition peut donc être à l'origine d'un syndrome hémorragique, notamment lors d'association à des traitements anticoagulants ou antiagrégants plaquettaires. Des troubles du rythme cardiaque peuvent également être présents du fait de l'inhibition de la Tec kinase dans les cardiomyocytes.

L'**Acalabrutinib** (ACP-196), inhibiteur irréversible et potentiellement plus sélectif de BTK de 2^{ème} génération, semblent très prometteurs avec une réponse globale de 95%.²⁰⁷

D'autres inhibiteurs de la BTK sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase 1 tels que le **Tirabrutinib** (ONO-4059) et le **Spebrutinib** (AVL 292)²⁰⁸ et une étude de phase 3 compare le **Zanubrutinib** (BGB-3111) à l'Ibrutinib (NCT03734016).

Dans le tableau 22 sont rassemblés tous les inhibiteurs de la BTK testés dans la LLC, de l'Ibrutinib ayant l'AMM pour le traitement de la LLC, aux nouvelles molécules en cours d'essais clinique :

Molécule	Phases	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Ibrutinib	Voir tableau 13 p.59			
Acalabrutinib (ACP 196)	1/2	NCT02029443 Byrd <i>et al.</i> ²⁰⁷	Monothérapie dans la LLC R/R	RG : 95%
	3	NCT02477696	Acalabrutinib vs Ibrutinib chez des patients LLC R/R à haut risque	/
Tirabrutinib (ONO 4059)	1	Salles <i>et al.</i> ²⁰⁹	Monothérapie chez des patients LLC R/R à haut risque	RG : 70%
	1b	NCT02457598 Alexey V.Danilov <i>et al.</i> ²¹⁰	Tirabrutinib + Idelalisib ou Entospletinib dans la LLC R/R	RG : - Monothérapie : 83% - TIRA/IDELA : 93% - TIRA/ENTO : 100% RC: - Monothérapie : 7% - TIRA/IDELA : 7% - TIRA/ENTO : 10%
Spebrutinib (AVL 292)	1	NCT01351935	Monothérapie dans la LLC R/R	/
Zanubrutinib (BGB3111)	3	NCT03734016	Zanubrutinib vs Ibrutinib dans la LLC R/R	En cours
Vecabrutinib (SNS 062)	1/2	NCT03037645	Monothérapie dans diverses hémopathies malignes	En cours
GDC-0853	1	NCT01991184 Byrd <i>et al.</i> 2018 ²¹¹	Monothérapie dans les LNH B et LLC R/R	Dans la LLC (14 patients): - RG : 50% - RP : 29% - RC : 0%
LOXO 305	1/2	NCT03740529	Monothérapie puis en association au Vénétoclax et Rituximab	En cours
CG 806	1	NCT03893682	Monothérapie dans la LLC/SLL et LNH R/R	En cours
Orelabrutinib (ICP022)	1	NCT04014205	Escalade de dose dans les diverses hémopathies B R/R	En cours
ARQ531	1/2	NCT03162536	Monothérapie dans diverses hémopathies malignes	En cours

Tableau 22 : Synthèse des essais cliniques de l'ensemble des inhibiteurs de la BTK testés dans la LLC

Inhibition de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) :

L'activation de PI3K génère un signal qui recrute la protéine kinase B (Akt) à la membrane cellulaire qui, une fois relâchée dans le cytosol, favorise la prolifération et la survie cellulaire.

Le chef de file des inhibiteurs sélectifs de la PI3K- δ est l'**Idélalisib (Zydélig®)**. L'expression de l'isoforme PI3K- δ est limitée aux cellules hématopoïétiques et joue un rôle clé dans l'oncogénèse, la PI3K étant activée de façon constitutive dans la LLC. L'Idélalisib réduit le chimiotaxisme des cellules de LLC via CXCL12 et CXCL13 ainsi que la migration au sein des cellules stromales. Des essais réalisés chez des patients réfractaires ou en rechute et présentant des facteurs de mauvais pronostic ont montré de bons résultats en termes de SG et de SSP.²¹² Une étude randomisée en double aveugle de phase 3 a comparé l'association Rituximab-Idélalisib par rapport au Rituximab-Placebo dans la LLC en rechute. Les patients recevant de l'Idélalisib avaient de meilleurs résultats concernant le taux de réponse complète (81% vs 13%) ainsi que de SG à 12 mois (92% vs 80%).²¹³ Un autre essai de phase 3 a étudié l'association de l'Idélalisib avec BR et a montré une amélioration de la SSP par rapport au BR seul (20,8 vs 11,1 mois) chez les patients atteints de LLC en rechute/réfractaire.²¹⁴

Cependant, en inhibant la PI3K- δ , l'Idélalisib entraîne une inhibition en aval de la voie mTor à l'origine d'atteintes pulmonaires et digestives. Une neutropénie profonde est également fréquente responsable de complications infectieuses. Sa toxicité de grade ≥ 3 rend son utilisation limitée le plus souvent aux cas d'échec ou d'intolérance aux autres thérapies de nouvelle génération malgré l'efficacité de la molécule.

D'autres inhibiteurs de la PI3K sont en cours d'évaluation :

En effet, le **Duvelisib (IPI-145)** est un double inhibiteur oral des PI3K- δ et PI3K- γ et les données d'une étude de phase 3 comparant le Duvelisib à l'Ofatumumab en monothérapie soutiennent le Duvelisib comme une option de traitement potentiellement efficace pour les patients atteints de LLC.²¹⁵ Un essai de phase 2 actuellement en cours teste le Duvelisib dans la LLC résistante à l'Ibrutinib (NCT04209621).

On peut également citer dans les nouvelles thérapies ciblées des LNHS et de la LLC le **Pilaralisib (SAR245408)** qui est un inhibiteur de la PI3K de classe pan I ²¹⁶, ainsi que l'**Acalisib (GS98-20)**²¹⁷ et l'**Umbralisib (TGR1202)**¹⁸⁶ qui sont, comme l'Idélalisib, des inhibiteurs de la PI3K- δ et actuellement en essai de phase 1.

Dans le tableau 23, sont rassemblés tous les inhibiteurs de la PI3K testés dans la LLC, de l'Idélalisib ayant l'AMM pour le traitement de la LLC, aux nouvelles molécules en cours d'essais clinique :

Cible	Molécule	Phases	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats	
Inhibiteurs PI3K classe Pan I	Pilaralisib	1	Jennifer R.Brown <i>et al.</i> ²¹⁶	Monothérapie dans la LLC R/R (Sur 10 patients)	RP : 50% Rétrécissement ganglionnaire > 50% : 60% SSP > 6 mois : 70%	
	Buparlisib	2	NCT02340780 Sarit Assouline <i>et al.</i> ²¹⁸	Monothérapie dans la LLC R/R	RP : 46,2% Durée médiane de réponse : 14,4 mois RC : 0	
	Copanlisib	2	NCT04155840	Copanlisib + BR dans la LLC/SLL	En cours	
Inhibiteurs PI3K-δ	Idelalisib (CAL-101, GC-1101)	Voir tableau 13 p.59				
	Acalisib (GS9820)	1b	NCT01705847 Arnon P.Kater <i>et al.</i> ²¹⁷	Monothérapie dans la LLC R/R	RG : 53,3% Réponse ganglionnaire : 86%	
	Umbralisib (TGR-1202)	1	NCT02006485 Matthew Lunning <i>et al.</i> ¹⁸⁶	Umbralisib + Ublituximab dans la LLC R/R	RG : 46% RC : 17% Durée médiane de réponse : 20 mois	
			NCT03801525	Umbralisib + Ublituximab en association au Vénétoclax	En cours	
	ACP 319	1	NCT02157324	Acalabrutinib + ACP-319 dans la LLC R/R	/	
	AMG 319	1	NCT01300026	Monothérapie dans les hémopathies lymphoïdes	/	
	YY20394	1	NCT03757000	Monothérapie dans la LLC et les Lymphomes B R/R	/	
	BGB-10188	½	NCT04282018	BGB-10188 en monothérapie et en association avec Zanubrutinib dans diverses hémopathies malignes B	En cours	
Inhibiteurs PI3K-δ et PI3K-γ	Duvelisib (IPI-145)	3	NCT02004522 Ian W.Flinn <i>et al.</i> ²¹⁵	Duvelisib vs Ofatumumab dans la LLC/SLL R/R	Duvelisib : - RG : 73,8% - RP : 72,5% - RC : 0,6% - Réponse ganglionnaire : 85% - SG : non atteinte	Ofatumumab : - RG : 45,3% - RP : 44,7% - RC : 0,6% - Réponse ganglionnaire : 15,7% - SG : non atteinte
		2	NCT04209621	Monothérapie dans la LLC/SLL résistante à l'Ibrutinib	En cours	
	Ténalisib (RP6530)	2	NCT04204057	Monothérapie dans la LLC R/R	En cours	
Inhibiteur PI3K/mTor	Voxtalisib (SAR245409)	1b	NCT01410513 Awan <i>et al.</i> ²¹⁹	SAR245409 + Rituximab ou + BR dans la LLC R/R	Voxtalisib + BR : RP : 41,7% RC : 16,7% MS : 33,3% et MP : 0	
Inhibiteur PI3K p110δ	ME401	1	NCT02914938	Monothérapie ou association avec Rituximab ou Zanubrutinib dans la LLC/SLL R/R	En cours	

Tableau 23 : Synthèse des essais cliniques de l'ensemble des inhibiteurs de la PI3 kinase testés dans la LLC

D'autres cibles de la voie du BCR ont également été étudiées, et les résultats des essais cliniques les concernant, sont répertoriés dans les tableaux ci-dessous :

Les kinases SRC

La kinase Lyn, de la famille des kinases SRC, joue un rôle clé dans la physiopathologie de la LLC et son inhibition améliore l'apoptose des cellules LLC par un mécanisme dépendant des caspases. On retrouve dans les inhibiteurs sélectifs de Lyn, le **Dasatinib** et le **Bafétinib** testés dans des essais de phase 2 dans les LLC réfractaires ou en rechute. Ces deux molécules n'ont pas démontré une grande efficacité en monothérapie^{220, 221} (cf. tableau 24).

Molécule	Cibles	Phase	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Bafetinib (INNO-406)	Lyn kinase	2	NCT01144260 Kadia <i>et al.</i> ²²⁰	Monothérapie dans la LLC R/R	- Aucune RG - RNP : 64%
Dasatinib	Lyn Kinase	2	NCT01051115 Amrein <i>et al.</i> ²²¹	Monothérapie dans la LLC R/R	- Aucune RG - RNP : 20%

Tableau 24 : Synthèse des essais cliniques des inhibiteurs de la Lyn kinase

La tyrosine kinase SYK

La tyrosine kinase de la rate (Syk) initie et amplifie le signal BCR affectant la survie et la prolifération des cellules. De plus Syk est impliqué dans des fonctions indépendantes du BCR, telles que la migration et l'adhésion des cellules B. Ainsi, l'inhibition de Syk induit l'apoptose ce qui a conduit à des essais cliniques de phase 2 sur le **Fostamatinib** (R788) qui est le premier inhibiteur oral de Syk relativement non spécifique.²²² Le Fostamatinib n'a pas entraîné de réponse prolongée dans la LLC dans les essais publiés. Depuis, d'autres inhibiteurs de Syk ont été développés comme **Entosplétinib** (GS-9973)²²³ ainsi que le **Cerdulatinib** qui est un inhibiteur sélectif à la fois de SYK et de JAK-STAT qui a montré *in vitro*, une efficacité sur des cellules de LLC résistantes à l'Ibrutinib²²⁴ (cf. tableau 25).

Molécule	Phase	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Fostamatinib	1/2	NCT00446095 Jonathan W.Friedberg <i>et al.</i> ²²²	Monothérapie chez les patients atteints d'hémopathies malignes B dont la LLC/SLL	Dans la LLC : RO : 55% (6/11)
Entosplétinib	2	NCT01799889 Farrukh T.Awan <i>et al.</i> ²²³	Monothérapie chez les patients LLC R/R incluant la transformation de Richter, préalablement traités par inhibiteurs du BCR	RP : 33% MS : 43% RG : 32.7% SSP : 5,6 mois RN : 49%
Cerdulatinib (Double inhibiteur JAK/SYK)	1/2	NCT01994382	Escalade de dose dans la LLC, le SLL et les LNHS	/

Tableau 25 : Synthèse des essais cliniques des inhibiteurs de la tyrosine kinase SYK

Les molécules inhibitrices de la voie du BCR précédemment décrites et utilisées ou ayant fait l'objet d'essais cliniques dans la LLC, sont schématisées sur la Figure 16.

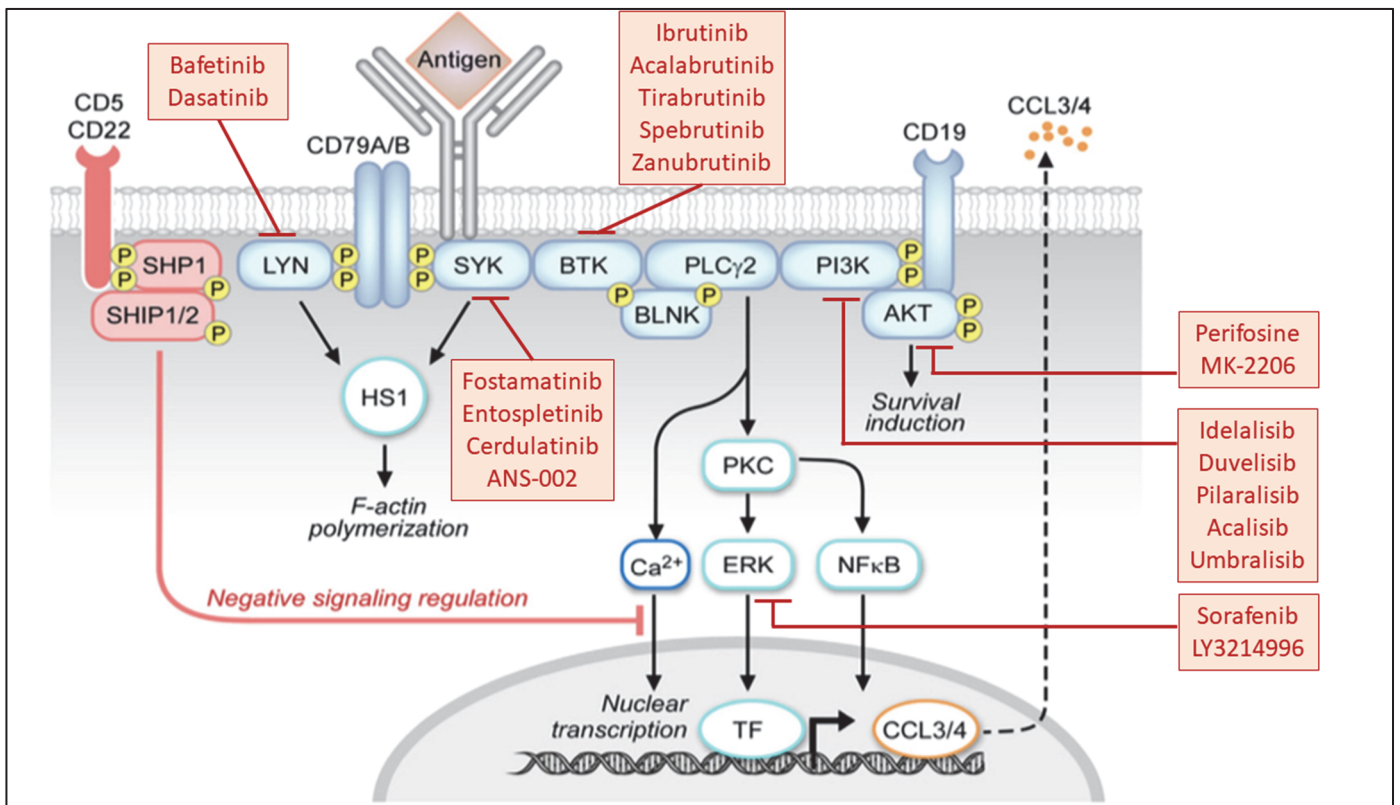


Figure 16 : Thérapies ciblées des différents effecteurs de la voie de signalisation du BCR dans la LLC, schéma adapté d'après Ten Hacken et Burger, 2016¹⁴⁹

2.2.2 Cibles thérapeutiques impliquées dans la modulation des interactions avec le microenvironnement

CXCR4

Le récepteur de chimiokine CXCR4 est fortement exprimé dans différentes tumeurs hématologiques, y compris la LLC. Son ligand analogue, CXCL12, favorise la survie et la prolifération cellulaire et peut contribuer au tropisme des cellules leucémiques vers les tissus lymphoïdes.

Le **Plérixafor (Mozobil®)** est un antagoniste réversible et sélectif du récepteur CXCR4 qui bloque ainsi la liaison du CXCL12. Cette rupture de la liaison entre CXCR4 et son ligand analogue engendre une élévation du nombre de cellules souches hématopoïétiques circulantes et donc une leucocytose avec la mobilisation de cellules CD34+ fonctionnelles permettant la reconstitution hématopoïétique. Le ciblage du CXCR4 avec le Plérixafor permet d'améliorer la sensibilité aux médicaments. Une étude de phase 1 d'escalade de dose de Plérixafor avec du Rituximab chez des patients atteints de LLC en rechute/réfractaire a mis en évidence l'efficacité et la bonne tolérance de l'anti-CXCR4.²²⁵ L'**Ulocuplumab (BMS-936564)** est un anticorps IgG4 anti-CXCR4, entièrement humain qui inhibe également l'activation et la migration des cellules de LLC médiées par la voie CXCR4-CXCL12. Cependant, contrairement au Plérixafor, il induit l'apoptose à des concentrations nanomolaires avec un effet pro-apoptotique indépendant des marqueurs pronostiques de LLC à haut risque. Son mécanisme d'action implique la production d'espèces réactives de l'oxygène.²²⁶ Il a été testé dans une étude de phase 1 dans diverses hémopathies comprenant la LLC en rechute. (NCT01120457).

CXCL12

La chimiokine CXCL12, seul ligand du récepteur CXCR4, est exprimée dans la plupart des cellules hématopoïétiques. Elle est produite en quantité très importante dans le stroma de la moelle osseuse et est fortement impliquée dans la rétention des cellules LLC dans la moelle. De plus, CXCL12 a des effets antiapoptotiques sur les cellules de LLC et confère une protection contre l'apoptose induite par la chimiothérapie, via un mécanisme dépendant des cellules stromales.

NOX-A12, un oligonucléotide d'ARN, se lie et neutralise CXCL12. Il a été développé pour interférer avec CXCL12 dans le microenvironnement tumoral. Une étude a examiné les effets de NOX-A12 sur la migration des cellules LLC et la sensibilité aux médicaments. Il a été démontré que cette molécule interfère efficacement avec la chimiotaxie induite par CXCL12 et

la résistance aux médicaments des cellules LLC, justifiant le développement clinique de NOX-A12 en combinaison avec des agents conventionnels de la LLC.²²⁷ Une étude de phase 2 a testé le NOX-A12 en association à la Bendamustine et au Rituximab dans la LLC en rechute/réfractaire et a montré des résultats prometteurs et notamment chez les patients à haut risque, y compris ceux avec une délétion 17p.²²⁸

CCR7

Le récepteur CCR7 (CC-chemokine Receptor 7) est couplé aux chimiokines CCL19 et CCL21 et le couple CCL19/CCR7 conjointement avec CXCL13/CXCR5 ont un mécanisme d'inhibition de l'apoptose.

Dans une étude préclinique, l'efficacité d'un anti-CCR7 murin a été évalué en monothérapie chez les patients atteints de LLC à haut risque et/ou réfractaire à la Fludarabine. Les résultats démontrent que CCR7 est encore fortement exprimé dans les cellules des patients atteints d'une LLC traitée. De plus, le mécanisme d'action de cet anticorps médié par le complément éradique efficacement les cellules LLC tout en épargnant les cellules T. Selon cette étude, l'activité *in vitro* de l'anti-CCR7 surpasse celle de l'Alemtuzumab.²²⁹ Très récemment, un nouvel anti-CCR7 a été développé, **JBH 492**, et est actuellement testé dans un essai de phase 1. (NCT04240704)

CD154 (CD40Ligand) et CD40

Le CD40L, également connu sous le nom de CD154, est le principal ligand du CD40. La signalisation via CD40 permet l'activation des Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA), puis la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation accrue des lymphocytes T. Ainsi, après stimulation de CD154, les cellules B de LLC deviennent des CPA et induisent l'activation des cellules T cytotoxiques contre les cellules leucémiques. Ces effets sont médiés par une régulation positive des molécules costimulatrices (CD54, CD70, CD80 et CD86). Par conséquent, la signalisation CD40/CD40L peut être considérée comme une cible thérapeutique intéressante.

ISF35 est un adénovirus recombinant à réplication défectueuse codant pour un homologue CD154 humanisé recombinant²³⁰, testé dans un essai de phase 1 et 2 sur des patients atteints de LLC ou de lymphome lymphocytaire. (NCT00850057 et NCT00849524). Parmi les anti-CD40, on peut citer le **Dacétuzumab (SGN-40 ou anti-huCD40 mAb)**,²³¹ et le **Lucatumumab (HDC122)**,²³² qui sont tous deux des anticorps monoclonaux humanisés d'isotype IgG1, testés dans des essais cliniques de phase 1 chez des patients atteints de LLC.

BAFF-R

BAFF est une protéine de surface appartenant à la superfamille du TNF qui soutient le développement et la prolifération des lymphocytes B. La liaison de BAFF à BAFF-R conduit à la transcription du gène des protéines de la famille Bcl-2 via la signalisation NF-kB. Selon une étude récente, lors d'un traitement par Ibrutinib chez les patients atteints de LLC, la densité d'antigène CD20 sur les cellules LLC diminue, rendant l'efficacité de l'association Ibrutinib-AntiCD20 limitée. Cependant le facteur d'activation des cellules B (BAFF) et son récepteur (BAFF-R) restent élevés pendant le traitement par Ibrutinib.

VAY-736 est un anticorps humanisé dirigé contre BAFF-R, antagonisant la protection à l'apoptose médiée par BAFF. VAY-736 a montré une ADCC supérieure par rapport aux anticorps dirigés contre CD20 et CD52 utilisés dans la LLC. Ainsi VAY-736 a présenté une efficacité *in vivo* en monothérapie, et a produit une survie prolongée, en combinaison avec l'Ibrutinib, par rapport à l'Ibrutinib seul.²³³

CD27 et CD70

Le CD27, appartient à la superfamille des récepteurs du TNF, et constitue une molécule de costimulation étroitement régulée, et activée par son ligand, le CD70. Chez l'homme, le CD27 est exprimé à la surface de la majorité des lymphocytes T, des lymphocytes B mémoires, des plasmocytes et d'un sous ensemble de cellules NK. L'activation du CD27 est essentielle pour la génération d'une réponse contre les cellules leucémiques par les lymphocytes T en contribuant à l'expansion, la survie et l'activité cytolytique des lymphocytes TCD8. Des études ont montré que l'utilisation de thérapies ciblant cette voie, par l'expression artificielle de CD70 ou d'anticorps agonistes anti-CD27 permet de contourner la signalisation médiée par le CD40, conduisant à une immunité anti-tumorale.^{234, 235}

Le **Varlilumab** (CDX 1127) est un anticorps monoclonal entièrement humain spécifique du CD27. Son activité agoniste a été démontrée dans un essai de phase 1 dans les tumeurs solides et les hémopathies malignes dont la LLC.²³⁶ (NCT01460134). Le **MDX-1411** est un anticorps monoclonal humain qui cible spécifiquement le CD70 testé dans un essai de phase 1 sur les lymphomes du manteau et les LLC réfractaire/ en rechute. (NCT00730652).

ROR1

Le Récepteur Orphelin de type Récepteur à tyrosine kinase (ROR1) est une protéine transmembranaire de type I qui joue un rôle essentiel dans l'organogénèse.²³⁷ Son expression s'atténue rapidement après le développement embryonnaire, à l'exception des hématogones

(cellules physiologiques de régénération).²³⁸ Des études ont montré que la protéine ROR1 est le récepteur de Wnt5a, et la signalisation ROR1/Wnt5a est essentielle à la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhésion cellulaire.²³⁹ Par ailleurs, le ROR1 est exprimé dans divers cancers, y compris sur les cellules néoplasiques de la majorité des patients atteints de LLC.²⁴⁰ Ainsi, le ROR1 est une cible intéressante car il est exprimé sur les cellules néoplasiques mais est indétectable sur les cellules adultes saines.

Le **Cirmtuzumab** est un anticorps monoclonal humanisé qui cible ROR1, et a été testé dans un essai clinique de phase 1.²⁴¹ Un essai clinique de phase 2, actuellement en cours, étudie l'association de Cirmtuzumab à l'Ibrutinib dans la LLC. (NCT03088878). Un autre anticorps anti-ROR1, le **VLS-101**, est testé dans un essai de phase 1 actuellement en cours, chez les patients avec une transformation de Richter.

HLA-DR

La molécule CMH de classe II, HLA-DR, présents à la surface des cellule présentatrices d'antigène et donc des lymphocytes B, régule l'activation, la prolifération et la différenciation ds cellules B par le biais de leur interaction avec les cellules T. Ceci est dû au fait que le CMH de classe II est impliqué dans diverses voies de signalisation dans les cellules B humaines, son activation conduisant à la phosphorylation de diverses tyrosines kinase et à la mobilisation du calcium. Par ailleurs, HLA-DR est également exprimée à la surface d'environ 60% des cellules B des tumeurs malignes.²⁴²

L'**Apolizumab** (Hu1D10) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la chaîne bêta de l'antigène leucocytaire humain-DR. Il a une activité antitumorale en induisant la mort cellulaire par des mécanismes ne dépendant ni de l'activité ADCC ni de la lyse médiée par le complément. Par conséquent, contrairement à d'autres thérapies ciblées telles que les anti CD20, le traitement par mAb anti CMH de classe II dépend moins de l'intégrité de la réponse immunitaire des patients et engendre potentiellement moins d'effet indésirable. Cette molécule a été testé en monothérapie dans une étude de phase 2,²⁴³ et en association au Rituximab dans une étude de phase 1, montrant une efficacité supérieure au Rituximab seul, dans les hémopathies malignes B.²⁴⁴ Un autre anticorps ciblant HLA-DR, **IMMU-114**, est actuellement testé dans un essai clinique de phase 1 dans divers hémopathies malignes B (NCT01728207).

MiR155

La biologie de la LLC peut également être influencée par les microARN, en particulier le microARN miR-155, régulateur critique de l'expression génique post-transcriptionnelle dans les cellules B. Les cellules leucémiques des patients atteints de LLC, exprimant fortement le miR-155, sont associées à une maladie plus agressive. Des études ont montré que l'expression élevée de miR-155 dans les cellules de LLC peut réprimer l'expression de SHIP1 (SRC Homology-2 domain-containing Inositol 5-Phosphatase 1), une phosphatase inhibitrice des kinases, ce qui explique son association à des résultats cliniques défavorables dans la LLC.¹⁴⁵ De plus, miR155 est également impliquée dans la stabilité de HIF-1 α , protéine jouant un rôle régulateur dans l'interaction des cellules de LLC avec leur microenvironnement (comme décrit plus haut p.77).

Un essai de phase 1 teste actuellement un inhibiteur de miR155, le **Cobomarsen (MRG 106)**, dans les hémopathies B, dont la LLC (NCT02580552), cette molécule ayant déjà montré une efficacité dans le lymphome T cutané.²⁴⁵

Comme nous venons de le voir en détail, il existe de nombreuses cibles qui sont impliquées dans les interactions de la cellule B avec le microenvironnement et qui peuvent influencer les réponses immunitaires vis à vis du clone leucémique. L'ensemble des différentes molécules thérapeutiques développées vis à vis de ces cibles et les résultats obtenus de ces essais est récapitulé dans le tableau 26 en page suivante :

Molécule	Cible	Phase	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Plerixafor (AMD3100)	CXCR4	1	NCT00694590 Leslie A. Andristos <i>et al.</i> ²²⁵	Plérixafor + Rituximab dans la LLC R/R et le SLL	RG : 38%
Ulocuplumab (BMS-936564)	CXCR4	1	NCT01120457	Ulocuplumab dans la LLC en rechute	/
Nox A12	CXCL12	2	NCT01486797 Steurer M <i>et al.</i> ²²⁸	NOX-A12 + Bendamustine et Rituximab dans la LLC R/R	RG : 86% : - RC : 11% - RP : 75% SSP : 15,4 mois SMG : non atteinte avec >80% des patients en vie après un suivi médian de 28 mois.
JBH 492	CCR7	1	NCT04240704	Monothérapie dans la LLC R/R	En cours
Dacetuzumab (SGN-40)	CD40	1/2	NCT00283101 Furman RR <i>et al.</i> ²³¹	Monothérapie dans la LLC	RO : 0% MS : 42%
Lucatumumab (HCD122)	CD40	1	NCT00108108 John Byrd <i>et al.</i> ²³²	Monothérapie chez les patients LLC R/R	RNP : 4% MS : 65%
Ad-ISF35	Homologue CD154	2	NCT00849524	Monothérapie en injection intranodale dans la LLC/SLL	/
Lanalumab (VAY-736)	Anti-BAFF-R	1	NCT03400176	VAY-736 + Ibrutinib dans la LLC	En cours
Varlilumab (CDX-1127)	CD27	1	NCT01460134	Monothérapie dans certaines tumeurs solides et hémopathies malignes	/
MDX-1411	CD70	1	NCT00730652	Monothérapie chez patients R/R	/
Cirmtuzumab	ROR1	1	NCT02222688	Monothérapie dans la LLC progressive R/R	/
	ROR1	2	NCT03088878	Cirmtuzumab + Ibrutinib dans les hémopathies lymphoïdes B	En cours
VLS 101	ROR1	1	NCT03833180	Escalade de dose dans les hémopathies malignes dont la transformation de Richter	En cours
Apolizumab (Hu1D10)	HLA-DR	1	NCT00022971 Dunleavy <i>et al.</i> ²⁴⁴	Apolizumab + Rituximab dans les lymphomes B et la LLC R/R	Sur 24 patients inclus : 5 RC (dont 1 patient LLC)
		2	NCT00089154 Lin <i>et al.</i> ²⁴³	Monothérapie dans la LLC en rechute	Sur 19 patients : - 1 RP - 3 MS au-delà de 6 mois
		1	NCT01728207	Escalade de dose dans la LLC et LNH R/R	/
Cobomarsen	MiR155	1	NCT02580552	Monothérapie dans diverses hémopathies	En cours

Tableau 26 : Synthèse des essais cliniques de l'ensemble des molécules impactant les interactions des cellules de LLC avec le microenvironnement.

Les thérapeutiques qui ciblent spécifiquement la cellule B et ses interactions avec le microenvironnement médullaire et/ou ganglionnaire sont schématisées sur la figure 17. Cette figure reprend l'ensemble des anticorps monoclonaux et autres molécules décrites précédemment, utilisées en pratique courante ou ayant fait l'objet d'essais cliniques dans la LLC.

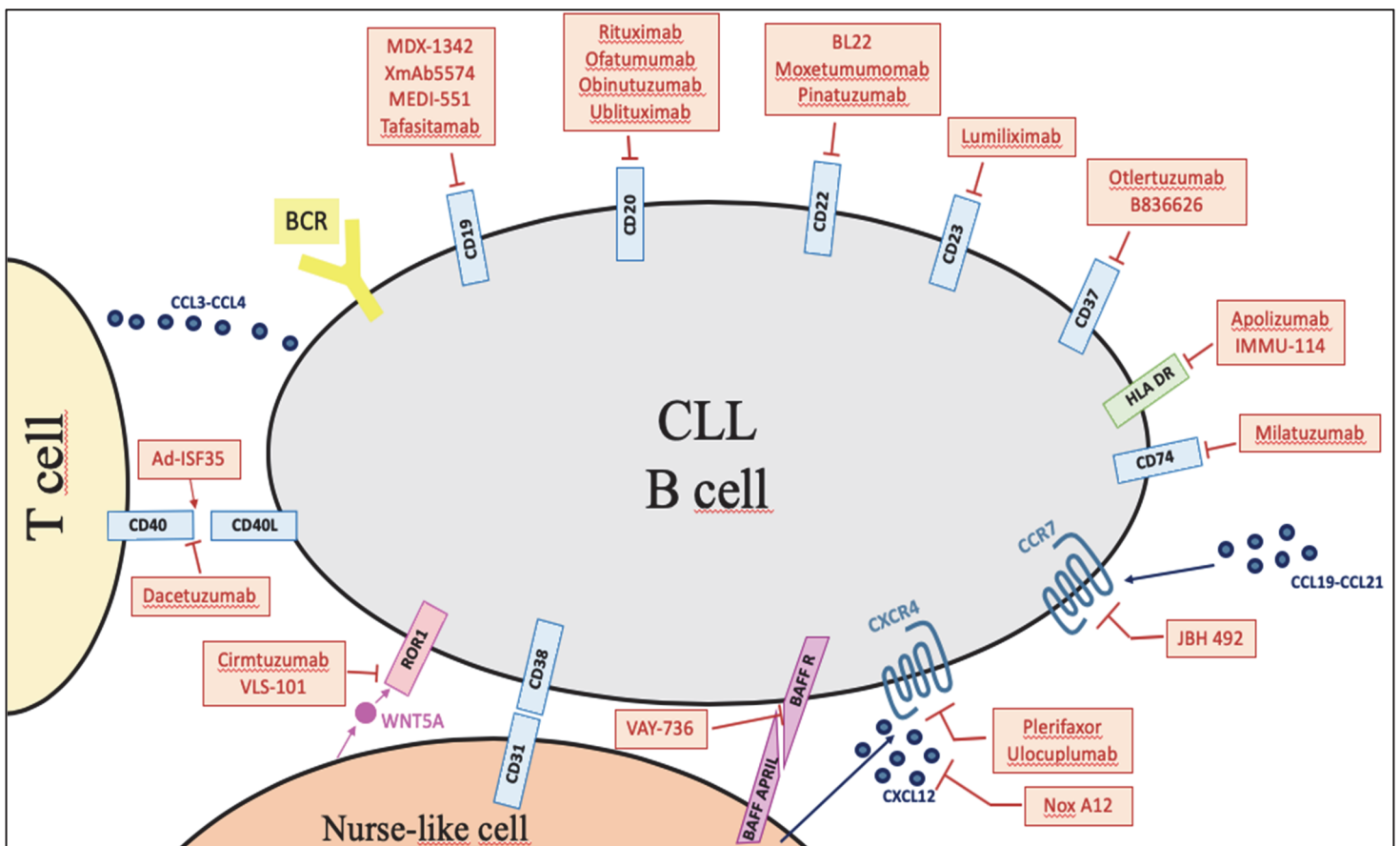


Figure 17 : Ciblage de récepteurs transmembranaires de la cellule LLC et de leur ligand en tant que stratégie thérapeutique dans la LLC

2.2.3 Cibles thérapeutiques impliquées dans les stratégies d'induction de l'apoptose

a) Inhibition de l'activité fonctionnelle des protéines de survie Bcl-2 (les BH3 mimétiques)

Les protéines de la famille de Bcl-2 sont des régulateurs clés du processus apoptotique :

Le premier inhibiteur puissant évalué dans les essais cliniques a été le **Navitoclax** (ABT-263), un BH3 mimétique capable de bloquer la fonction de la protéine anti-apoptotique Bcl2. En effet, le principe est le développement de petites molécules capable d'imiter les protéines de la famille BH3-only, qui sont des antagonistes naturels des protéines antiapoptotiques et notamment Bcl-2. Cependant en raison de son action inhibitrice concomitante de Bcl-XL, une thrombopénie grade 3/4 était souvent retrouvée avec le navitoclax, l'équilibre Bax/Bcl-XL définissant la survie des plaquettes circulantes. Cette toxicité a limité la dose à administrer et donc son utilisation.

L'**Obatoclax** (GX15070) est un dérivé synthétique des prodigiosines naturelles et peut se lier à toutes les protéines Bcl-2 proapoptotiques mais avec une faible activité.²⁴⁶ Ce mimétique pan-BH3, dont l'activité apoptotique a été attribuée à divers mécanismes (notamment induction de Noxa et inhibition de la voie Akt/mTOR), s'est avéré ne démontrer aucune efficacité significative en monothérapie dans la LLC dans les essais de phase 1.²⁴⁷

Le **Gossypol** (AT-101) est également un BH3-mimétique, dérivé d'aldéhyde polyphénolique naturel connu pour son activité proapoptotique. Ce dernier agit également grâce à des mécanismes hors cible tels que la génération de ROS et l'induction de Noxa. L'isomère **AT-101** s'est révélé être plus actif et capable d'empêcher l'induction de Mcl-1. Cependant, les essais de phase 1 et 2 ont indiqué que peu d'efficacité thérapeutique en monothérapie.

Plus récemment, le **Vénétoclax** (Venclyxto[®], ABT-199), également inhibiteur de Bcl2, plus puissant que le Navitoclax et plus sélectif de Bcl-2, a reçu l'AMM en 2016 pour le traitement des patients en rechute ou intolérants aux BCRi et dans les formes réfractaires de LLC avec délétion 17p13.²⁴⁸ Il s'agit du premier inhibiteur de Bcl-2 biodisponible oralement. Le **Vénétoclax** a montré une efficacité prometteuse dans le traitement des patients atteints de LLC en rechute. Une étude de phase 1 a montré, sous Vénétoclax en monothérapie, un taux de réponse de 82% avec une SSP à 15 mois estimée à 69% chez des patients atteints de LLC récidivante ou réfractaire. La RG était également excellente dans les groupes de patients à pronostic défavorable. De plus, contrairement aux BCRi, des RC ont été observées : 20% des

patients dont 5% avec une MRD négative.²⁴⁹ Une autre étude sur le Vénétoclax en monothérapie chez des patients atteints de LLC en rechute a également montré une grande efficacité de la molécule chez les patients porteur de la del(17p)13.²⁵⁰ L'étude **MURANO**, essai de phase 3, a comparé le Vénétoclax/Rituximab à la Bendamustine/Rituximab chez des patients LLC en rechute ou réfractaire avec une del(17p)13. La SSP à 2 ans était de 85% avec le Vénétoclax et 36% avec la Bendamustine, avec un taux de statut MRD négatif dans le sang périphérique significativement plus élevé (62% vs 13%), suggérant que la thérapie combinant le Vénétoclax et le Rituximab puissent atteindre des rémissions profondes même chez les patients à pronostic très défavorable.²⁵¹ L'étude CLL14, étude de phase 3 comparant l'association Chlorambucil-Obinutuzumab au Vénétoclax-Obinutuzumab chez des patients atteints de LLC non traités, a montré des résultats très encourageants.²⁵² La SSP à 24 mois était significativement plus élevée dans le groupe Vénétoclax-Obinutuzumab (88,2% vs 64,1%), y compris chez les patients avec une délétion/mutation TP53 et chez les patients avec un statut IGVH non muté. L'un des résultats les plus importants de cet essai a été le taux très élevé de rémissions MRD négative dans le sang périphérique estimé à 76% dans le groupe Vénétoclax-Obinutuzumab.²⁵³ L'essai **CLARITY** a combiné l'Ibrutinib et le Vénétoclax pour éradiquer la LLC chez les patients atteints de LLC récidivante ou réfractaire et a montré des résultats très prometteurs.²⁵⁴

L'effet indésirable majeur du Vénétoclax est le syndrome de lyse tumorale nécessitant une augmentation de doses par palier. Des troubles gastro-intestinaux et une neutropénie sont également fréquemment présents avec cette molécule.

Plus récent encore que le Vénétoclax, **S55746 (ou BCL201)**, est un nouvel inhibiteur BH3 mimétique, sélectif et puissant du Bcl-2 biodisponible par voie orale, bien toléré, actuellement en phase 1 d'essai clinique. Son profil de sélectivité ne montre aucune liaison significative à Mcl-1 et une faible affinité pour Bcl-XL, permettant de limiter la cytotoxicité sur les plaquettes.²⁵⁵

Dans le tableau 27 sont rassemblés les BH3 mimétiques testés dans la LLC, du Navitoclax, premier inhibiteur du BCL2, au Vénétoclax, utilisé en pratique courante dans le traitement de la LLC :

Molécule	Phases	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats												
Navitoclax (ABT-263)	1/2	NCT00481091 Roberts <i>et al.</i> , 2012 ²⁵⁶	Monothérapie dans la LLC R/R	RP : 35% MS pendant plus de 6 mois : 27% SSP : 25 mois												
	1	NCT00868413 Kipps <i>et al.</i> 2011 ²⁵⁷	Navitoclax + RFC et Navitoclax + BR dans la LLC R/R	<table border="1"> <tr> <td>Navi + BR (16 patients) :</td> <td>Navi + RFC (4 patients) :</td> </tr> <tr> <td>RG: 81%</td> <td>RC : 2/4</td> </tr> <tr> <td>RC: 37,5%</td> <td>MS : 1/4</td> </tr> <tr> <td>RP: 43,7%</td> <td>MP : 1/4</td> </tr> <tr> <td>MS: 12,5%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>MP: 6,2%</td> <td></td> </tr> </table>	Navi + BR (16 patients) :	Navi + RFC (4 patients) :	RG: 81%	RC : 2/4	RC: 37,5%	MS : 1/4	RP: 43,7%	MP : 1/4	MS: 12,5%		MP: 6,2%	
	Navi + BR (16 patients) :	Navi + RFC (4 patients) :														
RG: 81%	RC : 2/4															
RC: 37,5%	MS : 1/4															
RP: 43,7%	MP : 1/4															
MS: 12,5%																
MP: 6,2%																
2	NCT01087151 Kipps <i>et al.</i> , 2015. ²⁵⁸	Navitoclax + Rituximab (à doses intensives) vs Rituximab seul chez des patients LLC jamais traités	<table border="1"> <tr> <td>Ritux seul :</td> <td>Ritux + Navitoclax (12 sem) :</td> </tr> <tr> <td>- RG: 35%</td> <td>- RG : 55 %</td> </tr> <tr> <td>- RC: 0</td> <td>- RC : 0%</td> </tr> <tr> <td>- RP: 35%</td> <td>- RP : 55%</td> </tr> <tr> <td>- MS: 53%</td> <td>- MS : 40%</td> </tr> <tr> <td>- MP: 5%</td> <td>- MP : 0%</td> </tr> </table>	Ritux seul :	Ritux + Navitoclax (12 sem) :	- RG: 35%	- RG : 55 %	- RC: 0	- RC : 0%	- RP: 35%	- RP : 55%	- MS: 53%	- MS : 40%	- MP: 5%	- MP : 0%	
Ritux seul :	Ritux + Navitoclax (12 sem) :															
- RG: 35%	- RG : 55 %															
- RC: 0	- RC : 0%															
- RP: 35%	- RP : 55%															
- MS: 53%	- MS : 40%															
- MP: 5%	- MP : 0%															
Obatoclax (GX15070)	1	NCT00612612 Brown <i>et al.</i> ²⁵⁹	Obatoclax + RF dans la LLC en rechute	RG : 85% RC : 54% selon les critères IWCLL 2008 SSP : 20 mois												
	1/2	NCT00600964 O'Brien <i>et al.</i> ²⁶⁰	Monothérapie dans les LLC jamais traitées	RP : 4% Réduction lymphocytes circulants : 24%												
Gossypol (AT-101)	2	NCT00286780 Januario.E Castro <i>et al.</i> ²⁶¹	AT-101 (en administration intermittente) + Rituximab dans la LLC R/R	RP : 3/6 patients												
Vénétoclax (ABT-199)	Voir tableau 13 p.59															
S55746	1	NCT02920697	Monothérapie dans les LNH B, LLC et MM	En cours												

Tableau 27 : Synthèse des essais cliniques des BH3 mimétiques

b) Inhibition de l'expression des protéines antiapoptotiques

Les CDK

Les Cyclines Kinases Dépendantes (CDK) sont des sérine-thréonine kinases qui jouent un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire (principalement CDK1, 2, 4 et 6). De plus, les CDK se sont révélées jouer un rôle régulateur important dans de nombreuses fonctions diverses, comprenant le contrôle de la transcription génique (CDK7, 8, 9, 10 et 12), le développement neuronal (CDK5 et 16), le métabolisme (CDK5 et 8), l'hématopoïèse, l'angiogénèse, la protéolyse, les dommages et réparation de l'ADN (CDK1, 3, 9 et 12), et l'épigénétisme (CDK1, 2 et 4).²⁶²

Les inhibiteurs des CDKs (CDKi) agissent par inhibition de la croissance et de la division cellulaire et la plupart d'entre eux sont de très bons inhibiteurs de la transcription, en ciblant principalement CDK7 et CDK9 (cf. Figure 18). Une des conséquences observées est la diminution de la transcription des protéines antiapoptotiques, telles que Mcl-1, Bcl-XL et l'inhibiteur XIAP, entraînant la mort cellulaire.²⁶³

Parmi ces CDKi, on retrouve le **Flavopiridol** (Alvocidib®), flavonoïde synthétique dérivé d'une plante indienne, qui est le premier membre de cette famille. Il s'agit d'un puissant inhibiteur des CDK avec une activité préférentielle contre CDK9, qui contrôle l'expression du facteur de survie Mcl-1.²⁶⁴ Le **Dinaciclib** est un dérivé de la pyrimidine et inhibiteur puissant des CDK1, 2, 5 et 9. Il a fait l'objet d'études dans un essai de phase 1 en association au Rituximab ainsi que dans un essai de phase 3 en comparaison à l'Ofatumumab et a montré des résultats très prometteurs.^{265, 266} **TGO2** est également un nouvel inhibiteur multi-kinase à base de pyrimidine qui inhibe les CDK1, 2, 7 et 9 ainsi que JAK2 et FLT3 (tyrosine kinase-3 de type fms) dans les cellules cancéreuses.²⁶⁷ **SNS-032** présente une puissante activité inhibitrice sélective des CDK2, 7 et 9²⁶⁸ et **AT7519M** est un inhibiteur des CDK1, 2, 4, 6, 7, 9 testé dans un essai de phase 2 (NCT01627054). De nouveaux inhibiteurs des CDKs sont actuellement testés dans des essais cliniques de phase 1 tel que le **CYC-065**, un inhibiteur des CDK 2 et 9, étudié en association avec le Vénétoclax dans la LLC en rechute/réfractaire (NCT03739554) ou encore **AZD4573**, un inhibiteur du CDK9 (NCT03263637).

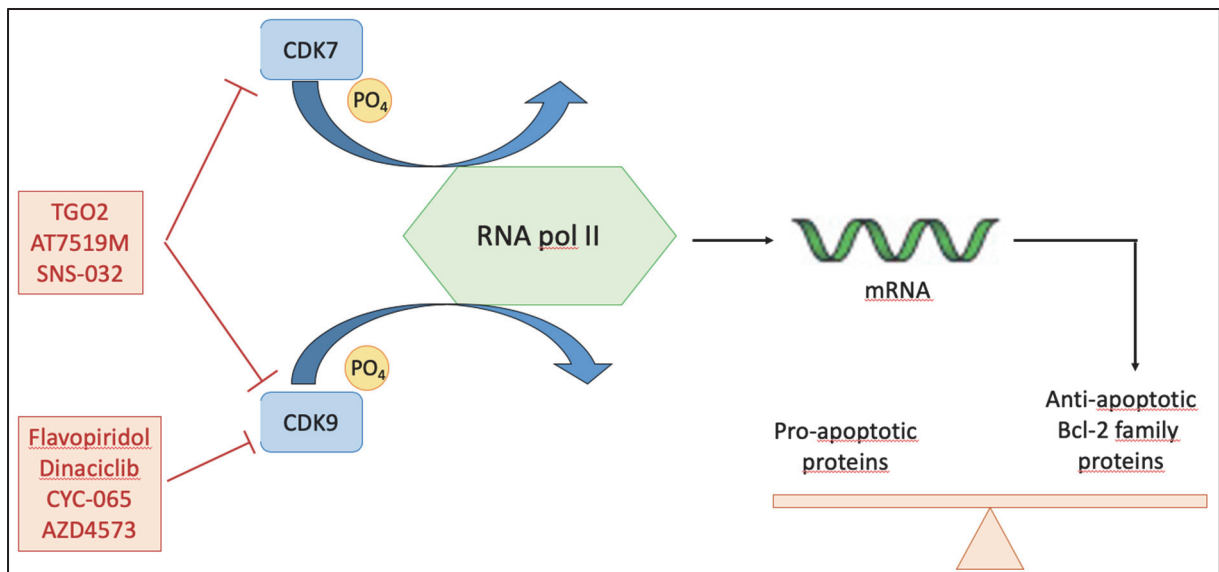


Figure 18 : Mécanisme d'action des CDK7 et 9 sur la transcription et stratégie d'inhibition des CDKs pour diminuer la transcription des facteurs antiapoptotiques, schéma adapté d'après Blachly et al., 2016 ²⁶⁹

Le tableau 28 récapitule l'ensemble des résultats obtenus de ces nouvelles molécules inhibitrices des CDK :

Molécule	Cibles	Phase	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Alvocidib® (Flavopiridol)	CK9/1/2/ 4/6	2	NCT00098371 Thomas S.Lin <i>et al.</i> ²⁷⁰	Monothérapie dans LLC R/R	RG : 53% : RP : 47% RPN : 5% RC : 1,6% SSP : 10 à 12 mois Réponse obtenue chez la majorité des patients à haut risque (del17p et del11q)
TGO2 citrate	CDK1/2/ 7/9	1	NCT01699152	Monothérapie dans la LLC/SLL R/R	/
AT7519M	CDK1/2/ 4/6/7/9	2	NCT01627054	Monothérapie dans la LLC R/R	/
SNS-032	CDK2/7/ 9	1	NCT00446342	Monothérapie dans diverses hémopathies lympoïdes B dont la LLC	/
Dinaciclib	CDK1/2/ 5/9	1/2	J Flynn <i>et al.</i> ²⁶⁵	Monothérapie dans la LLC R/R	RG : 54% indépendamment de la del (17p) SSP : 481 jours
		1	NCT01650727 Fabre C <i>et al.</i> ²⁶⁶	Dinaciclib + Rituximab dans la LLC/ SLL R/R	Sur 5 patients : - 4 MS - 1 RC
		3	NCT01580228 Ghia <i>et al.</i> ²⁷¹	Comparaison Dinaciclib vs Ofatumumab dans la LLC réfractaire	Dinaciclib : - RC : 0 - RP : 40% - RG : 40% - MS : 35% - MP : 5% - SSP : 13,7 m - SG : 21,2 m
CYC 065	CDK2,9	1	NCT03739554	CYC065 + Vénétoclax dans la LLC R/R	En cours
AZD4573	CDK9	1	NCT03263637	Escalade de dose dans diverses hémopathies malignes R/R	En cours

Tableau 28. : Synthèse des essais cliniques de l'ensemble des inhibiteurs des CDK.

Autres kinases

De plus, les voies PI3K/Akt et Raf/MEK/ERK contrôlent l'expression et la fonction de nombreuses protéines essentielles à la survie cellulaire. Il a été démontré que l'activation soutenue d'Akt entraîne une augmentation de la viabilité des cellules leucémiques et une expression accrue des protéines antiapoptotiques Mcl-1, Bcl-XL et de l'inhibiteur XIAP. De plus, ERK est impliquée dans la régulation post traductionnelle de Bim, protéine proapoptotique. Ainsi ces différentes voies sont des cibles potentielles dans le traitement de la LLC et l'inhibition en amont des kinases Akt, ERK ou de l'inhibiteur XIAP, permet la suppression de l'effet anti-apoptotique, en partie lié à l'activation soutenue de la signalisation du BCR²⁷².

Parmi les inhibiteurs de kinases, on peut citer le **Sorafénib (Nexavar®)** qui est un inhibiteur multikinase de Raf, de MEK et de ERK testé dans des essais de phase 2, des études précliniques ayant montré une bonne sensibilité des cellules de LLC au Sorafénib.²⁷³ On retrouve aussi **LY3214996** qui est un inhibiteur sélectif de ERK 1 et 2 dont l'essai clinique a été retiré. Parmi les inhibiteurs d'Akt ayant montré un intérêt dans la LLC on peut citer **MK-2206** dont l'innocuité et l'efficacité étudiées en combinaison avec la Bendamustine et le Rituximab dans la LLC en rechute/ réfractaire dans une étude de phase 1/2, ont montré des résultats prometteurs.²⁷⁴ La **Pérfosine** est un autre inhibiteur Akt qui a montré une puissante activité *in vitro* contre les cellules de LLC primaires et les résultats préliminaires de l'essai de phase 2 sur la LLC en rechute/réfractaire démontrent une stabilisation de la maladie dans un groupe de patients à très haut risque et un profil de toxicité acceptable.²⁷⁵

Le tableau 29 récapitule l'ensemble des essais de phase 1 ou 2 concernant les inhibiteurs des kinases décrites ci-dessus.

Molécule	Cibles	Phase	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Sorafénib	Raf/ERK/MEK	2	NCT01510756 NCT00303966	Monothérapie dans la LLC R/R	/
LY3214996	ERK 1 et 2	1	NCT04043845	Monothérapie chez dans diverses hémopathies résistantes à l'ibrutinib	Essai retiré
MK-2206	Akt	1/2	NCT01369849 Larsen JT <i>et al.</i> ²⁷⁴	MK-2206 + BR dans la LLC R/R	RG : 92% SSP : 16 mois SST : 24 mois RC : 38% (dont 40% MRD neg)
Pérfosine	Akt	2	NCT00873457	Monothérapie chez les patients LLC/SLL R/R	/

Tableau 29 : Synthèse des essais cliniques de l'ensemble des inhibiteurs des kinases ERK et Akt.

ARN interférents et oligonucléotides antisens

Plusieurs thérapies ciblées sur l'ARN ont été développées et testées, tels que les miARN, les petits ARN interférents et les oligonucléotides. Des études ont montré la régulation négative de Mcl-1 par de petits ARN interférents, les **siRNA**, qui déclenchent l'apoptose des cellules *in vitro* et augmentent la sensibilité au Rituximab ; Mcl-1 étant reconnu pour être un médiateur de la résistance au Rituximab des cellules de LLC.²⁷⁶ Cependant, des obstacles techniques empêchent actuellement l'application de cette approche d'interférences avec l'ARN dans la clinique.

En revanche, la stratégie des oligonucléotides antisens a déjà été testée en clinique. On peut citer l'**Oblimersen** qui est l'oligonucléotide antisens Bcl-2 le plus largement testé et **AEG 31156** qui est un oligonucléotide antisens de l'XIAP. L'**Oblimersen** (Genasens® ou **G3139**) est un acide peptidique nucléique qui s'hybride avec six codons de l'ARNm de Bcl-2. Il n'a démontré qu'une activité thérapeutique modérée chez les patients atteints de LLC, même lorsqu'il est associé à la Fludarabine et au Cyclophosphamide.²⁷⁷ Des stratégies pour améliorer l'efficacité des oligonucléotides antisens ont été proposées par la suite.²⁷⁸ On peut également citer le **SPC 2996** qui est un LNA (Locked Nucleic Acid), un oligonucléotide antisens puissant et sélectif qui régule négativement l'ARNm de Bcl-2. Cette molécule a fait l'objet d'une étude en 2005 dans un essai clinique de phases 1 et 2 dans le traitement de la LLC. (NCT00285103).

De plus, il a été démontré que les cellules LLC expriment des niveaux élevés de l'inhibiteur d'apoptose lié à l'X (XIAP), par rapport aux lymphocytes normaux et ce dernier est le seul inhibiteur cellulaire connu des caspases, sa surexpression bloquant ainsi les principaux moyens d'apoptose. L'**AEG 35156** est un oligonucléotide antisens de 2^{ème} génération qui cible l'ARNm de XIAP afin d'améliorer la sensibilité des cellules cancéreuses à la mort intrinsèque et à la chimiothérapie, testé dans des essais cliniques de phase 1 et 2 (NCT00768339).

Le tableau 30 récapitule les résultats obtenus dans les essais cliniques sur les 3 oligonucléotides antisens testés dans la LLC ci-après :

Molécule	Cibles	Phase	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Oblimersen	ARNm Bcl-2	1/2	NCT00021749 Cheson <i>et al.</i> ²⁷⁹	Monothérapie dans la LLC R/R	RP : 8% MS pendant au moins 2 mois : 50% MP : 42% RMT : 32%
		1/2	NCT00078234 Cheson <i>et al.</i> ²⁷⁹	Oblimersen + RF dans la LLC chez 5 patients jamais traités et 19 patients précédemment traités	RG : 75% RC : 8,3%
		3	NCT00024440 Susan O'Brien <i>et al.</i> ²⁷⁷	Comparaison FC vs Oblimersen + FC dans la LLC R/R	Oblimersen + FC : RG: 41% RC : 17% Durée de la réponse : >36 mois
SPC 2996	ARNm Bcl-2	1/2	NCT00285103	Monothérapie dans la LLC R/R	/
AG35156	ARNm XIAP	1/2	NCT00768339	Monothérapie dans la LLC R/R et les lymphomes B indolents	/

Tableau 30 : Synthèse des essais cliniques des oligonucléotides antisens testés dans la LLC.

c) Activation de l'expression des protéines proapoptotiques

Les Histones DésACétylase (HDAC)

La désacétylation des histones est un mécanisme épigénétique associé à la répression transcriptionnelle. Les histones désacétylase (HDAC) sont surexprimées dans de nombreux cancers, dont la LLC, dans lesquelles elles assurent la médiation de l'inhibition épigénétique des miR15a, miR16 et miR-29b.²⁸⁰ Un certain nombre d'inhibiteurs naturels et synthétiques des HDAC (HDACi) tels que le **Depsipeptide**, le **Vorinostat (Zolinza®)**, le **Panobinostat (Farydak®, LBH589)**, le **Givinostat (ITF 2357)**, le **Mocetinostat (MGCD0103)** et l'**Abexinostat (PCI-24781)**, peuvent favoriser différents types de mort cellulaire dans les cellules LLC. Bien que la génération de ROS ait été impliquée dans l'apoptose induite par les HDACi, il a été démontré que certains HDACi agissent par régulation positive transcriptionnelle de l'ARNm de Noxa et Bim.²⁸¹ Cependant, la plupart de ces molécules ont montré des effets indésirables importants et un bénéfice thérapeutique limité pour les patients.^{282, 283, 284} Les associations avec d'autres molécules sont en cours d'évaluation. Des HDACi plus récents ont été développés et testés dans des essais cliniques de phase 1 et 2 dans la LLC en rechute ou réfractaire, tel que **Ricolinostat (ACY1215)**, un inhibiteur sélectif de HDAC6 testé en association à l'Ibrutinib²⁸⁵ ou encore **AR-42** un pan-HDACi.

Le tableau 31 récapitule l'ensemble des essais cliniques sur les HDACi :

Molécule	Phases	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Depsipeptide (FK228)	1	Byrd JC <i>et al.</i> ²⁸²	Monothérapie dans la LLC et la LAM	Aucune réponse partielle ni complète dans la LLC
Vorinostat	1/2	NCT00918723	Vorinostat + RFC chez des patients atteints de LLC/SLL non traités	/
Givinostat (ITF 2357)	2	NCT00792831	Monothérapie dans la LLC R/R	/
Panobinostat (LBH589)	2	NCT01090973	Monothérapie dans la LLC R/R et le MM	/
Mocetinostat (MGCD0103)	2	NCT00431873 Blum KA <i>et al.</i> ²⁸³	Monothérapie dans la LLC réfractaire	Aucune réponse partielle ni complète
Ricolinostat (ACY1215)	1	NCT0287369	ACY1215 + Ibrutinib ou idelalisib	/
Abexinostat	2	Vincent Ribrag <i>et al.</i> ²⁸⁴	Monothérapie LLC R/R	Aucune réponse clinique
AR-42	1	NCT01129193	Monothérapie dans les LLC/MM/lymphomes avancées ou réfractaires	/

Tableau 31 : Synthèse des essais cliniques de l'ensemble des inhibiteurs de l'ensemble des HDACi.

Le protéasome

Le complexe du protéasome catalyse la dégradation des protéines ciblées par l'ubiquitine et représente la principale voie de régulation du renouvellement des protéines.²⁸⁶ Les inhibiteurs du protéasome affectent les processus cellulaires régulateurs clés et ont des fonctions antitumorales par induction de l'apoptose. Ils améliorent la stabilité de nombreuses protéines et provoquent leur accumulation. Ainsi les deux cibles principales sont I κ B α (l'inhibiteur physiologique de NF- κ B) et le suppresseur de tumeur TP53. Deux autres cibles, les protéines Bim et Noxa, sont de plus en plus considérées comme cruciales pour les mécanismes d'action proapoptotiques des inhibiteurs du protéasome.²⁸⁷

Le **Bortézomib** (Velcade[®]), qui a montré son efficacité dans le traitement du myélome multiple et du lymphome à cellules du manteau, provoque l'accumulation de la protéine Noxa²⁸⁸ mais les essais cliniques du Bortézomib dans la LLC a mis en évidence plusieurs effets secondaires toxiques et n'a pas produit de réponses objectives.²⁸⁹ Le **Carfilzomib** (Kyprolis[®]), qui est un inhibiteur du protéasome de 2^{ème} génération, inhibe de manière spécifique et irréversible l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Il a une action puissante dans les cellules de LLC, y compris les cas avec del(17p) et son efficacité est due à une activation atypique de NF- κ B, non associée à l'induction transcriptionnelle, et aboutissant à un blocage irréversible de la libération de NF- κ B dans les noyaux.²⁹⁰ Cependant, comme le Bortézomib, le Carfilzomib favorise également la régulation positive de Mcl-1.²⁹¹ Un essai de phase 1 étudiant l'innocuité et la tolérance du Carfilzomib dans la LLC récidivante ou réfractaire montre une efficacité limitée de cette molécule (cf. tableau 32). De plus, une étude pilote a étudié la thérapie combinant le Carfilzomib à l'Ibrutinib et démontre une complémentarité d'action de ces deux molécules.²⁹²

Molécule	Phases	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Carfilzomib	1	NCT01212380 Farrukh T.Awan <i>et al.</i> ²⁹³	Escalade de dose chez patients LLC/SLL en rechute	11 patients évaluable : 100 % de MS

Tableau 32 : Synthèse des essais cliniques du Carfilzomib

d) Autres stratégies d'activation de l'apoptose

PARP

La poly-ADP ribose polymérase (PARP) joue un rôle crucial dans la réparation des ruptures d'ADN induites par le stress oxydatif ou la chimiothérapie. L'activité PARP est très variable dans la LLC et est en corrélation avec les protéines induites par le stress. Les PARPs jouant un rôle central dans la réponse aux dommages de l'ADN, des inhibiteurs de PARP ont été développés.

Le **Talazoparib (BMN 673)**, testé dans des études de phase 1 s'est montré efficace sur les cellules de LLC, y compris celles avec mutation TP53 ou ATM.²⁹⁴ Un essai clinique de phase 1 et 2 étudie l'utilisation de l'**Olaparib** chez les patients atteints de LLC avec mutation du gène ATM.²⁹⁵ Les résultats ne sont pas encore disponibles comme notifié dans le tableau 33.

Molécule	Phase	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Talazoparib (BMN673)	1	NCT01399840	Monothérapie dans diverses hémopathies malignes	/
Olaparib	1	Guy Pratt et al. ²⁹⁶	Monothérapie dans la LLC en rechute	/

Tableau 33 : Synthèse des essais cliniques des inhibiteurs du PARP

MDM2

La MDM2 (pour « Murine Double Minute 2 ») est l'E3 ubiquitine ligase responsable de la régulation négative de la protéine p53. Le ciblage de cette molécule représente donc une approche thérapeutique intéressante pour la réactivation non génotoxique de p53. Depuis la découverte du premier inhibiteur du MDM2, **Nutlin-3a** (cf. tableau 34), de nouveaux composés puissants ont été développés comme **RG7388** qui est un inhibiteur MDM2 de 2^{ème} génération.²⁹⁷

Molécule	Phase	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Nutlin-3a (RG7112)	1	NCT00623870	Monothérapie dans diverses hémopathies malignes	/

Tableau 34 : Synthèse des essais cliniques de Nutlin-3a

HSP90

Hsp90 (Heat Shock Protein 90) est une classe de protéines chaperonnes nécessaires à l'expression et à l'activité de ZAP-70. *In vitro*, des études ont montré que les inhibiteurs de Hsp90 induisent la dégradation de ZAP70 et l'apoptose des cellules de LLC.²⁹⁸

Il a été démontré que dans les cellules de LLC ZAP70 +, les inhibiteurs de Hsp90 avaient une affinité de liaison élevée pour les protéines Hsp90. Ces inhibiteurs de Hsp90 tels que **CNF 1010 (17 AAG)**, **CNF 2024** et **KW-2478**, ont fait l'objet d'étude dans des essais de phase 1 comme indiqué dans le tableau 35 :

Molécule	Phase	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
CNF1010 (17 AAG)	1	NCT00319930	Escalade de dose dans les LLC ZAP 70 +	/
CNF2024	1	NCT00344786	Escalade de dose dans la LLC	/
KW-2478	1	NCT00457782	Monothérapie dans la LLC, le MM et les LNH B	/

Tableau 35 : Synthèse des essais cliniques des inhibiteurs de Hsp90

La plupart des molécules inductrices de l'apoptose précédemment décrites, sont schématisées sur la figure 19 :

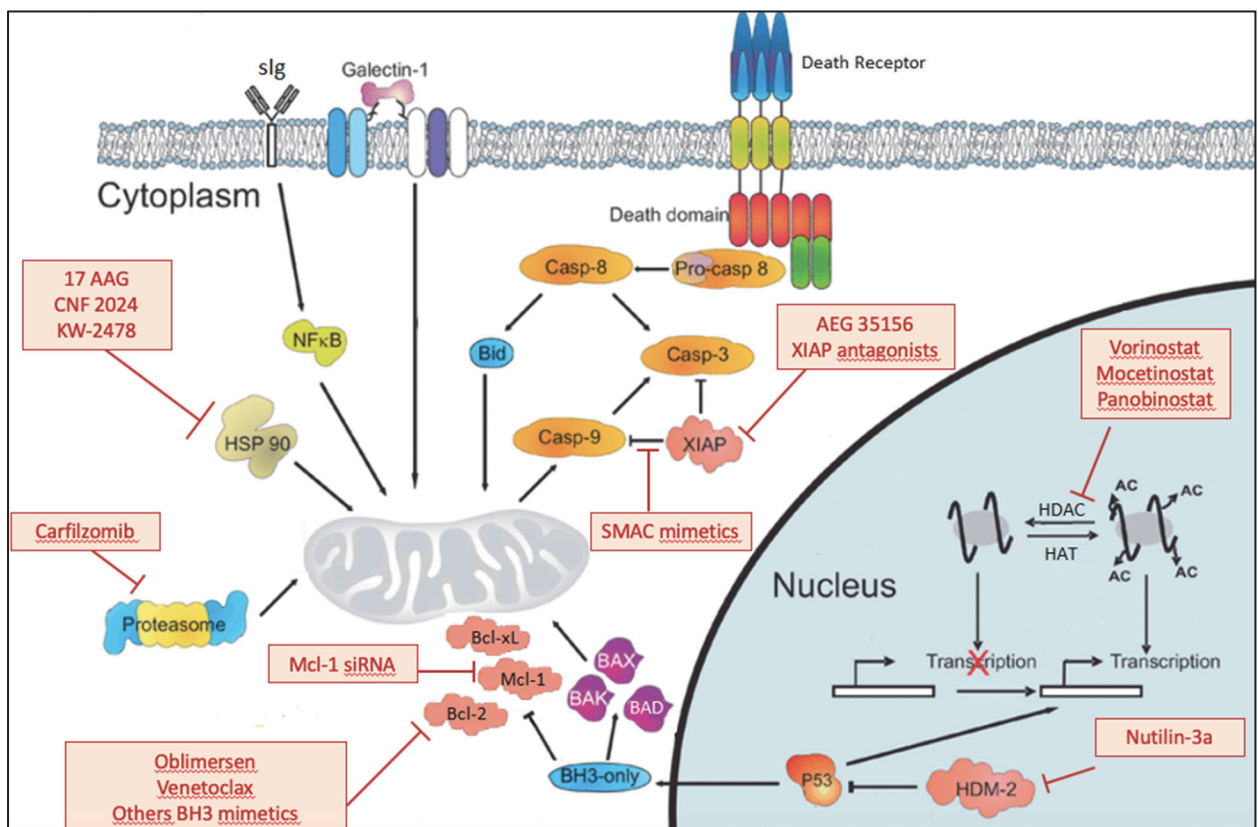


Figure 19 : Ciblage des différentes voies d'induction de l'apoptose en tant que stratégie thérapeutique dans la LLC, schéma adapté d'après Bremer et al., 2006²⁹⁹

2.2.1 Stratégies de renforcement de l'immunité anti tumorale

Nous avons vu jusqu'ici le ciblage précis de différents mécanismes de la pathogénèse de la LLC. Cependant, le renforcement de l'immunité afin de favoriser la lutte contre les cellules cancéreuses est une stratégie efficace du fait de la complexité de notre système immunitaire. Le but de cette stratégie est de moduler les cellules impliquées dans l'immunité (T, B et NK) ou de cibler des marqueurs à leur surface ayant un rôle dans la reconnaissance antigénique (TLR), l'activation cellulaire ou au contraire, la régulation négative de l'immunité (PD-1, CD32b, CD200).

Lénalidomide (Revlimid®)

Il s'agit d'un analogue du thalidomide qui possède des propriétés antiprolifératrices, antiangiogéniques et immunomodulatrices. Plus précisément, le lénalidomide induit l'apoptose des cellules tumorales par l'arrêt de leur croissance et le déclenchement de la « mort cellulaire programmée ». De plus, il inhibe l'adhésion des cellules cancéreuses aux cellules stromales et stimule la sécrétion cytokinique. Enfin il renforce l'immunité par l'activation des cellules T et NK.

Cette molécule a montré des résultats encourageants dans le traitement des patients atteints de LLC à haut risque.³⁰⁰ Chez 58% des patients atteints de LLC, le Lenalidomide provoque d'une réaction appelée « tumor flare » ou poussée tumorale entraînant une sensation de chaleur et de brûlure au niveau des ganglions lymphatiques.³⁰¹ Une approche prometteuse semblait utiliser le Lénalidomide en traitement d'entretien dans la LLC à haut risque avec une réponse partielle après un traitement par chimio-immunothérapie, cependant du fait du risque non négligeable de transformation en leucémie lymphoblastique aiguë, cette approche thérapeutique ne peut donc être recommandée.³⁰² La combinaison de Lénalidomide et de Rituximab chez des patients en rechute ou réfractaires a été testée et semble augmenter le taux de réponse sans augmenter la toxicité, y compris chez les patients présentant des facteurs de risques péjoratifs.³⁰³ La combinaison du Lénalidomide, du Rituximab et de la Fludarabine ou Bendamustine a également été testée chez des patients atteints de LLC non traités auparavant mais en raison de la toxicité élevée, l'essai a été arrêté prématurément.³⁰⁴

Anti-PD1

La protéine de mort programmée 1 (PD-1) a un rôle dans la modulation de la réaction immunitaire. En effet, présente à la surface des cellules immunitaires (T, B et NK), elle permet

la transmission d'un message inhibiteur à ces cellules et représente donc un frein au système immunitaire. Ainsi, certaines immunothérapies ciblant PD-1 ou son ligand PDL-1 permettent de restaurer la toxicité des cellules immunitaires face aux cellules cancéreuses.

Le **Pembrolizumab (Keytruda®)** est un anticorps monoclonal humanisé bloquant PD-1. Une étude de phase 2, testant le Pembrolizumab chez des patients LLC en rechute ou en transformation de Richter, montre une efficacité uniquement chez les patients avec une transformation (réponse objective de 44% vs 0%)³⁰⁵ (cf.tableau 36).

Molécule	Cibles	Phase	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Pembrolizumab	PD1	2	NCT02332980 Wei Ding <i>et al.</i> ³⁰⁵	Pembrolizumab chez les patients LLC en rechute ou en transformation de Richter après traitement antérieur par Ibrutinib	Richter (9 pts) : RO : 44% LLC (16 pts) : RO : 0

Tableau 36 : Synthèse des essais cliniques du Pembrolizumab

CarT cells

Il s'agit de lymphocytes T génétiquement modifiés exprimant à leur surface des récepteurs appelés « Récepteurs Antigéniques Chimériques » (CAR) avec une spécificité pour l'antigène CD19, couplés aux domaines intracellulaires de signalisation des cellules T. Ces lymphocytes T « reprogrammés » sont donc capables de reconnaître les cellules tumorales, conduisant à l'activation du lymphocyte T et à sa cytotoxicité vis-à-vis de la cellule cible.³⁰⁶

Une étude évaluant l'efficacité de la thérapie anti-CD19 CAR-T appliquée à 24 patients atteints de LLC ayant déjà reçu de l'Ibrutinib a montré un taux de RG de 74% à 1 mois avec un taux de RC de 21% et 88% de MRD indétectable dans la moelle en cytométrie en flux. Parmi 12 patients ayant subi un séquençage IGH, 7 étaient en rémission complète moléculaire (absence de séquence IGH maligne dans la moelle) avec une SSP à 100%. Par ailleurs, un syndrome de relargage cytokinique a été observé chez 83% patients et une neurotoxicité chez 33% des patients. Bien que ces résultats soient encourageants, l'utilisation des CAR-T Cells dans la LLC n'est pas encore indiquée pour la LLC récidivante, mais les résultats de cette étude montrent une grande efficacité chez les patients à haut risque, après l'échec d'un traitement par Ibrutinib.³⁰⁷

Modulation des cellules NK

D'autres anticorps monoclonaux ont été développés afin d'améliorer les réponses antitumorales des cellules NK, chez les patients LLC. En effet, les cellules NK jouent un rôle important dans le contrôle de la maladie et des études ont montré que le nombre de cellules NK est prédictif de la progression de la maladie dans la LLC nouvellement diagnostiquée.³⁰⁸ Les cellules NK, bien que fonctionnellement compétentes, semblent exercer une faible cytotoxicité contre les cellules de LLC.³⁰⁹

Le **Lirilumab** est un anticorps anti-KIR2D. Les KIR sont des récepteurs activateurs et inhibiteurs de points de contrôle qui empêchent l'activation des cellules NK lors de leur liaison avec leur ligand. Des études de transplantation de cellules souches suggèrent qu'en l'absence d'interactions KIR, avec les molécules de CMH de classe I, les cellules NK alloréactives peuvent éradiquer la leucémie résiduelle.³¹⁰ Ainsi le Lirilumab, en bloquant l'interaction du récepteur KIR avec son ligand permettrait un meilleur contrôle tumoral par les cellules NK. Cette molécule a récemment été testée dans des études de phase 2, en association au Rituximab chez les patients LLC en rechute/réfractaire ou non traités à haut risque (NCT02481297). C'est également le cas du **Monalizumab**, un anticorps monoclonal humanisé anti-NKG2A. Il a une activité purement bloquante dirigée contre la sous-unité NKG2A du récepteur CD94/NKG2A exprimé par les cellules NK et les cellules T cytotoxiques. Le ligand naturel de CD94/NKG2A est HLA-E, une molécule CMH de classe I non classique, qui est surexprimée par les cellules B de la LLC. La liaison de HLA-E à son récepteur induit des signaux inhibiteurs qui suppriment la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité directe des cellules immunitaires effectrices, ce mécanisme jouant un rôle important dans l'échappement immunitaire des cellules tumorales. Le Monalizumab présente une activité préclinique prometteuse pour améliorer l'activité des cellules NK en bloquant spécifiquement l'interaction NKG2A/HLA-E chez les patients atteints de LLC.³¹¹ Le Monalizumab est testé en association avec l'Ibrutinib dans un essai de phases 1 et 2 chez des patients en rechute/réfractaire ou encore non traités (NCT02557516) (cf. tableau 37).

Molécule	Cible	Phase	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Monalizumab (IPH2201)	NKG2A	1/2	NCT02557516	Monalizumab + Ibrutinib chez patients LLC R/R ou non traitées auparavant	/
Lirilumab	KIR 2D	2	NCT02481297	Lirilumab + Rituximab chez patients LLC R/R ou à haut risque	/

Tableau 37 : Synthèse des essais cliniques du Monalizumab et du Lirilumab.

CD200

Le CD200 est une glycoprotéine membranaire appartenant à la superfamille des Ig immunorégulatrices qui atténuent les réponses immunitaires excessives et maintient l'auto-tolérance. En effet, la liaison du CD200 à son récepteur confère un signal immunosuppresseur, inhibant puissamment les réponses immunitaires des lymphocytes T et NK et déclenchant une expansion régulatrice des cellules T (Treg).³¹² Ainsi la surexpression de points de contrôle immunitaires sur les cellules tumorales, immunitaires et stromales dans le microenvironnement tumoral, tels que :

- le CD200,
- l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) et
- l'antigène de mort programmée 1 (PD-1),

est à l'origine d'une modulation de la réponse immunitaire.

Ces points de contrôles représentent donc des cibles thérapeutiques intéressantes dans les cancers.³¹³

Le **Samalizumab** est un anticorps monoclonal recombinant humanisé ciblant le CD200. Une étude de phase 1 a montré un bon profil d'innocuité de cette molécule ainsi qu'une réduction de la charge tumorale chez une majorité de patients atteints de LLC avancée (tableau 38).³¹⁴

Molécule	Phase	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Samalizumab	1	NCT00648739 Mahadevan <i>et al.</i> ³¹⁴	Monothérapie dans la LLC R/R	DCT : 67% RP : 5% MS : 76%

Tableau 38 : Synthèse des essais cliniques du Samalizumab.

Anti CD32b

Le récepteur Fc gamma inhibiteur (FcγR) IIB (ou CD32b) est exprimé par de nombreuses cellules du système immunitaire et régule négativement l'immunité innée et adaptative via l'action de complexes immuns. En effet il a été démontré que l'expression de FcγRIIB sur les cellules effectrices conduit à la suppression de leur potentiel phagocytaire et cytotoxique *in vivo*.³¹⁵ Le CD32b est également exprimé à la surface des cellules leucémiques et lymphomateuses de la lignée B. De plus, il semblerait qu'une forte expression de FcγRIIB sur

les cellules tumorales cibles entrainerait une l’internalisation des anticorps monoclonaux, tels que le Rituximab ou l’Alemtuzumab, à la surface des cellules tumorales B et serait donc à l’origine de résistances à ces thérapies ciblées.³¹⁶

BI-1206 est un anticorps anti Fc γ RIIB (CD32B) entièrement humain, testé dans des essais de phase 1 et 2, qui améliore l’activité apoptotique et permettrait également de surmonter les résistances aux traitements par anti-CD20 (NCT02933320) (cf.tableau 39).

Molécule	Phase	Référence/ Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
Bi-1206	1 / 2	NCT02933320	Monothérapie chez patients R/R	En cours

Tableau 39 : Synthèse des essais cliniques d’un anti CD32b.

De plus, dans une étude phénotypique, basée sur l’identification des combinaisons thérapeutiques efficaces anticorps-cible appliquée sur des cellules de LLC, il a été mis en évidence que le CD32, le CD200 et l’HLA-DR sont les cibles les plus puissantes pour le traitement par anticorps agissant par Mort Cellulaire Programmée (PCD : Programmed Cell Death) et ADCC.³¹⁷

Agonistes du TLR

Les TLR (Toll Like Receptor) sont des récepteurs appartenant à un système de reconnaissance des pathogènes pour la défense de l’hôte dans l’immunité innée et adaptative.

La LLC peut être particulièrement sensible aux agonistes TLR. En effet, les cellules de LLC sont sensibles aux réponses immunitaires médiés par les lymphocytes T et sont associées à une forte expression de plusieurs TLRs, en particulier TLR-7 et TLR-9. Les voies de signalisation peuvent être activées directement dans les cellules LLC par les agonistes TLR-7 et TLR-9, qui conduisent à la production de cytokines et de molécules costimulatrices, rendant les cellules tumorales plus sensibles aux lymphocytes T cytotoxiques et NK (Natural Killer) ainsi qu’aux immunotoxines et aux agents cytotoxiques. Des études suggèrent que les agonistes TLR, utilisés comme adjuvant, améliore l’efficacité des chimiothérapies et immunothérapies dans la LLC.³¹⁸ Ainsi une stratégie thérapeutique ciblant le TLR-9 des cellules de LLC avec des oligodésoxynucléotides CPG de type B a été développé avec **CPG 7909**³¹⁹ et **GNKG168** testés dans des essais cliniques de phase 1 chez les patients atteints de LLC, en rechute ou

réfractaire³²⁰. Des agonistes du TLR-7 ont également montré leur efficacité *in vitro*, tel que l'Imidazoquinoléine **852A**, qui a une forte action locale contre les cellules de la LLC ³²¹. Les agonistes TLR-7 augmentent l'expression du composant IL-2R (récepteur à l'IL-2 ou CD25) de haute affinité, conduisant à une sensibilisation à la signalisation IL-2 des cellules de LLC. C'est pourquoi, on observe une synergie d'action lors d'un traitement combinant à la fois un agoniste IL-2 et un agoniste TLR-7.³²²

Cependant dans les essais cliniques, ces agonistes du TLR n'ont pas montré de réponse clinique significative comme indiqué dans le tableau 40 :

Molécule	Cibles	Phase	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
CPG7909	Agoniste TLR 9	1	NCT00233506 <i>Zent et al.</i> ³¹⁹	Monothérapie dans la LLC jamais traités	Aucune réponse clinique
GNKG168		1	NCT00233506	Monothérapie dans la LLC R/R	/
852A	Agoniste TLR 7	2	NCT00276159 <i>Spaner et al.</i> ³²¹	Monothérapie dans diverses hémopathies malignes	Aucune réponse clinique dans la LLC

Tableau 40 : Synthèse des essais cliniques des agonistes du TLR

Cytokines

Les cellules de LLC expriment dans la plupart des cas, le CD25, un composant du récepteur de l'IL2. Le **Denileukine Diftitox** (ONTAK) est une protéine de fusion du domaine enzymatique actif de la toxine diphtérique avec l'IL-2. Une étude de phase 2 étudie une stratégie de thérapie cellulaire consistant à un conditionnement lympho-dépléteur suivi d'une perfusion de cellules NK et d'IL-2 (ONTAK) pour les patients atteints de tumeurs malignes lymphoïdes réfractaires, associé à une chimiothérapie par RFC. (NCT01181258). **L'anti-Tac (Fv)-PE38 (LMB-2)** est une immunotoxine recombinante composé d'une forme tronquée d'endotoxine de *Pseudomonas* et d'un anticorps monoclonal génétiquement modifié qui se lie aux cellules cancéreuses possédant le CD25 à leur surface (anti-CD25). Cette molécule a été testée dans une étude clinique de phase 2 sur des patients réfractaires à la chimiothérapie. (NCT00077922). Une étude de phase 1 actuellement en cours, évalue l'efficacité de l'association de

l'Obinutuzumab et d'une interleukine recombinante 15 (**RhIL-15**). En effet, l'IL-15 est une cytokine stimulante qui favorise la différenciation et l'activation des cellules NK et des monocytes et son association à l'Obinutuzumab permettrait de potentialiser la cytotoxicité cellulaire de l'Obinutuzumab. (NCT03759184) (cf. tableau 41).

Molécule	Cibles	Phase	Référence/Identifiant Clinical.gov	Etude	Résultats
ONTAK	IL-2	2	NCT01181258	Chimiothérapie lymphodéplétrice avec Rituximab + Cells allogéniques NK + ONTAK dans diverses tumeurs malignes lymphoïdes réfractaires	/
LBM2	IL-2	2	NCT00077922	Monothérapie dans la LLC	/
RhIL-15	IL-15	1	NCT03759184	rhIL-15 + Obinutuzumab dans la LLC R/R	En cours

Tableau 41 : Synthèse des essais cliniques d'interleukines recombinantes

Ainsi, un très grand nombre de molécules agissant sur des cibles directement liées aux mécanismes physiopathologique de la LLC, ont été étudiées et certaines sont actuellement en cours d'essai clinique. Toutes ces données de la littérature laissent présager que les stratégies thérapeutiques vont encore évoluer dans la prise en charge de la LLC. L'arrêt de l'expansion clonale et l'induction de la mort cellulaire grâce à l'association de thérapies ciblées complémentaires permettra d'obtenir une réponse profonde et durable.

Parmi les nouvelles cibles potentielles faisant l'objet d'un développement thérapeutique, le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire fait actuellement l'objet d'un essai clinique au CHU de la Conception dans lequel je me suis impliqué. Ce nouvel axe physiopathologique dans la LLC est développé dans la troisième partie de ce manuscrit.

III. Le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire

1. Stress oxydatif des cellules de la LLC

D'après de récentes publications, la prolifération des cellules de LLC serait également liée aux métabolismes rédox de la cellule. Une caractéristique notable des cellules LLC est leur stress intrinsèque élevé lié à une surproduction intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les dommages cellulaires induits via les ROS jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la cancérogénèse ainsi que dans la transformation maligne.³²³ En effet, les ROS sont impliqués dans la **péroroxydation des lipides membranaires** et la **production d'aldéhydes apoptogéniques**. Ainsi leur production accrue augmente l'instabilité génétique par leurs interactions avec l'ADN. Cela conduit à l'accumulation progressive de mutations génétiques au niveau des oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeurs.¹⁶⁷ Les cellules leucémiques sont de ce fait, plus dépendantes d'antioxydants cellulaires tels que le Glutathion Réduit (GSH) pour combattre ce stress oxydatif et maintenir l'équilibre rédox.^{324 325} Ainsi, les cellules stromales de la moelle osseuse convertissent la cystine en cystéine qui contribue à la synthèse de GSH, ce dernier aidant à protéger les cellules contre les dommages des radicaux libres. Des enzymes antioxydantes protectrices telles que la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx) permettent de lutter contre les effets destructeurs des ROS. (cf. Figure 20). Dans les lymphocytes de LLC, on retrouve une augmentation des taux de la base mutagène 8-oxo-2'-desoxyguanosine (8-oxo-dG), et de malondialdéhyde (MDA), qui sont des produits de la peroxydation lipidique. Parallèlement, on retrouve dans ces cellules, une diminution des enzymes antioxydantes protectrices ainsi qu'une augmentation du rapport glutathion oxydé/glutathion réduit (GSSG/GSH) (cf. Figure 20).

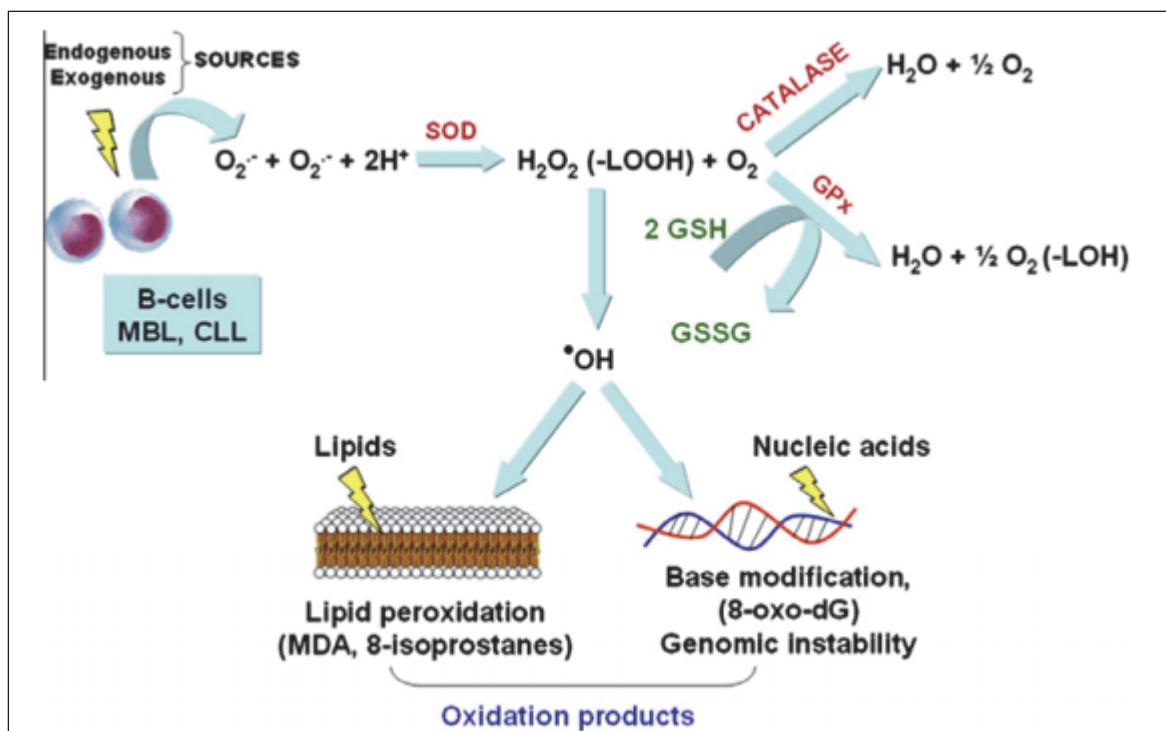


Figure 20 : La génération de ROS et d'enzymes antioxydantes impliquées dans la pathogénèse des MBL et LLC d'après Collado et al., 2012¹⁶⁷

De plus, il a été démontré qu'il n'y a aucune différence dans le statut oxydatif entre les lymphocytes de la MBL et de la LLC, ce qui indique que des altérations du stress oxydant sont présentes dès la phase précoce de la maladie.¹⁶⁷ La production d'ions superoxyde et le stress oxydatif secondaire des cellules leucémiques sont à l'origine de l'apoptose accrue obtenue par les agents chimiotoxiques.³²⁶

Par ailleurs, la protéine p53 joue un rôle dans le maintien de l'intégrité mitochondriale et des fonctions métaboliques,³²⁷ et présente également une fonction antioxydante.³²⁸ Par conséquent, une perte de la fonction p53 dans les cellules LLC serait à l'origine d'un dysfonctionnement mitochondrial et d'une perturbation du métabolisme redox conduisant à une génération accrue de ROS et à une majoration du stress oxydatif.

Des études ont montré que l'isothiocyanate de phénéthyle (PEITC) induit une déplétion du glutathion (GSH) et donc une accumulation de ROS intracellulaire entraînant l'apoptose des cellules de LLC.³²⁹ La PEITC parvient à tuer efficacement les cellules mutées TP53 et/ou del(17p) présentant des résistances à la Fludarabine, même sous la protection des cellules stromales.

Cibler le stress oxydatif ROS pourrait constituer une stratégie thérapeutique pour agir préférentiellement sur les cellules LLC et notamment sur les cellules avec délétion et/ou mutation TP53.^{330, 331} Ainsi, le PEITC sensibilise de manière significative les cellules au

traitement et pourrait être intéressant pour surmonter la résistance aux médicaments médiée par le microenvironnement dans les cellules de LLC. Comme autre agent anticancéreux ciblant le potentiel d'oxydo-réduction de la cellule de LLC, on peut citer les inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDACI) qui ont un mode d'action plurifactoriel et déclenchent l'apoptose via la voie de signalisation apoptotique intrinsèque après la génération précoce de ROS dans les lignées cellulaires leucémiques.³³² L'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA) est un inhibiteur de l'histone désacétylase montrant une activité anti tumorale puissante mais les essais cliniques sur les HDACI en monothérapie chez les patients LLC ont montré une efficacité limitée, la sensibilité étant affectée par le microenvironnement de la leucémie *in vivo*.²⁸³

2. Le rôle de l'ALDH (Aldhyde Deshydrogénase) et ses principaux inhibiteurs

Les aldéhydes constituent un groupe de composés réactifs à potentiel cancérigène. La toxicité des aldéhydes se traduit par :

- une inactivation enzymatique,
- des dommages à l'ADN,
- une altération de l'homéostasie cellulaire et
- l'apoptose via la formation d'adduits covalents avec les protéines de l'ADN.

Ainsi, l'accumulation d'aldéhydes peut entraîner des dommages oxydatifs, la génération de ROS et la peroxydation lipidique entraînant une production supplémentaire d'aldéhydes.³³³

Parmi ces aldéhydes toxiques, on peut citer :

- le 4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE),
- le 4-hydroxy-2 hexéanal (4-HHE),
- l'acétaldéhyde,
- le malondialdéhyde (MDA) et
- l'acroléine.

Les ALDHs constituent une super famille d'enzymes dépendantes du NADP⁺ qui catalysent l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques moins toxiques et plus solubles (cf.Figure 21). De ce fait, les ALDH peuvent limiter le stress oxydatif, la formation d'adduits, les dommages cellulaires et l'apoptose induite par ces aldéhydes toxiques.³³⁴

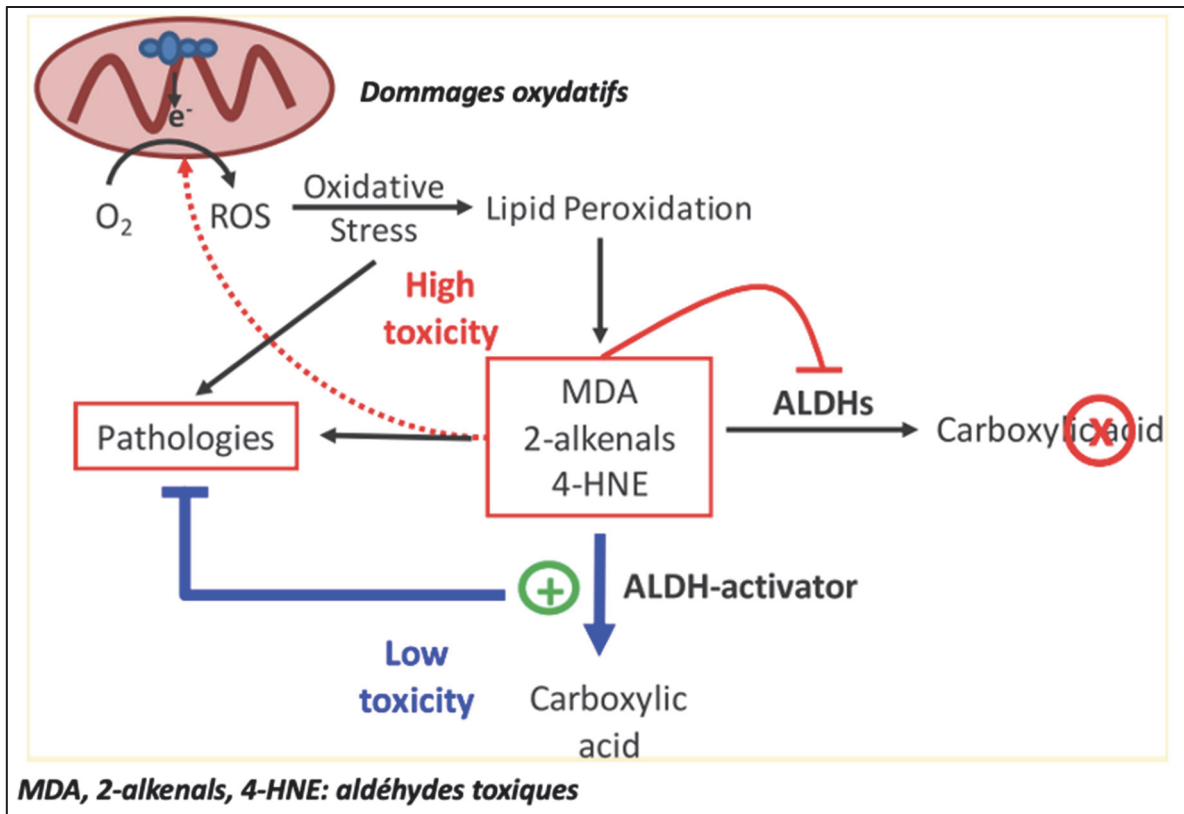


Figure 21 : Rôle de l'ALDH dans l'épuration des aldéhydes toxiques, adapté d'après Rodriguez-Zavala et al., 2019³³⁴

Les cellules physiologiques ont de faibles demandes métaboliques et la surexpression des ALDH n'est pas nécessaire pour la détoxification. En revanche, les cellules cancéreuses ont des dommages oxydatifs plus élevés entraînant une augmentation des ROS et une accumulation d'aldéhydes toxiques. Du fait du faible niveau d'expression d'ALDHs, les cellules rentrent en apoptose. Cependant, les cellules cancéreuses notamment celles avec un phénotype semblable aux cellules souches, ont souvent une surexpression d'ALDHs, conduisant à une diminution des dommages oxydatifs et donc à une résistance à l'apoptose.¹⁶⁸ L'activité de l'ALDH dans les cellules cancéreuses est probablement une combinaison d'isoformes multiples selon le type de cancer³³⁵. La **famille ALDH1A et 3A1**, en particulier, jouent un rôle primordial dans la progression du cancer et leur surexpression est associée à un pronostic défavorable.³³⁶ Les ALDHs sont fortement exprimées dans les sous populations de cellules résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie dans de nombreux types de cancers. Ainsi, les ALDHs fournissent un avantage de survie aux cellules cancéreuses conduisant à la **progression du cancer et à la résistance au traitement**. Par exemple, l'ALDH1A1 et 3A1 métabolisent directement les formes actives des molécules à base d'oxazophosphorine, ce qui entraîne une résistance à ces agents.³³⁷ De plus, la surexpression d'ALDH peut également **altérer**

l'immunité tumorale. Par exemple, la famille ALDH1A convertit la rétine en acide rétinoïque favorisant l'induction et la stabilité des lymphocytes T régulateurs (Treg) infiltrant la tumeur.³³⁸ Par ailleurs, les antioxydants telles que les ALDHs réduisent le stress du réticulum endoplasmique et l'accumulation de ROS normalement responsable de l'activation de la mort cellulaire immunogène.³³⁹ Par conséquent, le développement d'inhibiteurs de l'ALDH peut être l'approche la plus directe pour cibler ces populations cellulaires.

Les inhibiteurs d'ALDHs peuvent être classés :

- en inhibiteurs d'isoformes multi-ALDH et
- en inhibiteurs spécifiques d'isoformes.³⁴⁰

L'inhibition de plusieurs membres de la famille des ALDH peut être toxique et l'inhibition spécifique d'isoformes est souvent inefficace, limitant l'utilisation de ces agents. Il existe plusieurs inhibiteurs d'isoformes multi-ALDH comme le N,N-diéthylaminobenzaldehyde (DEAB), l'acide 4-diméthylamino-4-méthyl-pent-2-ynthioïque-S-méthylester (**DIMATE**), le citral, les inhibiteurs de l'aldéhyde déshydrogénase (Aldi-1-4 et Aldi-6) et la dyclonine. Les isoformes principalement ciblées par les inhibiteurs spécifiques sont ALDH1A1, 2 et 3A1. Les inhibiteurs d'ALDHs se sont révélés être synergiques avec plusieurs chimiothérapies conventionnelles, thérapies ciblées et radiothérapies pour à la fois inhiber la progression de la maladie et prévenir le développement de résistances.³³³

3. Le diméthyl ampal thiolester (DIMATE) dans la leucémie aiguë myéloïde

Le **Diméthyl ampal thiolester (DIMATE)**, qui est un ester aminothiols α,β , acétylénique N-substitué, est un inhibiteur actif, compétitif et irréversible des ALDHs 1 et 3. Il s'agit d'une molécule déjà étudiée en cancérologie solide comme par exemple dans le cancer de la prostate³⁴¹ mais également dans les hémopathies et notamment dans la leucémie myéloïde aiguë (LAM).³⁴²

En effet, le DIMATE a été étudié par Venton *et al*, chez des patients atteints de LAM ainsi que chez des souris immunodéfiantes, xénogreffées avec des cellules leucémiques humaines.³⁴² L'objectif de cette étude a été de lutter sélectivement contre les cellules souches de la leucémie, qui sont épargnées par les traitements actuellement existants, tels que la Cytarabine et les Antracyclines et donc responsables des rechutes. Le DIMATE a été évalué sur les sous populations leucémiques CD34+ CD38- présentant une activité ALDH+ en CMF.

Il a été démontré que le DIMATE, en inhibant l'ALDH, ciblait et éradiquait *in vitro* et *in vivo* les lignées cellulaires LAM en favorisant l'accumulation d'aldéhyde apoptogène. En effet, *in vitro*, le DIMATE éradique les cellules humaines de LAM, et les études *in vivo* sur la souris, ont montré une grande sélectivité des cellules souches leucémiques, contrairement à la chimiothérapie conventionnelle, tout en épargnant les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) saines. De plus, même à de fortes concentrations de traitement, le DIMATE présente une innocuité quasi-totale sur les CSH saines, qui après traitement, ont conservé leur capacité de différenciation multi-lignée. Par conséquent, l'effet cytostatique réversible du DIMATE sur les cellules normales et l'effet apoptotique irréversible sur les cellules cancéreuses font de cette molécule un médicament très prometteur dans les tumeurs malignes myéloïdes mais avec un intérêt dans les tumeurs malignes lymphoïdes car le DIMATE est également capable d'inhiber l'effet anti-apoptotique de Bcl-2.³⁴³

4. Nouvelle stratégie thérapeutique : Le diméthyl ampal thiolester (DIMATE) dans la LLC

Une nouvelle perspective de thérapie ciblée dans la LLC est actuellement en cours d'évaluation. Elle fait l'objet d'un essai clinique dans le service d'hématologie du professeur Costello à la Conception et cible le potentiel redox des cellules de LLC.

L'étude repose sur **les hypothèses** selon lesquelles le profil redox des lymphocytes B sains serait différent de celui des lymphocytes leucémiques chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et ce profil varierait en fonction des différents stades de la pathologie et en fonction des traitements reçus. L'expression différentielle de ces profils serait d'autant plus marquée chez les patients porteurs d'une del (17p) et/ou mutation *TP53*. *In vitro*, le DIMATE est capable d'éradiquer spécifiquement les cellules de LLC et d'épargner les cellules hématopoïétiques saines et ce dernier serait efficace sur les cellules de LLC avec del (17p) et/ou mutation *TP53* résistantes aux chimiothérapies conventionnelles.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer à travers les marquages ALDH1, 3 et ROS, le profil redox des lymphocytes B sains, des cellules de LLC conventionnelles ou porteuses d'une del (17p) et/ou mutation *TP53*.

Les objectifs secondaires consistent en l'évaluation, *in vitro*, du pouvoir cytotoxique spécifique du DIMATE et de sa capacité à éradiquer spécifiquement les cellules de LLC notamment porteuses d'une del (17p) et/ou mutation *TP53*.

Dans ce but, 40 patients seront inclus de manière prospective sur une période de 18 mois. Les patients signeront un consentement d'utilisation à des fins scientifiques de leurs prélèvements sanguins (1 Tube EDTA en plus).

Le traitement de ce prélèvement se déroulera en 2 étapes :

Tout d'abord **l'évaluation de l'expression** (exprimée en moyenne d'intensité de fluorescence) **des molécules ALDH 1, 3 et ROS par cytométrie en flux** fluosensible (CytoFlex*, Beckman Coulter) dans les lymphocytes sains et dans les lymphocytes de LLC identifiés par multimarquage CD19, CD20, CD5, CD200 et CD22. L'expression des marqueurs complémentaire CD71 et CD36 est également évaluée. Le CD71, récepteur à la transferrine, est dosé car le mécanisme de Dimate est lié à la ferroptose. L'intérêt de regarder le CD71 sur les cellules de LLC est de voir si les patients répondant au DIMATE, et donc potentiellement avec une ferroptose intense, ont une plus forte expression du CD71. Le CD36 est le récepteur aux acides gras. Or, les cellules tumorales utilisent la voie anaérobie et le Dimate bloque l'élimination des résidus de ce métabolisme conduisant ainsi à la mort cellulaire. L'intérêt est donc également d'évaluer si le CD36 est plus exprimé à la surface des cellules sensibles au DIMATE. Le but est de savoir si l'on peut prédire la sensibilité ou la résistance des cellules LLC au DIMATE par l'observation de l'expression de ces deux récepteurs.

Le protocole de cette technique est résumé dans le tableau 42 :

DIMATE LLC	Tube ROS+	Tube ROS -	TUBE ALDH 87/230+	TUBE ALDH Contrôle NEG	TUBE ALDH 13/173+
PE sang	100 µL				
Lyse	2ml de lyse maison, vortexer				
Incubation	10 min				
Centrifugation	5 min à 300g, éliminer le surnageant				
Marquage	* + 5µL CD71 APC + 5µL CD36 PB	* = 5µL CD45 KO/CD19 ECD/CD5 PC7			
Incubation	15 min à l'obscurité à T° ambiante				
Substrats	100 µL ROS SU + 300µL PBS	400µL PBS	50 µL ALDH 87 + 50 µL ALDH 230 + 300µL PBS	400µL PBS	50 µL ALDH 13 + 50 µL ALDH 173 + 300µL PBS
Incubation	30 min à 37°C à l'étuve présente en hémostomie				
Lecture	CytoFLEX S, session recherche, template DIMATE				

Tableau 42 : protocole de cytométrie en flux, du marquage cellulaire à l'acquisition sur Cytoflex

Dans un second temps, le **pouvoir cytotoxique du DIMATE est évalué *in vitro*** par mesure du pourcentage d'apoptose des lymphocytes B isolés et incubés en présence de concentrations croissances de DIMATE.

Actuellement les inclusions sont composées de 17 patients de tous les stades selon la classification de Binet (13 de stade A, 1 de stade B et 3 de stade C avec une médiane d'âge de 69 ans). Les résultats seront disponibles en 2021.

IV. Discussion

La LLC est une maladie très hétérogène sur le plan clinique, pronostique et moléculaire. Malgré le fait que la LLC soit encore aujourd'hui une maladie incurable, la prise en charge thérapeutique a considérablement évolué ces dernières années. A partir des années 1970 et pendant presque 30 ans, la chimiothérapie était le principal traitement possible de la LLC avec très souvent, une progression de la maladie dès la première année de traitement. Dans la fin des années 1990, le traitement de la LLC a connu une révolution avec l'utilisation d'une des premières thérapies ciblées, le Rituximab, associée à une augmentation significative de la survie globale des patients. Durant ces 20 dernières années, les progrès majeurs de la recherche ont permis de comprendre plus précisément les mécanismes moléculaires à l'origine de la pathogénèse de la LLC et la façon dont le microenvironnement influence la survie des cellules leucémiques. En effet, les mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans le développement de la maladie auraient des conséquences à la fois sur la modulation des signaux de survie, sur la stimulation antigénique du BCR ainsi que sur l'interaction des cellules leucémiques avec les cellules stromales du microenvironnement ganglionnaire, à l'origine d'une prolifération accrue et d'une résistance à l'apoptose des cellules malignes de la LLC.

La meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la LLC, détaillés dans ce travail de synthèse, a permis de mettre en évidence de nombreuses cibles thérapeutiques potentielles et ainsi de développer de nombreuses molécules interagissant avec les différentes voies de signalisations impliquées dans la maladie. La recherche de nouveaux traitements s'est orientée vers l'identification de thérapies ciblées, capables de détruire des cellules tumorales présentant une anomalie moléculaire spécifique, ouvrant les perspectives d'une médecine de précision dans le domaine de l'oncohématologie. L'objectif actuel du traitement de la LLC, reste encore de prolonger la survie du patient car la grande majorité des patients sont réfractaires ou évoluent encore vers la rechute. Cependant, les survies à 5 ans s'améliorent avec le temps, quelque soit la tranche d'âge analysée, passant pour la survie de l'homme de 74% pour la période 1989-1993 à 83% pour la période 2005-2010 et de 80% à 88% chez la femme pour ces mêmes périodes. Les dernières voies de signalisation ciblées laissent à penser que la LLC pourrait un jour être guérie. En effet des rémissions complètes avec MRD négative ont été retrouvées chez des patients LLC traités avec le Vénétoclax, même si celles-ci restent rares.

Hormis les quelques thérapies ciblées ayant l'AMM et utilisées en pratique dans le traitement de la LLC, principalement les BCRi (Ibrutinib et Idelalisib) et le Vénétoclax, de nombreuses molécules ont fait ou font actuellement l'objet d'essais cliniques dans la LLC. Dans mon travail de recueil de données, j'ai pu constater qu'un très grand nombre de thérapies ciblées ont été testées dans la LLC avec des mécanismes d'actions très variés. Cependant, tous n'ont pas donné de résultats prometteurs. En effet, après la réussite de l'anti-CD20, Rituximab, de nombreuses autres cibles ont été testées, avec des anticorps parfois de même isotype, IgG1. Cependant un succès bien moindre a pu être constaté pour le CD22, CD23, CD40 et CD74. De plus, dans la stratégie d'inhibition de la voie du BCR, après le succès des inhibiteurs de la BTK et de la PI3K, la kinase Lyn et SYK se sont avérés être des cibles moins prometteuses. Certaines stratégies thérapeutiques ont été de cibler directement l'expression génique de protéines en activant l'expression des protéines pro-apoptotiques et en inhibant celle des protéines antiapoptotiques. Dans cette stratégie également, toutes les cibles n'ont pas montré de résultats probants. Par exemple, l'oligonucléotide antisens qui cible l'ARNm Bcl-2, Oblimersens, n'a montré qu'une activité thérapeutique modérée. Il en est de même pour les inhibiteurs HDAC avec lesquels il n'a pas été mis en évidence de réponse clinique significative dans les différents essais. Cependant, d'autres cibles thérapeutiques se sont avérées plus efficaces, avec des premiers résultats encourageants, tels que le ciblage de la chimiokine CXCL12 par l'anticorps NOX-A12 ou encore l'inhibition de la kinase Akt par MK-2206. D'autres molécules sont actuellement en cours d'essais clinique ciblant différents acteurs de la prolifération tumorale. On peut citer l'inhibiteur du récepteur CCR7, JBH 492, l'inhibiteur du récepteur BAFF, VAY-736 testé en association à l'Ibrutinib, l'inhibiteur du récepteur ROR1, Cirmtuzumab, également testé en association à l'Ibrutinib, ou encore l'inhibiteur du miR155, le Cobomarsen, testé dans diverses hémopathies.

Dans les cibles thérapeutiques déjà exploitées, telles que la BTK ou la PI3K, le développement de nouvelles molécules plus sélectives, plus efficaces ou moins toxiques que leur chef de file, ne cesse de croître. En effet, après le succès de l'Ibrutinib, de nombreuses autres molécules ont été développées, certaines plus sélectives telles que l'Acalabrutinib. Il en est de même avec les inhibiteurs de la PI3K dont le nombre de molécules testées ne fait qu'augmenter, ces derniers ciblant différentes sous-unités de la PI3K afin de moduler l'efficacité. Par ailleurs, après le succès du Vénétoclax, un nouvel inhibiteur de Bcl-2 de la famille des BH3 mimétiques est actuellement en cours d'évaluation plus sélectif et plus puissant avec une moindre toxicité plaquettaire.

Grâce aux publications récentes du métabolisme redox des cellules de LLC, une cible encore différente a été testée dernièrement avec le développement du DIMATE. En effet, cette molécule cible le stress oxydatif des cellules de LLC et plus précisément inhibe les ALDH 1 et 3, empêchant l'épuration des aldéhydes toxiques générés dans les cellules de LLC et favorisant leur apoptose. Des résultats encourageants ont été retrouvés dans la LAM et les essais pré-cliniques de cet inhibiteur dans la LLC sont actuellement en cours. Le Dimate serait capable d'éradiquer spécifiquement les cellules de LLC avec del (17p) et/ou mutation *TP53*.

Comme autre perspective de ciblage du métabolisme redox de la cellule de LLC, on peut citer BAY87-2243, un inhibiteur de HIF-1 α , testé actuellement dans une étude pré clinique. Cette molécule agit en inhibant l'activité du complexe mitochondrial I et la production d'espèces réactives de l'oxygène induite par l'hypoxie, permettant une baisse du taux de HIF-1 α . Par inhibition de l'expression du gène HIF-1 α , BAY87-2243 déclenche la mort cellulaire des cellules de LLC in vitro, quel que soit le statut mutationnel du TP53 avec des taux plus élevées d'apoptose lors de l'association à l'Ibrutinib.¹⁵⁸

Certaines de ces nouvelles thérapies ciblées pourraient être utilisées en association avec des molécules déjà hautement efficaces, afin d'augmenter le nombre de réponse complète par le biais d'un mécanisme d'action différent mais complémentaire. L'immense panel de cibles thérapeutiques existantes dans la LLC offre un grand nombre de possibilités de combinaison.

A l'ère de la médecine personnalisée, les défis pour le traitement des patients atteints de LLC impliquent de faire correspondre correctement les thérapies choisies à la cellule tumorale caractéristique de chaque individu. Les biomarqueurs prédictifs recommandés par les directives et qui devraient être systématiquement appliqués dans la pratique clinique pour l'adaptation du traitement sont : le statut mutationnel IGVH qui prédit une rémission durable après traitement par RFC et la mutation TP53 qui prédit la résistance à l'immunochimiothérapie et représente une indication pour les agents ciblés (Ibrutinib ou Idélalisib plus Rituximab). Par ailleurs, la mutation NOTCH1, qui s'associe à des résistances aux anticorps monoclonaux anti-CD20 et les caryotypes complexes, mutations BTK et PLC γ 2 qui s'associent à la résistance à l'Ibrutinib, pourraient représenter de nouveaux biomarqueurs prédictifs. Les BCRi utilisés lors de la présence d'anomalies TP53, ne permettent pas de rémissions de longue durée car les mutations TP53 prédisposent au développement d'un caryotype complexe, qui à son tour marque une instabilité génétique et favorise l'accumulation de mutations de résistance. Enfin, d'autres mutations telles que la mutation SF3B1, ne représentent pas un biomarqueur prédictif pour

l'adaptation du traitement mais peuvent potentiellement aider à affiner le pronostic de la rechute du traitement.

De plus, l'ensemble des thérapies ciblées nécessite l'expression de leur cible sur les cellules leucémiques. Par exemple, comme décrit dans la 3^{ème} partie de la thèse, l'expression des cibles du DIMATE, c'est-à-dire l'expression d'ALDH et de ROS, doit être évaluée par CMF avant l'évaluation du pouvoir cytotoxique de cette molécule. Ainsi, l'utilisation de chaque thérapie ciblée nécessite des tests biologiques en amont, qui seront déterminants pour le choix de la stratégie thérapeutique. Ce choix sera fait en fonction de l'expression de certains marqueurs, déterminée par cytométrie en flux, et de l'absence ou la présence de certaines mutations, déterminée par biologie moléculaire. D'autres tests biologiques pourraient être réalisés avant la mise sous thérapie ciblée afin de s'engager davantage vers une médecine prédictive, tels que des tests de résistance à l'apoptose, afin de juger de l'efficacité de l'utilisation d'inducteurs de l'apoptose. Ceci met en évidence le rôle clé du biologiste dans l'orientation de la stratégie thérapeutique pour le clinicien.

Ainsi, en moins de 10 ans, l'importante avancée dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la LLC et les nouvelles approches thérapeutiques développées révèlent la possibilité d'une médecine stratifiée, de précision dite médecine personnalisée, qui ne peut être efficace que par le biais de l'utilisation de tests biologiques en amont du choix de la thérapie ciblée. L'amélioration de la caractérisation moléculaire de la cellule maligne responsable du développement de la LLC permettra de mieux individualiser les sous entités qui sont à l'heure actuelle encore responsables d'une hétérogénéité en termes de pronostic. En constituant des sous groupes plus homogènes, l'harmonisation des pratiques dans la stratégie thérapeutique et dans son monitoring sera simplifiée.

Bibliographie

1. Hallek, M. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* **111**, 5446–5456 (2008).
2. Hallek, M. *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* **131**, 2745–2760 (2018).
3. Matutes, E., Owusu-Ankomah, K. & Morilla, R. The immunological profile of B-Cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. (1994).
4. Matutes, E., Elisabeth, J. & Moreau, M. Improvement of the Chronic Lymphocytic Leukemia Scoring System With the Monoclonal Antibody SN8 (CD79b). (1997).
5. Santos, F. P. S. & O’Brien, S. Small Lymphocytic Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Are They the Same Disease? *The Cancer Journal* **18**, 396–403 (2012).
6. Rawstron, A. C. *et al.* Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **359**, 575–583 (2008).
7. Landgren, O. *et al.* B-Cell Clones as Early Markers for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **360**, 659–667 (2009).
8. Le Guyader-Peyrou, S. *et al.* Cancer incidence in France over the 1980–2012 period: Hematological malignancies. *Revue d’Épidémiologie et de Santé Publique* **64**, 103–112 (2016).
9. Aurrant, T. *et al.* 2012 SFH Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Hématologie* **19**, 4–9 (2013).
10. Kristinsson, S. Y. *et al.* Improved survival in chronic lymphocytic leukemia in the past decade: a population-based study including 11,179 patients diagnosed between 1973–2003 in Sweden. *Haematologica* **94**, 1259–1265 (2009).
11. Catovsky, D., Wade, R. & Else, M. The clinical significance of patients’ sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **99**, 1088–1094 (2014).
12. Monnereau, A. *et al.* Unbiased estimates of long-term net survival of hematological malignancy patients detailed by major subtypes in France. *Int. J. Cancer* **132**, 2378–2387 (2013).
13. Jacque, N. & Leblond, V. La leucémie lymphoïde chronique : mise au point. *La Presse Médicale* **48**, 807–815 (2019).
14. Yuille, M. R. *et al.* Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* **109**, 794–799 (2000).
15. Goldin, L. R., Pfeiffer, R. M., Li, X. & Hemminki, K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood* **104**, 1850–1854 (2004).

16. Cerhan, J. R. & Slager, S. L. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood* **126**, 2265–2273 (2015).
17. Rawstron, A. C. *et al.* Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* **100**, 2289–2290 (2002).
18. Binet, J. L., Auquier, A. & Dighiero, G. A New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia Derived from a Multivariate Survival Analysis. (1981).
19. Johansson, P. *et al.* Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* **34**, 892–898 (2010).
20. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *Journal of Clinical Pathology* **42**, 567–584 (1989).
21. Oscier, D. G. *et al.* Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *British Journal of Haematology* **98**, 934–939 (1997).
22. Criel, A. *et al.* Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *British Journal of Haematology* **97**, 383–391 (1997).
23. Oscier, D. *et al.* The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol* **174**, 767–775 (2016).
24. Rawstron, A. C. *et al.* Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project: ERIC/ESCCA Consensus: Reproducible CLL diagnosis by flow cytometry. *Cytometry* **94**, 121–128 (2018).
25. Sandes, A. F. *et al.* CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry: CD200 Role in the Diagnosis of B-Cell Neoplasms. *Cytometry* n/a-n/a (2013) doi:10.1002/cytob.21128.
26. Fukuda, T. *et al.* Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3047–3052 (2008).
27. Visco, C. *et al.* Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia: Autoimmune Cytopenias in CLL. *Am. J. Hematol.* **89**, 1055–1062 (2014).
28. Tsang, M. & Parikh, S. A. A Concise Review of Autoimmune Cytopenias in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* **12**, 29–38 (2017).
29. Weiss, R. B., Freiman, J., Kweder, S. L., Diehl, L. F. & Byrd, J. C. Hemolytic anemia after fludarabine therapy for chronic lymphocytic leukemia. *JCO* **16**, 1885–1889 (1998).
30. Reda, G. *et al.* Low-dose alemtuzumab-associated immune thrombocytopenia in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* **87**, 936–937 (2012).
31. Forconi, F. & Moss, P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood* **126**, 573–581 (2015).

32. Kipps, T. J. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 16096 (2017).
33. A Randomized, Controlled Clinical Trial Cooperative Group for the Study of Immunoglobulin in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Intravenous Immunoglobulin for the Prevention of Infection in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **319**, 902–907 (1988).
34. Dhalla, F. *et al.* Antibody Deficiency Secondary to Chronic Lymphocytic Leukemia: Should Patients be Treated with Prophylactic Replacement Immunoglobulin? *J Clin Immunol* **34**, 277–282 (2014).
35. Rossi, D., Spina, V. & Gaidano, G. Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood* **131**, 2761–2772 (2018).
36. Rossi, D. & Gaidano, G. Richter syndrome: pathogenesis and management. *Seminars in Oncology* **43**, 311–319 (2016).
37. Soilleux, E. J. *et al.* Diagnostic dilemmas of high-grade transformation (Richter’s syndrome) of chronic lymphocytic leukaemia: results of the phase II National Cancer Research Institute CHOP-OR clinical trial specialist haemato-pathology central review. *Histopathology* **69**, 1066–1076 (2016).
38. He, R., Ding, W. & Viswanatha, D. PD-1 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia and Large B-Cell Richter Transformation (DLBCL-RT): A Distinguishing Feature for DLBCL-RT and Promising Surrogate Marker for Clonal Relatedness. (2017).
39. Mao, Z. *et al.* IgVH Mutational Status and Clonality Analysis of Richter’s Transformation: Diffuse Large B-cell Lymphoma and Hodgkin Lymphoma in Association With B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) Represent 2 Different Pathways of Disease Evolution. *The American Journal of Surgical Pathology* **31**, 1605–1614 (2007).
40. Xiao, W. *et al.* Hodgkin lymphoma variant of Richter transformation: morphology, Epstein-Barr virus status, clonality, and survival analysis—with comparison to Hodgkin-like lesion. *Human Pathology* **55**, 108–116 (2016).
41. Hisada, M. Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 1979–1981 (2001).
42. Morton, L. M. *et al.* Second Malignancy Risks After Non-Hodgkin’s Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Differences by Lymphoma Subtype. *JCO* **28**, 4935–4944 (2010).
43. Scarfò, L., Ferreri, A. J. M. & Ghia, P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **104**, 169–182 (2016).
44. Hallek, M. *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* **131**, 2745–2760 (2018).
45. Döhner, H. *et al.* Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **343**, 1910–1916 (2000).
46. Ibbotson, R. *et al.* Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant. *Leukemia* **26**, 170–172 (2012).
47. Baliakas, P. *et al.* Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: A systematic reappraisal of classic cytogenetic data: Translocations and karyotype complexity in CLL. *Am. J. Hematol.* **89**, 249–255 (2014).

48. for the European Research Initiative on CLL (ERIC) *et al.* TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* **24**, 2072–2079 (2010).
49. Tam, C. S. *et al.* De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* **114**, 957–964 (2009).
50. Delgado, J. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results: 17p- CLL. *Br J Haematol* **157**, 67–74 (2012).
51. Zenz, T. *et al.* Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* **112**, 3322–3329 (2008).
52. Zenz, T. *et al.* TP53 Mutation and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* **28**, 4473–4479 (2010).
53. Rossi, D. *et al.* Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **123**, 2139–2147 (2014).
54. Cavallari, M. *et al.* Biological significance and prognostic/predictive impact of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **9**, (2018).
55. Haferlach, C., Dicker, F., Schnittger, S., Kern, W. & Haferlach, T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVH status and immunophenotyping. *Leukemia* **21**, 2442–2451 (2007).
56. Ouillette, P. *et al.* Aggressive Chronic Lymphocytic Leukemia with Elevated Genomic Complexity Is Associated with Multiple Gene Defects in the Response to DNA Double-Strand Breaks. *Clinical Cancer Research* **16**, 835–847 (2010).
57. Hamblin, J., Terry, J. & Davis, Z. Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. (1999).
58. Damle, N., Daniel Budman, & Klaus Dittmar. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. (1999).
59. Trbusek, M. *et al.* Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia* **20**, 1159–1161 (2006).
60. Kröber, A. & Seiler, T. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. (2002).
61. Tobin, G. *et al.* Somatically mutated Ig VH3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **99**, 2262–2264 (2002).
62. Deaglio, S., Mehta, K. & Malavasi, F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leukemia Research* **25**, 1–12 (2001).
63. Ibrahim, S. *et al.* CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 181–186 (2001).
64. Gentile, M. *et al.* The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience. *Br J Haematol* **130**, 549–557 (2005).

65. Crespo, M. *et al.* ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **348**, 1764–1775 (2003).
66. Bulian, P. *et al.* CD49d Is the Strongest Flow Cytometry–Based Predictor of Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* **32**, 897–904 (2014).
67. Sagatys, E. M. & Zhang, L. Clinical and Laboratory Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Control* **19**, 18–25 (2012).
68. Gentile, M. *et al.* Predictive value of 2-microglobulin (2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica* **94**, 887–888 (2009).
69. Simonsson, B., Wibell, L. & Nilsson, K. β 2-Microglobulin in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Scandinavian Journal of Haematology* **24**, 174–180 (2009).
70. Delgado, J. *et al.* Beta 2 -microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *British Journal of Haematology* **145**, 801–805 (2009).
71. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology* **17**, 779–790 (2016).
72. Ellims, P. H., Gan, T. E. & Van der Weyden, M. B. Thymidine kinase isoenzymes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **49**, 479–481 (1981).
73. Magnac, C. *et al.* Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* **17**, 133–137 (2003).
74. Xu, W. *et al.* Serum thymidine kinase 1 concentration in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia and its correlation with other prognostic factors. *Int J Hematol* **90**, 205–211 (2009).
75. Szánthó, E. *et al.* Serum Thymidine Kinase Activity: Analytical Performance, Age-Related Reference Ranges and Validation in Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE* **9**, e91647 (2014).
76. Molica, S., Levato, D., Cascavilla, N., Levato, L. & Musto, P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and β 2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Haematology* **62**, 117–122 (2009).
77. Sarfati, M., Chevret, S. & Chastang, C. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. (1996).
78. Grelier, A., Garff-Tavernier, M. L., Nauwelaers, F., Sarfati, M. & Merle-Beral, H. Soluble CD23 measurement by CBA: A convenient and reliable quantification method in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry* n/a-n/a (2013) doi:10.1002/cytob.21135.
79. Molica, S. & Alberti, A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. (1987).
80. Montserrat, E., Sanchez-Bisono, J., Viñolas, N. & Rozman, C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* **62**, 567–575 (1986).
81. Rai, K. R., Sawitsky, A. & Cronkite, E. P. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. (1975).

82. Rossi, D. *et al.* Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 1403–1412 (2013).
83. Gentile, M. *et al.* Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood* **128**, 2093–2095 (2016).
84. da Cunha-Bang, C., Christiansen, I. & Niemann, C. U. The CLL-IPI applied in a population-based cohort. *Blood* **128**, 2181–2183 (2016).
85. Parikh, S. A. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. *Blood Cancer Journal* **8**, 93 (2018).
86. Dighiero, G. *et al.* Chlorambucil in Indolent Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **338**, 1506–1514 (1998).
87. Chemotherapeutic Options in Chronic Lymphocytic Leukemia: a Meta-analysis of the Randomized Trials. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 861–868 (1999).
88. Extermann, M., Overcash, J., Lyman, G. H., Parr, J. & Balducci, L. Comorbidity and functional status are independent in older cancer patients. *JCO* **16**, 1582–1587 (1998).
89. Gay, N. D., Kozin, E., Okada, C., Danilov, A. V. & Spurgeon, S. Obinutuzumab monotherapy in previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **59**, 2258–2260 (2018).
90. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* **94**, 1266–1287 (2019).
91. Cheson, B. D. *et al.* Novel Targeted Agents and the Need to Refine Clinical End Points in Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* **30**, 2820–2822 (2012).
92. Rawstron, A. C. *et al.* International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* **21**, 956–964 (2007).
93. on behalf of ERIC (European Research Initiative on CLL) *et al.* A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia* **30**, 929–936 (2016).
94. Thompson, P. A. & Wierda, W. G. Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: working toward cure for patients with CLL. *Blood* **127**, 279–286 (2016).
95. Del Giudice, I. *et al.* Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia: A New Goal? *Front. Oncol.* **9**, 689 (2019).
96. on behalf of the European Research Initiative in CLL (ERIC) *et al.* Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia* **27**, 142–149 (2013).
97. Gauthier, M., Comont, T., Vergez, F. & Ysebaert, L. Maladie résiduelle minime dans la leucémie lymphoïde chronique : un enjeu restant d’actualité. *Bulletin du Cancer* **105**, 1042–1051 (2018).
98. on behalf of the German CLL study group *et al.* Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. *Leukemia* **23**, 2007–2017 (2009).

99. Raponi, S. *et al.* Minimal residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia patients. A comparative analysis of flow cytometry and ASO IgH RQ-PCR. *Br J Haematol* **166**, 360–368 (2014).
100. Logan, A. C. *et al.* High-throughput VDJ sequencing for quantification of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia and immune reconstitution assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 21194–21199 (2011).
101. Fürstenau, M., De Silva, N., Eichhorst, B. & Hallek, M. Minimal Residual Disease Assessment in CLL: Ready for Use in Clinical Routine? *HemaSphere* **3**, e287 (2019).
102. Kwok, M. *et al.* Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. *Blood* **128**, 2770–2773 (2016).
103. Kovacs, G. *et al.* Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *JCO* **34**, 3758–3765 (2016).
104. Strati, P. *et al.* Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood* **123**, 3727–3732 (2014).
105. Krämer, I. *et al.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk CLL: 10-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood* **130**, 1477–1480 (2017).
106. Dreger, P. *et al.* TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood* **121**, 3284–3288 (2013).
107. Khouri, I. F. *et al.* Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: Long-term follow-up, prognostic factors, and effect of human leukocyte histocompatibility antigen subtype on outcome. *Cancer* **117**, 4679–4688 (2011).
108. Schetelig, J. *et al.* Evidence of a Graft-Versus-Leukemia Effect in Chronic Lymphocytic Leukemia After Reduced-Intensity Conditioning and Allogeneic Stem-Cell Transplantation: The Cooperative German Transplant Study Group. *JCO* **21**, 2747–2753 (2003).
109. Sorrow, M. L. *et al.* Five-Year Follow-Up of Patients With Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation After Nonmyeloablative Conditioning. *JCO* **26**, 4912–4920 (2008).
110. Michallet, M. *et al.* Rituximab, fludarabine, and total body irradiation as conditioning regimen before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for advanced chronic lymphocytic leukemia: Long-term prospective multicenter study. *Experimental Hematology* **41**, 127–133 (2013).
111. on behalf of the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT *et al.* Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* **21**, 12–17 (2007).
112. Dreger, P. *et al.* Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood* **124**, 3841–3849 (2014).
113. Link, C. S. *et al.* Durable responses to ibrutinib in patients with relapsed CLL after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* **51**, 793–798 (2016).

114. Dubovsky, J. A. *et al.* Ibrutinib treatment ameliorates murine chronic graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **124**, 4867–4876 (2014).
115. Nguyen-Khac, F., Borie, C., Callet-Bauchu, E., Eclache, V. & Struski, S. Cytogenetics in the management of chronic lymphocytic leukemia: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Annales de biologie clinique* **74**, 561–567 (2016).
116. M., J. R. Functions and epigenetic aspects of miR-15/16: Possible future cancer therapeutics. *Gene Reports* **12**, 149–164 (2018).
117. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 13944–13949 (2005).
118. Calin, G. A. *et al.* Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 15524–15529 (2002).
119. Klein, U. *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* **17**, 28–40 (2010).
120. Stilgenbauer, S. *et al.* Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 11837–11841 (1996).
121. Stankovic, T. *et al.* Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet* **353**, 26–29 (1999).
122. Kalla, C. *et al.* Analysis of 11q22–q23 deletion target genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: Evidence for a pathogenic role of NPAT, CUL5, and PPP2R1B. *European Journal of Cancer* **43**, 1328–1335 (2007).
123. Rose-Zerilli, M. J. J. *et al.* ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica* **99**, 736–742 (2014).
124. Dierlamm, J. *et al.* Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic implications. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **94**, 27–35 (1997).
125. Muller, P. A. J. & Vousden, K. H. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* **25**, 304–317 (2014).
126. Puente, X. S. *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **475**, 101–105 (2011).
127. Wang, L. *et al.* SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **365**, 2497–2506 (2011).
128. Pozzo, F. *et al.* NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. *Leukemia* **30**, 182–189 (2016).
129. Quesada, V. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* **44**, 47–52 (2012).

130. D'Avola, A. *et al.* Global and MYC-Specific Translation Is Enhanced in Activated Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Carrying NOTCH1 C.7541_7542delct Mutations. *Blood* **128**, 970–970 (2016).
131. Ljungström, V. *et al.* Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations. *Blood* **127**, 1007–1016 (2016).
132. Puente, X. S. *et al.* Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **526**, 519–524 (2015).
133. Wang, L. *et al.* Somatic mutation as a mechanism of Wnt/ β -catenin pathway activation in CLL. *Blood* **124**, 1089–1098 (2014).
134. Amaya-Chanaga, C. I. & Rassenti, L. Z. Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **29**, 79–89 (2016).
135. Rossi, D. & Gaidano, G. The clinical implications of gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* **114**, 849–854 (2016).
136. Mansouri, L., Wierzbinska, J. A., Plass, C. & Rosenquist, R. Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biological impact. *Seminars in Cancer Biology* **51**, 1–11 (2018).
137. Oakes, C. C. *et al.* DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* **48**, 253–264 (2016).
138. Landau, D. A. *et al.* Locally Disordered Methylation Forms the Basis of Intratumor Methylome Variation in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* **26**, 813–825 (2014).
139. Oakes, C. C. *et al.* Evolution of DNA Methylation Is Linked to Genetic Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discovery* **4**, 348–361 (2014).
140. Bhoi, S. *et al.* Prognostic impact of epigenetic classification in chronic lymphocytic leukemia: The case of subset #2. *Epigenetics* **11**, 449–455 (2016).
141. Papakonstantinou, N. *et al.* The histone methyltransferase EZH2 as a novel prosurvival factor in clinically aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **7**, (2016).
142. Calin, G. A. *et al.* A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **353**, 1793–1801 (2005).
143. Balatti, V. *et al.* *TCL1* targeting *miR-3676* is codeleted with tumor protein p53 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 2169–2174 (2015).
144. Bichi, R. *et al.* Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted *TCL1* expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 6955–6960 (2002).
145. Cui, B. *et al.* MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **124**, 546–554 (2014).
146. Melchers, F. Checkpoints that control B cell development. *J. Clin. Invest.* **125**, 2203–2210 (2015).
147. Rickert, R. C. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol* **13**, 578–591 (2013).

148. Danilov, A. V. Targeted Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia: Past, Present, and Future. *Clinical Therapeutics* **35**, 1258–1270 (2013).
149. ten Hacken, E. & Burger, J. A. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1863**, 401–413 (2016).
150. Harwood, N. E. & Batista, F. D. The Cytoskeleton Coordinates the Early Events of B-cell Activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a002360–a002360 (2011).
151. Packham, G. *et al.* The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica* **99**, 1138–1148 (2014).
152. Herishanu, Y. *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563–574 (2011).
153. Quinquenel, A. & Cymbalista, F. Signalisation du BCR et rôle du microenvironnement dans la leucémie lymphoïde chronique. (2014).
154. Deglesne, P.-A. *et al.* Survival Response to B-Cell Receptor Ligation Is Restricted to Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Irrespective of Zap70 Expression. *Cancer Res* **66**, 7158–7166 (2006).
155. Le Roy, C. *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356–365 (2012).
156. Burger, J. A. & Gribben, J. G. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. *Seminars in Cancer Biology* **24**, 71–81 (2014).
157. Vlad, A. *et al.* Down-regulation of CXCR4 and CD62L in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Triggered by B-Cell Receptor Ligation and Associated with Progressive Disease. *Cancer Research* **69**, 6387–6395 (2009).
158. Griggio, V. *et al.* HIF-1 α is over-expressed in leukemic cells from *TP53* -disrupted patients and is a promising therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **105**, 1042–1054 (2020).
159. Seiffert, M. HIF-1 α : a potential treatment target in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **105**, 856–858 (2020).
160. Yokobori, S. Mitochondrial Neuroprotection in Traumatic Brain Injury: Rationale and Therapeutic Strategies. (2014).
161. Billard, C. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **5**, (2014).
162. Scarfò, L. & Ghia, P. Reprogramming cell death: BCL2 family inhibition in hematological malignancies. *Immunology Letters* **155**, 36–39 (2013).
163. Faderl, S. *et al.* Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* **16**, 1045–1052 (2002).
164. Packham, G. & Stevenson, F. K. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* **114**, 441–449 (2005).

165. Hanada, M. & Delia, D. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. (1993).
166. Del Principe, M. I. *et al.* Clinical significance of bax/bcl-2 ratio in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **101**, 77–85 (2016).
167. Collado, R. *et al.* Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis. *Cancer Letters* **317**, 144–149 (2012).
168. Vlashi, E. & Pajonk, F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. *Seminars in Cancer Biology* **31**, 28–35 (2015).
169. Leporrier, M. *et al.* Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* **98**, 2319–2325 (2001).
170. Knauf, W. U. *et al.* Phase III Randomized Study of Bendamustine Compared With Chlorambucil in Previously Untreated Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* **27**, 4378–4384 (2009).
171. Niederle, N. *et al.* Bendamustine compared to fludarabine as second-line treatment in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* **92**, 653–660 (2013).
172. Bellosillo, B., Villamor, N. & Colomer, D. In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. (1999).
173. Hallek, M. *et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* **376**, 1164–1174 (2010).
174. Fischer, K. *et al.* Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* **127**, 208–215 (2016).
175. Eichhorst, B. *et al.* First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *The Lancet Oncology* **17**, 928–942 (2016).
176. Teeling, J. L. *et al.* The Biological Activity of Human CD20 Monoclonal Antibodies Is Linked to Unique Epitopes on CD20. *J Immunol* **177**, 362–371 (2006).
177. Wierda, W. G. *et al.* Ofatumumab As Single-Agent CD20 Immunotherapy in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* **28**, 1749–1755 (2010).
178. Hillmen, P. *et al.* Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *The Lancet* **385**, 1873–1883 (2015).
179. Offner, F. Ofatumumab and bendamustine combination therapy in patients with untreated and relapsed chronic lymphocytic leukemia: initial results of the phase II study OMB115991. (2014).
180. Jaglowski, S. M. *et al.* Safety and activity of BTK inhibitor ibrutinib combined with ofatumumab in chronic lymphocytic leukemia: a phase 1b/2 study. *Blood* **126**, 842–850 (2015).
181. Mössner, E. *et al.* Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* **115**, 4393–4402 (2010).

182. Goede, V. *et al.* Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med* **370**, 1101–1110 (2014).
183. Frustaci, A. M. *et al.* Ofatumumab plus chlorambucil as a first-line therapy in less fit patients with chronic lymphocytic leukemia: analysis of COMPLEMENT1 and other monoclonal antibodies association data. *Therapeutic Advances in Hematology* **7**, 222–230 (2016).
184. Le garff-Tavernier, M., Decocq, J. & De Romeuf, C. Analysis of CD16+CD56dim NK cells from CLL patients: evidence supporting a therapeutic strategy with optimized anti-CD20 monoclonal antibodies. (2010).
185. Sawas, A. *et al.* A phase 1/2 trial of ublituximab, a novel anti-CD20 monoclonal antibody, in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma or chronic lymphocytic leukaemia previously exposed to rituximab. *Br J Haematol* **177**, 243–253 (2017).
186. Lunning, M. *et al.* Ublituximab and umbralisib in relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **134**, 1811–1820 (2019).
187. Sharman, J. P. *et al.* Ublituximab (TG-1101), a novel glycoengineered anti-CD20 antibody, in combination with ibrutinib is safe and highly active in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukaemia: results of a phase 2 trial. *Br J Haematol* **176**, 412–420 (2017).
188. Lozanski, G. *et al.* Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* **103**, 3278–3281 (2004).
189. Hillmen, P. *et al.* Alemtuzumab Compared With Chlorambucil As First-Line Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* **25**, 5616–5623 (2007).
190. Lepretre, S. *et al.* Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood* **119**, 5104–5110 (2012).
191. Kreitman, R. J. *et al.* Phase I Trial of Recombinant Immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in Patients With B-Cell Malignancies. *JCO* **23**, 6719–6729 (2005).
192. Kreitman, R. J. & Pastan, I. Antibody Fusion Proteins: Anti-CD22 Recombinant Immunotoxin Moxetumomab Pasudotox. *Clinical Cancer Research* **17**, 6398–6405 (2011).
193. Byrd, J. C. *et al.* Comparison of Results from a Phase 1/2 Study of Lumiliximab (Anti-CD23) in Combination with FCR for Patients with Relapsed CLL with Published FCR Results. *Blood* **108**, 32–32 (2006).
194. Hertlein, E. *et al.* Milatuzumab immunoliposomes induce cell death in CLL by promoting accumulation of CD74 on the surface of B cells. *Blood* **116**, 2554–2558 (2010).
195. Robak, T. *et al.* Randomized phase 2 study of otlertuzumab and bendamustine *versus* bendamustine in patients with relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **176**, 618–628 (2017).
196. Betrian, S. *et al.* Idelalisib improves CD37 antibody BI 836826 cytotoxicity against chemo-resistant /relapse-initiating CLL cells: a rationale for combination treatment. *Blood Cancer Journal* **6**, e496–e496 (2016).

197. Farooqui, M. Z. H. *et al.* Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *The Lancet Oncology* **16**, 169–176 (2015).
198. Byrd, J. C. *et al.* Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **369**, 32–42 (2013).
199. Burger, J. A. *et al.* Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **373**, 2425–2437 (2015).
200. Moreno, C. *et al.* Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **20**, 43–56 (2019).
201. Byrd, J. C. *et al.* Ibrutinib versus Ofatumumab in Previously Treated Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med* **371**, 213–223 (2014).
202. Chanan-Khan, A. *et al.* Ibrutinib combined with bendamustine and rituximab compared with placebo, bendamustine, and rituximab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma (HELIOS): a randomised, double-blind, phase 3 study. *The Lancet Oncology* **17**, 200–211 (2016).
203. Shanafelt, T. D. *et al.* Ibrutinib–Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **381**, 432–443 (2019).
204. Burger, J. A. *et al.* Randomized trial of ibrutinib vs ibrutinib plus rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **133**, 1011–1019 (2019).
205. Woyach, J. A. *et al.* Ibrutinib Regimens versus Chemoimmunotherapy in Older Patients with Untreated CLL. *N Engl J Med* **379**, 2517–2528 (2018).
206. Woyach, J. A. *et al.* Resistance Mechanisms for the Bruton’s Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib. *N Engl J Med* **370**, 2286–2294 (2014).
207. Byrd, J. C. *et al.* Acabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **374**, 323–332 (2016).
208. Licican, A. *et al.* Biochemical characterization of tirabrutinib and other irreversible inhibitors of Bruton’s tyrosine kinase reveals differences in on - and off - target inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1864**, 129531 (2020).
209. Salles, G., Karlin, L. & Rule, S. A Phase I Study Of The Oral Btk Inhibitor ONO-4059 In Patients With Relapsed/Refractory and High Risk Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL). (2013).
210. Danilov, A. V. *et al.* Phase 1b Study of Tirabrutinib in Combination With Idelalisib or Entospletinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* clincanres.3504.2019 (2020) doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3504.
211. Byrd, J. C. *et al.* First-in-human phase 1 study of the BTK inhibitor GDC-0853 in relapsed or refractory B-cell NHL and CLL. *Oncotarget* **9**, (2018).
212. Brown, J. R. *et al.* Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **123**, 3390–3397 (2014).

213. Furman, R. R. *et al.* Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **370**, 997–1007 (2014).
214. Zelenetz, A. D. *et al.* Idelalisib or placebo in combination with bendamustine and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: interim results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology* **18**, 297–311 (2017).
215. Flinn, I. W. *et al.* The phase 3 DUO trial: duvelisib vs ofatumumab in relapsed and refractory CLL/SLL. *Blood* **132**, 2446–2455 (2018).
216. Brown, J. R. *et al.* Phase I Trial of the Pan-PI3K Inhibitor Pilaralisib (SAR245408/XL147) in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) or Relapsed/Refractory Lymphoma. *Clinical Cancer Research* **21**, 3160–3169 (2015).
217. on behalf of the HOVON Lunenburg Lymphoma Phase I/II Consortium *et al.* Final results of a phase 1b study of the safety and efficacy of the PI3K δ inhibitor acalisib (GS-9820) in relapsed/refractory lymphoid malignancies. *Blood Cancer Journal* **8**, 16 (2018).
218. Assouline, S. & Amrein, L. A Phase II Clinical Trial of the Pan PI3K Inhibitor, Buparlisib, for the Treatment of Relapsed and Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Canadian Cancer Trials Group IND.216. (2017).
219. Awan, F. T. *et al.* Phase Ib trial of the PI3K/mTOR inhibitor voxtalisib (SAR245409) in combination with chemoimmunotherapy in patients with relapsed or refractory B-cell malignancies. *Br J Haematol* **175**, 55–65 (2016).
220. Kadia, T. *et al.* A Pilot Phase II Study of the Lyn Kinase Inhibitor Bafetinib in Patients with Relapsed or Refractory B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **118**, 2858–2858 (2011).
221. Amrein, P. C. *et al.* Phase II Study of Dasatinib in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research* **17**, 2977–2986 (2011).
222. Friedberg, J. W. *et al.* Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **115**, 2578–2585 (2010).
223. Awan, F. T. *et al.* Entospletinib monotherapy in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia previously treated with B-cell receptor inhibitors: results of a phase 2 study. *Leukemia & Lymphoma* **60**, 1972–1977 (2019).
224. Guo, A. *et al.* Dual SYK/JAK inhibition overcomes ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia: Cerdulatinib, but not ibrutinib, induces apoptosis of tumor cells protected by the microenvironment. *Oncotarget* **8**, (2017).
225. Andritsos, L. A. *et al.* A multicenter phase 1 study of plerixafor and rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **60**, 3461–3469 (2019).
226. Kashyap, M. K. *et al.* Ulocuplumab (BMS-936564 / MDX1338): a fully human anti-CXCR4 antibody induces cell death in chronic lymphocytic leukemia mediated through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Oncotarget* **7**, (2016).
227. Hoellenriegel, J. *et al.* The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* **123**, 1032–1039 (2014).

228. Steurer, M. *et al.* Olaptesed pegol (NOX-A12) with bendamustine and rituximab: a phase IIa study in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **104**, 2053–2060 (2019).
229. Cuesta-Mateos, C. *et al.* Preclinical activity of anti-CCR7 immunotherapy in patients with high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* **64**, 665–676 (2015).
230. Melo-Cardenas, J., Urquiza, M., Kipps, T. J. & Castro, J. E. Intratumoral delivery of CD154 homolog (Ad-ISF35) induces tumor regression: analysis of vector biodistribution, persistence and gene expression. *Cancer Gene Ther* **19**, 336–344 (2012).
231. Furman, R. R., Forero-Torres, A., Shustov, A. & Drachman, J. G. A phase I study of dacetuzumab (SGN-40, a humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **51**, 228–235 (2010).
232. Byrd, J. C. *et al.* Phase I study of the anti-CD40 humanized monoclonal antibody lucatumumab (HCD122) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **53**, 2136–2142 (2012).
233. McWilliams, E. M. *et al.* Anti-BAFF-R antibody VAY-736 demonstrates promising preclinical activity in CLL and enhances effectiveness of ibrutinib. *Blood Advances* **3**, 447–460 (2019).
234. Vitale, L. A. *et al.* Development of a Human Monoclonal Antibody for Potential Therapy of CD27-Expressing Lymphoma and Leukemia. *Clinical Cancer Research* **18**, 3812–3821 (2012).
235. French, R. R. *et al.* Eradication of lymphoma by CD8 T cells following anti-CD40 monoclonal antibody therapy is critically dependent on CD27 costimulation. *Blood* **109**, 4810–4815 (2007).
236. Ansell, S. *et al.* A phase I study of an agonist anti-CD27 human antibody (CDX-1127) in patients with advanced hematologic malignancies or solid tumors. *J. Immunotherapy Cancer* **1**, P259, 2051-1426-1-S1-P259 (2013).
237. Yoda, A., Oishi, I. & Minami, Y. Expression and Function of the Ror-Family Receptor Tyrosine Kinases During Development: Lessons from Genetic Analyses of Nematodes, Mice, and Humans. *Journal of Receptors and Signal Transduction* **23**, 1–15 (2003).
238. Broome, H. E., Rassenti, L. Z., Wang, H.-Y., Meyer, L. M. & Kipps, T. J. ROR1 is expressed on hematogones (non-neoplastic human B-lymphocyte precursors) and a minority of precursor-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* **35**, 1390–1394 (2011).
239. Fukuda, T. *et al.* Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3047–3052 (2008).
240. Cui, B. *et al.* High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **128**, 2931–2940 (2016).
241. Choi, M. Y. *et al.* Phase I Trial: Cirmtuzumab Inhibits ROR1 Signaling and Stemness Signatures in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell Stem Cell* **22**, 951-959.e3 (2018).
242. Bains, S. K. *et al.* Mitochondria control of cell death induced by anti-HLA-DR antibodies. *Leukemia* **17**, 1357–1365 (2003).

243. Lin, T. S. *et al.* A phase I/II dose escalation study of apolizumab (Hu1D10) using a stepped-up dosing schedule in patients with chronic lymphocytic leukemia and acute leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **50**, 1958–1963 (2009).
244. Dunleavy, K. *et al.* Phase 1 study of combination rituximab with apolizumab in relapsed/refractory B-cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *JCO* **23**, 6607–6607 (2005).
245. Querfeld, C. *et al.* Phase 1 Trial of Cobomarsen, an Inhibitor of Mir-155, in Cutaneous T Cell Lymphoma. *Blood* **132**, 2903–2903 (2018).
246. Nguyen, M. *et al.* Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 19512–19517 (2007).
247. Joudeh, J. & Claxton, D. Obatoclax mesylate: pharmacology and potential for therapy of hematological neoplasms. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **21**, 363–373 (2012).
248. Kipps, T. J. *et al.* A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **56**, 2826–2833 (2015).
249. Roberts, A. W. *et al.* Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **374**, 311–322 (2016).
250. Stilgenbauer, S. *et al.* Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology* **17**, 768–778 (2016).
251. Seymour, J. F. *et al.* Venetoclax–Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 1107–1120 (2018).
252. Fischer, K. *et al.* Venetoclax and obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **129**, 2702–2705 (2017).
253. Fischer, K. *et al.* Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med* **380**, 2225–2236 (2019).
254. Hillmen, P. *et al.* Ibrutinib Plus Venetoclax in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: The CLARITY Study. *JCO* **37**, 2722–2729 (2019).
255. Casara, P. *et al.* S55746 is a novel orally active BCL-2 selective and potent inhibitor that impairs hematological tumor growth. *Oncotarget* **9**, (2018).
256. Roberts, A. W. *et al.* Substantial Susceptibility of Chronic Lymphocytic Leukemia to BCL2 Inhibition: Results of a Phase I Study of Navitoclax in Patients With Relapsed or Refractory Disease. *JCO* **30**, 488–496 (2012).
257. Kipps, T. J. *et al.* Navitoclax (ABT-263) Plus Fludarabine/Cyclophosphamide/Rituximab (FCR) or Bendamustine/Rituximab (BR): A Phase 1 Study in Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood* **118**, 3904–3904 (2011).
258. Kipps, T. J. *et al.* A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **56**, 2826–2833 (2015).

259. Brown, J. R. *et al.* Obatoclox in combination with fludarabine and rituximab is well-tolerated and shows promising clinical activity in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **56**, 3336–3342 (2015).
260. O'Brien, S. M. *et al.* Phase I study of obatoclox mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **113**, 299–305 (2009).
261. Castro, J. E. *et al.* A Phase II, Open Label Study of AT-101 in Combination with Rituximab in Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. Evaluation of Two Dose Regimens. *Blood* **110**, 3119–3119 (2007).
262. Roskoski, R. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacological Research* **107**, 249–275 (2016).
263. Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M. & Morris, M. Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Human Cancers: From Small Molecules to Peptide Inhibitors. *Cancers* **7**, 179–237 (2015).
264. Deep, A. *et al.* Flavopiridol as cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor: a review. *New J. Chem.* **42**, 18500–18507 (2018).
265. Flynn, J. *et al.* Dinaciclib is a novel cyclin-dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **29**, 1524–1529 (2015).
266. Fabre, C. *et al.* Clinical study of the novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib in combination with rituximab in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Chemother Pharmacol* **74**, 1057–1064 (2014).
267. Goh, K. C. *et al.* TG02, a novel oral multi-kinase inhibitor of CDKs, JAK2 and FLT3 with potent anti-leukemic properties. *Leukemia* **26**, 236–243 (2012).
268. Chen, R. *et al.* Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **113**, 4637–4645 (2009).
269. Blachly, J. S., Byrd, J. C. & Grever, M. Cyclin-dependent kinase inhibitors for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology* **43**, 265–273 (2016).
270. Lin, T. S. *et al.* Phase II Study of Flavopiridol in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia Demonstrating High Response Rates in Genetically High-Risk Disease. *JCO* **27**, 6012–6018 (2009).
271. Ghia, P. *et al.* Efficacy and safety of dinaciclib vs ofatumumab in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **129**, 1876–1878 (2017).
272. Longo, P. G. *et al.* The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **111**, 846–855 (2008).
273. Fecteau, J.-F. *et al.* Sorafenib-Induced Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Associated with Downregulation of RAF and Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 (Mcl-1). *Mol Med* **18**, 19–28 (2012).
274. Larsen, J. T. *et al.* Akt inhibitor MK-2206 in combination with bendamustine and rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: Results from the N1087 alliance study: A KT I NHIBITOR MK - 2206 PLUS BR IN R ELAPSED CLL. *Am J Hematol* **92**, 759–763 (2017).

275. Friedman, D. R. *et al.* Pre-Clinical and Interim Results of a Phase II Trial of Perifosine In Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood* **116**, 1842–1842 (2010).
276. Hussain, S.-R. A. *et al.* Mcl-1 Is a Relevant Therapeutic Target in Acute and Chronic Lymphoid Malignancies: Down-Regulation Enhances Rituximab-Mediated Apoptosis and Complement-Dependent Cytotoxicity. *Clinical Cancer Research* **13**, 2144–2150 (2007).
277. O'Brien, S. *et al.* 5-Year Survival in Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia in a Randomized, Phase III Trial of Fludarabine Plus Cyclophosphamide With or Without Oblimersen. *JCO* **27**, 5208–5212 (2009).
278. Yu, B. *et al.* Targeted nanoparticle delivery overcomes off-target immunostimulatory effects of oligonucleotides and improves therapeutic efficacy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 136–147 (2013).
279. Cheson, B. D. Oblimersen for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. (2007).
280. Sampath, D. *et al.* Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **119**, 1162–1172 (2012).
281. Inoue, S., Riley, J., Gant, T. W., Dyer, M. J. S. & Cohen, G. M. Apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in leukemic cells is mediated by Bim and Noxa. *Leukemia* **21**, 1773–1782 (2007).
282. Byrd, J. C. A phase I and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Blood* **105**, 959–967 (2004).
283. Blum, K. A. *et al.* Phase II study of the histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* **147**, 507–514 (2009).
284. Ribrag, V. *et al.* Safety and efficacy of abexinostat, a pan-histone deacetylase inhibitor, in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *Haematologica* **102**, 903–909 (2017).
285. Amengual, J. E. *et al.* Mechanisms of Acquired Drug Resistance to the HDAC6 Selective Inhibitor Ricolinostat Reveals Rational Drug-Drug Combination with Ibrutinib. *Clin Cancer Res* **23**, 3084–3096 (2017).
286. Frankland-Searby, S. & Bhaumik, S. R. The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1825**, 64–76 (2012).
287. Fennell, D. A., Chacko, A. & Mutti, L. BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* **27**, 1189–1197 (2008).
288. Baou, M. *et al.* Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* **95**, 1510–1518 (2010).
289. Faderl, S. *et al.* Phase II study of single-agent bortezomib for the treatment of patients with fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **107**, 916–924 (2006).
290. Gupta, S. V. *et al.* The Proteasome Inhibitor Carfilzomib Functions Independently of p53 to Induce Cytotoxicity and an Atypical NF- B Response in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Clinical Cancer Research* **19**, 2406–2419 (2013).

291. Zang, Y. *et al.* Carfilzomib and ONX 0912 Inhibit Cell Survival and Tumor Growth of Head and Neck Cancer and Their Activities Are Enhanced by Suppression of Mcl-1 or Autophagy. *Clinical Cancer Research* **18**, 5639–5649 (2012).
292. Lamothe, B. *et al.* Proteasome inhibitor carfilzomib complements ibrutinib's action in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **125**, 407–410 (2015).
293. Awan, F. T. *et al.* Phase I dose escalation trial of the novel proteasome inhibitor carfilzomib in patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* **56**, 2834–2840 (2015).
294. Herriott, A. *et al.* PARP1 expression, activity and *ex vivo* sensitivity to the PARP inhibitor, talazoparib (BMN 673), in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget* **6**, (2015).
295. Weston, V. J. *et al.* The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* **116**, 4578–4587 (2010).
296. Pratt, G. *et al.* A multi-centre phase I trial of the PARP inhibitor olaparib in patients with relapsed chronic lymphocytic leukaemia, T-prolymphocytic leukaemia or mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* **182**, 429–433 (2018).
297. Ciardullo, C. *et al.* Non-genotoxic MDM2 inhibition selectively induces a pro-apoptotic p53 gene signature in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* **104**, 2429–2442 (2019).
298. Castro, J. E. *et al.* ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **106**, 2506–2512 (2005).
299. Bremer, E., van Dam, G., Kroesen, B. J., de Leij, L. & Helfrich, W. Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects. *Trends in Molecular Medicine* **12**, 382–393 (2006).
300. Sher, T. *et al.* Efficacy of lenalidomide in patients with chronic lymphocytic leukemia with high-risk cytogenetics. *Leukemia & Lymphoma* **51**, 85–88 (2010).
301. Moutouh-de Parseval, L. A., Weiss, L., DeLap, R. J., Knight, R. D. & Zeldis, J. B. Tumor Lysis Syndrome/Tumor Flare Reaction in Lenalidomide-Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* **25**, 5047–5047 (2007).
302. Fink, A. M. *et al.* Lenalidomide maintenance after first-line therapy for high-risk chronic lymphocytic leukaemia (CLLM1): final results from a randomised, double-blind, phase 3 study. *The Lancet Haematology* **4**, e475–e486 (2017).
303. Badoux, X. C. *et al.* Phase II Study of Lenalidomide and Rituximab As Salvage Therapy for Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* **31**, 584–591 (2013).
304. Brown, J. R. *et al.* A phase I study of lenalidomide in combination with fludarabine and rituximab in previously untreated CLL/SLL. *Leukemia* **24**, 1972–1975 (2010).
305. Ding, W. *et al.* Pembrolizumab in patients with CLL and Richter transformation or with relapsed CLL. *Blood* **129**, 3419–3427 (2017).
306. Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C. H. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med* **365**, 725–733 (2011).

307. Turtle, C. J. *et al.* Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *JCO* **35**, 3010–3020 (2017).
308. Palmer, S. *et al.* Prognostic importance of T and NK-cells in a consecutive series of newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **141**, 607–614 (2008).
309. Veuillen, C. *et al.* Primary B-CLL Resistance to NK Cell Cytotoxicity can be Overcome In Vitro and In Vivo by Priming NK Cells and Monoclonal Antibody Therapy. *J Clin Immunol* **32**, 632–646 (2012).
310. Ruggeri, L. & Capanni, M. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. (1999).
311. McWilliams, E. M. *et al.* Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *OncImmunology* **5**, e1226720 (2016).
312. Gorczynski, R. M. CD200:CD200R-Mediated Regulation of Immunity. *ISRN Immunology* **2012**, 1–18 (2012).
313. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252–264 (2012).
314. Mahadevan, D. *et al.* Phase I study of samalizumab in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: blockade of the immune checkpoint CD200. *j. immunotherapy cancer* **7**, 227 (2019).
315. Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* **6**, 443–446 (2000).
316. Lim, S. H. *et al.* Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* **118**, 2530–2540 (2011).
317. Ljungars, A. *et al.* A platform for phenotypic discovery of therapeutic antibodies and targets applied on Chronic Lymphocytic Leukemia. *npj Precision Onc* **2**, 18 (2018).
318. Spaner, D. E. & Masellis, A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **21**, 53–60 (2007).
319. Zent, C. S. *et al.* Phase I clinical trial of CpG oligonucleotide 7909 (PF-03512676) in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **53**, 211–217 (2012).
320. Liang, X. *et al.* Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **115**, 5041–5052 (2010).
321. Spaner, D. E. *et al.* A phase I/II trial of TLR-7 agonist immunotherapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **24**, 222–226 (2010).
322. Tomic, J. *et al.* Sensitization of IL-2 Signaling through TLR-7 Enhances B Lymphoma Cell Immunogenicity. *J Immunol* **176**, 3830–3839 (2006).
323. Ziech, D., Franco, R., Pappa, A. & Panayiotidis, M. I. Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **711**, 167–173 (2011).

324. Devi, G. S. *et al.* Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clinica Chimica Acta* **293**, 53–62 (2000).
325. Pelicano, H., Carney, D. & Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates* **7**, 97–110 (2004).
326. Oltra, A. M., Carbonell, F., Tormos, C., Iradi, A. & Sáez, G. T. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radical Biology and Medicine* **30**, 1286–1292 (2001).
327. Achanta, G. *et al.* Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol γ . *EMBO J* **24**, 3482–3492 (2005).
328. Sablina, A. A. *et al.* The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* **11**, 1306–1313 (2005).
329. Trachootham, D. *et al.* Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. *Blood* **112**, 1912–1922 (2008).
330. Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* **8**, 579–591 (2009).
331. Liu, J. *et al.* Targeting p53-deficient chronic lymphocytic leukemia cells *in vitro* and *in vivo* by ROS-mediated mechanism. *Oncotarget* **7**, (2016).
332. Xu, W. S., Parmigiani, R. B. & Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* **26**, 5541–5552 (2007).
333. Dinavahi, S. S., Bazewicz, C. G., Gowda, R. & Robertson, G. P. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences* **40**, 774–789 (2019).
334. Rodríguez-Zavala, J. S., Calleja, L. F., Moreno-Sánchez, R. & Yoval-Sánchez, B. Role of Aldehyde Dehydrogenases in Physiopathological Processes. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 405–420 (2019).
335. Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D. & Vasiliou, V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **4**, 697–720 (2008).
336. Ma, I. & Allan, A. L. The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep* **7**, 292–306 (2011).
337. Moreb, J. S., Mohuczy, D., Ostmark, B. & Zucali, J. R. RNAi-mediated knockdown of aldehyde dehydrogenase class-1A1 and class-3A1 is specific and reveals that each contributes equally to the resistance against 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol* **59**, 137–137 (2006).
338. Bazewicz, C. G., Dinavahi, S. S., Schell, T. D. & Robertson, G. P. Aldehyde dehydrogenase in regulatory T-cell development, immunity and cancer. *Immunology* **156**, 47–55 (2019).
339. Terenzi, A., Pirker, C., Keppler, B. K. & Berger, W. Anticancer metal drugs and immunogenic cell death. *Journal of Inorganic Biochemistry* **165**, 71–79 (2016).
340. Koppaka, V. *et al.* Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacol Rev* **64**, 520–539 (2012).

341. Quash, G. *et al.* Aldehyde dehydrogenase inhibitors: α,β -Acetylenic N-substituted aminothiolesters are reversible growth inhibitors of normal epithelial but irreversible apoptogens for cancer epithelial cells from human prostate in culture. *European Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 906–916 (2008).
342. Venton, G. *et al.* Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors. *Blood Cancer Journal* **6**, e469–e469 (2016).
343. Canuto, R. A. *et al.* The effect of a novel irreversible inhibitor of aldehyde dehydrogenases 1 and 3 on tumour cell growth and death. *Chemico-Biological Interactions* **130–132**, 209–218 (2001).

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Résumé

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte en France. Cette hémopathie, au pronostic généralement favorable, présente cependant une hétérogénéité sur le plan clinique, pronostique et moléculaire. Malgré le fait que la LLC soit toujours considérée comme une maladie incurable, la prise en charge thérapeutique a considérablement évolué au cours de ces dernières années. Après avoir longtemps reposé sur l'immuno-chimiothérapie, le traitement actuel de la LLC inclut de nouveaux agents thérapeutiques hautement efficaces et plus spécifiques de la cellule de LLC. Le choix de la stratégie thérapeutique repose sur les caractéristiques moléculaires et cytogénétiques de la cellule maligne.

Il a été mis en évidence dernièrement l'importance du récepteur des cellules B, du microenvironnement des cellules leucémique et des protéines anti-apoptotiques dans la biologie de la LLC. La meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les voies de survie des cellules de LLC a permis l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques. Par exemple, la découverte récente de l'implication du potentiel d'oxydoréduction dans la physiopathologie de la LLC ouvre de nouvelles perspectives médicamenteuses.

Le défi de cette nouvelle décennie est une médecine stratifiée, de précision dite personnalisée, en faisant correspondre correctement les thérapies choisies à la cellule tumorale spécifique de chaque individu. Ceci permettrait l'obtention de rémissions plus profondes, permettant un traitement à durée fixe ou intermittente, et limitant ainsi la durée d'exposition et donc la toxicité médicamenteuse ainsi que l'émergence de résistances.