

SORBONNE UNIVERSITE PARIS Nord
UFR de SANTE, MEDECINE et BIOLOGIE HUMAINE
ECOLE DOCTORALE GALILLEE

N° attribué par la bibliothèque : _____

THESE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS
NORD**

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue

Le 19 mars 2020

Par **Monsieur Grégory Lazarian**

Né le 21 Avril 1984

**Études de l'impact des anomalies génétiques dans
l'initiation, l'évolution et la résistance au traitement dans
la leucémie lymphoïde chronique : exemple de la mutation
d'*IKZF3* p.L162R et des anomalies de *TP53***

JURY :

Mme le Pr Véronique Leblond, CHU Pitié-Salpêtrière (Présidente)

Mr le Dr Olivier Bernard DR, Université Paris-Sud, INSERM U1170 (Rapporteur)

Mr le Dr Paulo Vieira, Institut Pasteur (Rapporteur)

Mme le Pr Catherine J. Wu, Dana Farber Cancer Institute/ Harvard Medical School

Mme le Pr Florence Cymbalista, CHU Avicenne/INSERM U978

Mme le Pr Fanny Baran-Marszak, CHU Avicenne/INSERM U978 (Directeur de thèse)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les **Dr Olivier Bernard** et **Paulo Vieira** pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit. Je remercie également le **Pr Véronique Leblond** d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie chaleureusement le **Pr Catherine J.Wu** pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail de thèse et pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire au Dana Farber Cancer Institute à Boston. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir fait confiance en me confiant ce projet. Elle m'a guidé tout au long de ce travail et je garderai un souvenir merveilleux de ces deux années passées à Boston, riche sur le plan professionnel et personnel.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse le **Pr Fanny Baran-Marszak**, qui m'accompagne depuis le début de mon expérience dans la recherche. Je te remercie infiniment pour le temps que tu as passé à me former, à m'apprendre, et me transmettre ton savoir. J'apprécie nos échanges et nos réflexions scientifiques et j'ai hâte de poursuivre nos projets. J'ai énormément appris et évolué à tes côtés.

Je voudrais remercier particulièrement le **Pr Florence Cymbalista**, envers qui je suis particulièrement reconnaissant pour m'avoir poussé à me lancer dans cette merveilleuse expérience qui m'a conduit à Boston pendant deux ans. Merci pour ta confiance, ton soutien et toute la motivation que tu m'apportes.

Je remercie également le **Dr Nadine Varin-Blank** de m'avoir accueilli au sein de son unité INSERM U978, équipe dans laquelle j'ai fait mes premiers pas dans l'univers de la recherche et où j'espère continuer à m'épanouir. Merci pour ta bienveillance, tes conseils et tes encouragements.

Je remercie les personnes qui ont collaboré à ces travaux et sans qui ce projet n'aurait pas pu aboutir, en particulier **Elisa Ten Hacken** pour son encadrement dans le travail avec les souris, et **Shanye Yin**, qui a réalisé tout le travail bioinformatique.

Je remercie tous les membres de l'équipe du Wu Lab à Boston au Dana Farber Cancer Institute, pour leur bonne humeur quotidienne et tous les échanges passionnants que nous avons eu. Mes pensées vont particulièrement aux techniciennes de recherches qui font tous les jours un travail particulièrement remarquable avec les souris, **Elizabeth Witten, Heather Joyal et Farah Faye Regis**. Merci à **Catherine Gutierrez** et **Anat Biran**, pour avoir partagé nos galères de paillasse et pour notre amitié.

Je remercie également **Lili Wang, Christopher Ott** et **Donna Neuberg** pour leurs conseils et qui ont suivi de près ou de loin les progrès de ce projet.

Je remercie chaleureusement les membres du service d'hématologie biologique de l'Hôpital Avicenne, mes collègues biologistes et les techniciens, en particuliers **Valérie Lefèbvre** pour son aide dans le séquençage des patients.

Table des matières

Liste des figures	5
Liste des tableaux	6
Liste des abréviations.....	7
Avant-propos	10
Introduction générale.....	12
1. Biologie du lymphocyte B	12
1.1. Fonction.....	12
1.2. Le récepteur B à l'antigène (BCR).....	12
1.3. Ontogénèse des lymphocytes B (Moelle osseuse)	17
1.4. Différenciation B dépendante de l'antigène (organes lymphoïdes périphériques) 20	
1.5. Signalisation induite par l'activation du BCR.....	24
1.6. Conséquence de la dérégulation de la lymphopoïèse et de la maturation des lymphocytes : transformation maligne des lymphocytes B	28
2. La Leucémie Lymphoïde Chronique	31
2.1. Définition	31
2.2. Epidémiologie	31
2.3. Diagnostic.....	32
2.4. Classification anatomo-clinique	34
2.5. Marqueurs pronostiques de la LLC	36
2.6. Evolution	40
2.7. Traitements de la LLC.....	41
2.7.1. Chimiothérapie	41
2.7.2. Immunothérapie	41
2.7.3. Thérapies ciblées	42
2.7.4. Indication de traitement et schémas thérapeutiques	43
2.8. Physiopathologie de la LLC	44
2.8.1. Défaut d'apoptose	44
2.8.2. Prolifération.....	45
2.8.3. Anomalie de la réponse à la signalisation du BCR	45
2.8.4. Microenvironnement tumoral.....	47
2.8.5. Anomalies génétiques	49
3. Les caractéristiques génétiques de la LLC	51
3.1. Altérations cytogénétiques et anomalies du nombre de copies.....	51
3.2. Mutations somatiques.....	55

3.3. Voies biologiques impactées par les altérations génétiques.....	57
.....	58
3.3.1. Voie de réponse aux dommages de l'ADN	58
3.3.2. Signalisation de NOTCH	60
3.3.3. Voie de maturation des ARNs.....	61
3.3.4. Voie du BCR et des TLR et signalisation de NF-κB	63
3.3.5. Mutation au niveau de facteurs de transcription : exemple d'IKZF3	64
3.4. Hétérogénéité génétique intratumorale et évolution clonale.....	68
3.4.1. Modèle d'évolution clonale.....	68
3.4.2. Reconstitution phylogénétique.....	71
3.4.3. Impact des altérations génétiques sur la résistance au traitement	72
3.5. Epigénétique.....	75
4. Modèles murins de LLC	77
4.1. Application du système Cre/loxP <i>in vivo</i>	77
4.2. Modèles murins basés sur l'expression de gènes dérégulés dans la LLC	80
4.3. Modèles reproduisant des altérations génétiques identifiées dans la LLC.....	82
5. Objectif de la thèse	85
6. Manuscrits.....	87
Manuscrit n°1: A hotspot mutation p.L162R in <i>IKZF3</i> drives B cell neoplasia via transcriptional dysregulation	88
Manuscrit n°2: <i>TP53</i> mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes	142
7. Discussion.....	156
Conclusion.....	166
Bibliographie.....	167
Annexes	190
Annexe 1 : Stabilization of β-catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF-κB target genes transcription in mantle cell lymphoma.....	191
Annexe 2 : Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia.....	211
Annexe 3 : Prevalence of BTK and PLCG2 mutations in a real-life CLL cohort still on ibrutinib after 3 years: a FILO group study.....	224

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une Immunoglobuline (Ig).....	13
Figure 2 : Synthèse de la chaîne lourde mu des immunoglobulines.....	16
Figure 3 : Schéma de la lymphopoïèse B.....	19
Figure 4 : Maturation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires après stimulation par un antigène thymo-dépendant ou thymo-indépendant.....	23
Figure 5 : Voie de signalisations induites par l'activation du BCR.....	26
Figure 6 : Equivalent physiologique des principaux syndromes lymphoprolifératifs B.....	29
Figure 7 : Survie globale des patients LLC selon la classification clinique de Binet et de Rai.....	35
Figure 8 : Courbes de survie comparant des patients atteints de LLC avec des gènes IGHV mutés et non mutés.....	38
Figure 9 : Les différents mécanismes d'activation du BCR.....	47
Figure 10 : Probabilité de survie depuis la date du diagnostic dans les différents groupes cytogénétiques.....	52
Figure 11 : Fréquence des mutations somatiques et anomalies du nombre de copies dans la LLC.....	56
Figure 12 : Diversité des associations de mutations retrouvées au sein de la cohorte de 538 patients atteints de LLC.....	57
Figure 13 : Répartition des anomalies de TP53.....	59
Figure 14 : Représentation schématique de la protéine AIOLOS.....	67
Figure 15 : Modèle d'évolution clonale de la LLC.....	70
Figure 16 : Schéma de l'évolution clonale spécifique induite par les traitements.....	74
Figure 17 : Représentation schématique de la recombinaison Cre/LoxP.....	78
Figure 18 : Le système Cre/loxP in vivo. Exemple de la délétion restreinte d'un gène A dans la lignée lymphoïde B.....	79
Figure 19 : Représentation schématique du locus humain 13q14 et murin 14qC3.....	82

Liste des tableaux

Tableau 1: Critères immunophénotypiques pour le diagnostic de la LLC (score de Matutes, modifié par Moreau).....	34
Tableau 2 : classification de Binet	35

Liste des abréviations

APRIL	Proliferation-inducing ligand
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
B2M	β 2-microglobuline
BAFF	B-cell activating factor
BCL2	B cell lymphoma-2
BCR	Récepteur B à l'antigène
BIRC3	Baculoviral IAP Repeat Containing 3
BLNK	B-cell linker
BTK	Bruton tyrosine kinase
CDR	Complementary determining region
CDR	Common deleted region
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CLP	Common lymphoid progenitor
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA	Cellule présentatrice de l'antigène
DAG	diacylglycerol
DDR	DNA damage response ou voie de réponse aux dommages à l'ADN
DLEU2	Deleted in Lymphocytic Leukemia 2
EBF	Early B cell Factor
FISH	Fluorescence in situ hybridation
FLT3	Fm related tyrosine kinase 3
FOB	Follicular B cells
FR	Framework regions
GC	Germinal center
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
HCS	cellule souche hématopoïétique
HDAC1	Histone déacétylase 1
Ig	Immunoglobuline
IP3	inositol-1,4,5-triphosphate
IRAK4	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 4
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based-activation motif

LDH	Lactico-déshydrogénase
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LMPP	Lymphoïd-primed multipotent progenitors
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	Tissu lymphoïde associé aux muqueuses
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBL	monoclonal B cell lymphocytosis
MCL1	Myeloid cell leukemia 1
MDM-2	Mouse double minute 2
MDR	Minimal deleted region
MPP	Multipotent progenitors
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
MYHIIA	Myosin heavy chain IIA
MZ	Marginal zone
NF-kB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NFKBIE	Inhibiteur de NF-kB I-kappa-B-epsilon
NGS	Next Generation Sequencing
NICD	NOTCH1-intracellular domain
NK	Natural Killer NK
NLC	Cellules Nurse-like
NSG	Souris immunodéficientes NOD-scid-gamma
NURD	Nucleosome Remodeling histone Deacetylase Complexe
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAX5	Paired Box 5
PD-1	Programmed cell death protein 1
RAG	Recombination-activating gene
SCF	Stem Cell Factor
SHIP	FcγRIIb SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase
SHP-1	SH2 domain-containing phosphatase
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
SYK	Spleen tyrosine kinase
TCL1	T-Cell Leukemia/Lymphoma 1

TCR	Récepteur T à l'antigène
TdT	Terminal nucléotide Transférase
TK	Thymidine kinase
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6
VAF	Variants alléliques
WES	Whole exome sequencing
WGS	Whole genome sequencing
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70
ZF	Doigts-de-zinc

Avant-propos

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un syndrome lymphoprolifératif fréquent dans la population occidentale, touchant les personnes âgées, et caractérisé par l'accumulation de cellules B matures dans le sang et les organes hématopoïétiques. C'est une maladie relativement indolente, nécessitant seulement un suivi médical pour certains patients, ou évoluant vers une maladie plus agressive pour d'autres, parfois fatale, et nécessitant un traitement. L'arsenal thérapeutique de la LLC a considérablement évolué au cours des dix dernières années, avec l'introduction de thérapies qui ciblent des voies biologiques cruciales avec une très bonne efficacité et moins de toxicité que le traitement standard à base d'immunochimiothérapie.

L'accès aisé au matériel tumoral à partir de prélèvements sanguins chez les patients a facilité l'analyse génomique de la LLC. Ces études ont contribué d'une part, à une meilleure compréhension de la physiopathologie, et d'autre part, à identifier des biomarqueurs d'intérêt pronostique ou prédictifs de la réponse thérapeutique. Elles ont surtout révélé une importante complexité du génome et une hétérogénéité génétique inter et intra-individuelle. La fonction d'un grand nombre d'anomalies génétiques identifiées à ce jour n'est pas connue.

Dans la première partie de ce travail, j'ai étudié le rôle fonctionnel de la mutation d'*IKZF3*, une mutation récemment découverte et dont la fonction n'est pas connue. Ce travail a été initié par l'équipe de Catherine Wu à Boston, au Dana Farber Cancer Institute, un laboratoire expert dans la génétique de la LLC. Cette équipe a publié en 2015 les résultats de séquençage de l'exome d'une des plus importantes cohortes de patients atteints de LLC, ce qui a permis la découverte de la mutation récurrente d'*IKZF3* L162R. L'étude sur le rôle fonctionnel de cette mutation a débuté en 2017 avec la génération d'un modèle de souris exprimant la mutation spécifiquement dans les cellules B. Pendant 2 ans, mon travail expérimental a consisté à générer des cohortes de souris mutantes, valider les modèles murins, étudier l'impact de la mutation sur le développement B ainsi que le retentissement fonctionnel en se basant sur des études de RNA-seq et de CHIP-seq. Au cours de ces deux ans, nous avons découvert de façon inattendue que les souris mutantes développaient des proliférations clonales semblables à la LLC. Nous avons poursuivi le travail en caractérisant les souris leucémiques pour valider ce modèle unique de LLC. Grâce à mon appartenance au laboratoire d'hématologie de l'hôpital

Avicenne à Bobigny, j'ai identifié des patients *IKZF3* mutés, et le RNA-seq a été réalisé pour comparer les signatures transcriptomiques obtenues avec celles des cellules de LLC murines. Les résultats de ce travail sont présentés dans le **manuscrit n°1** de cette thèse intitulé « A hotspot mutation p.L162R in *IKZF3* drives B cell neoplasia via transcriptional dysregulation ». Le manuscrit est en cours de finalisation pour une soumission dans un journal scientifique.

Le **manuscrit n°2** présenté dans cette thèse, intitulé « *TP53* mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes », a été réalisé au laboratoire d'hématologie de l'Hôpital Avicenne du Pr Florence Cymbalista en collaboration avec l'unité INSERM U978 de Nadine Varin-Blank. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de la mutation de *TP53* sur l'évolution de la maladie, une mutation plus fréquente que la mutation d'*IKZF3* et dont l'intérêt pronostique et la résistance aux chimiothérapies qu'elle confère sont bien connus. Cette étude longitudinale rétrospective, initiée en 2015, a été réalisée par séquençage NGS d'ADN de patients conservés à différents stades d'évolution de la maladie. En outre, l'étude a permis de valider l'utilisation du séquenceur en routine. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2016 (Lazarian, Int J Cancer, 2016).

Enfin, nous présentons en annexes trois manuscrits en rapport avec la thématique. **L'annexe 1** est une étude sur le dialogue entre la signalisation du récepteur B à l'antigène (BCR) et la voie Wnt/ β -caténine dans le lymphome à cellule du manteau, un syndrome lymphoprolifératif très proche de la LLC (Lazarian, Oncogene, 2020). Cette étude fonctionnelle souligne l'importance de la voie du BCR pour la survie cellulaire. **L'annexe 2** est une revue de la littérature sur l'apport des découvertes génomiques en clinique dans la LLC (Lazarian, JCO, 2017). Enfin, **l'annexe 3** est une étude sur la prévalence des mutations de résistance à l'Ibrutinib, inhibiteur de la Bruton tyrosine kinase BTK, dans une cohorte française de LLC sous traitement (Quinquenel, Blood, 2019).

Introduction générale

1. Biologie du lymphocyte B

1.1. Fonction

Le lymphocyte B est défini par la présence d'un récepteur B à l'antigène (BCR), composé d'une immunoglobuline membranaire spécifique d'un antigène et de deux chaînes de signalisation. C'est une cellule de l'immunité adaptative, qui a deux principales fonctions.

Premièrement, après reconnaissance d'un antigène spécifique par l'intermédiaire du BCR, l'activation du lymphocyte B va entraîner une réponse immunitaire à médiation humorale, qui se traduit par la différenciation du lymphocyte B en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (à fonction anticorps) de même spécificité que le BCR et la mise en place d'une mémoire immunitaire par le biais des lymphocytes B mémoires.

Deuxièmement, le lymphocyte B participe à la réponse immunitaire à médiation cellulaire en jouant le rôle de cellule présentatrice de l'antigène (CPA). Après reconnaissance de l'antigène, celui-ci est internalisé par le lymphocyte B, dégradé en peptides qui seront réexposés en surface, associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) pour être reconnus par les lymphocytes T CD4 notamment, à l'origine de la réponse immunitaire cellulaire.

1.2. Le récepteur B à l'antigène (BCR)

Structure du BCR

La réponse immunitaire adaptative repose sur la reconnaissance spécifique de l'antigène par le lymphocyte B par l'intermédiaire de son récepteur B à l'antigène (BCR). Il est notamment constitué d'une immunoglobuline de surface composée de deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) identiques deux à deux. Chaque chaîne comporte une partie constante C et une partie variable V. La région de l'immunoglobuline composée de la partie variable des chaînes lourdes H et légères L constitue le site de reconnaissance de l'antigène et définit la

spécificité de l'immunoglobuline. La variabilité de ce site de reconnaissance est accentuée par la présence de domaines hypervariables au sein des chaînes lourdes et légères appelés *Complementary determining region* (CDR). Il existe trois CDR dans la partie variable de la chaîne lourde (CDR1, 2 et 3), formant une structure en boucle. Entre ces régions, on retrouve des séquences conservées, les *Framework regions* (FR1, 2 et 3) ; elles jouent un rôle dans l'organisation spatiale de la partie variable^{1,2}. (**Figure 1**)

Il existe cinq types de parties constantes des chaînes lourdes, définissant l'isotype de l'immunoglobuline (Ig): gamma, mu, epsilon, delta et alpha. Ces types de chaînes lourdes sont respectivement divisés en sous-types : IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE, IgD, IgGA1 et IgGA2. La partie constante de l'immunoglobuline n'intervient pas directement dans la reconnaissance de l'antigène mais selon l'isotype, elle porte la fonction de l'immunoglobuline : opsonisation, élimination des complexes immuns³.

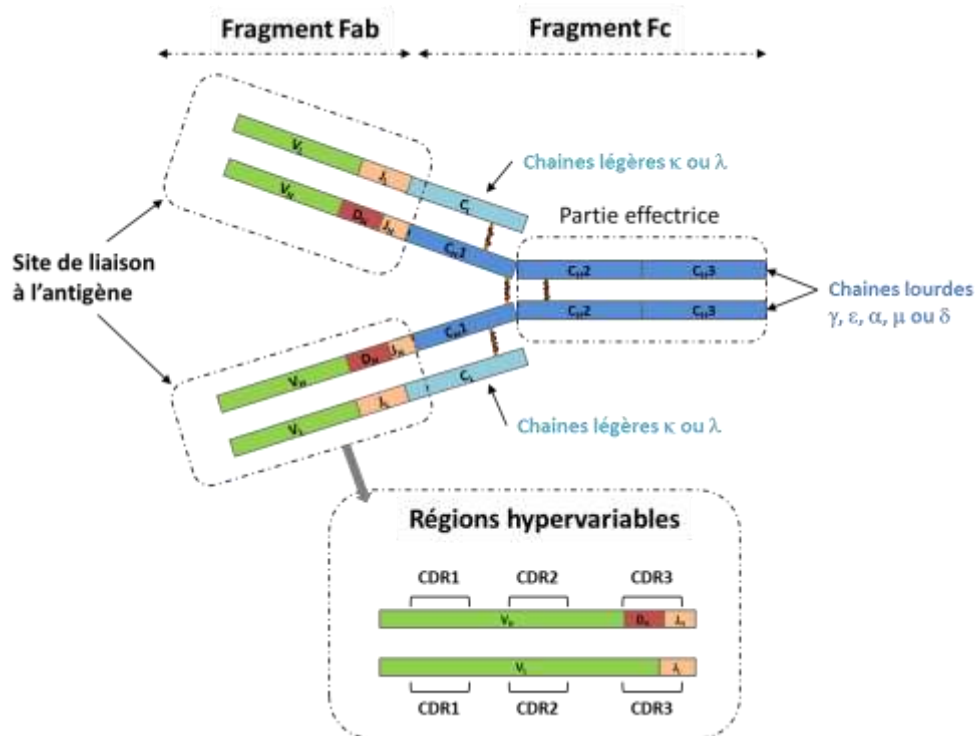


Figure 1 : Représentation schématique d'une Immunoglobuline (Ig). Les gènes V, D et J qui codent la partie variable et les gènes C de la partie constante sont représentés sur chaque chaîne lourde et légère. Les régions hypervariables avec la position des CDR (complementary-determining regions) sont indiquées au niveau du site de liaison à l'antigène.

L'hydrolyse de l'immunoglobuline par une enzyme protéolytique, la papaine, génère un fragment Fc (Fragment Cristallisable), correspondant à la région constante qui supporte la fonction biologique, et 2 fragments Fab (*Fragment Antigen Binding*) correspondant aux sites de liaison à l'antigène (**Figure 1**).

Organisation des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines

Le locus du gène des chaînes lourdes *IGH* se situe sur le chromosome 14 et comporte 70 segments regroupés en 3 familles dites de variabilité V, de diversité D et de jonction J. La recombinaison des segments V, D et J va fournir une séquence réarrangée du locus *IGH* qui code la partie variable de la chaîne lourde. La partie constante C est codée par un des 9 segments correspondants chacun à un sous-type d'immunoglobuline ($C\mu$, $C\gamma 1$, $C\gamma 2$, $C\gamma 3$, $C\gamma 4$, $C\delta$, $C\epsilon$, $C\alpha 1$, $C\alpha 2$).

Les chaînes légères sont codées par deux gènes : *IGκ* pour la chaîne κ sur le chromosome 2 et *IGλ* pour la chaîne λ sur le chromosome 22. Le locus *IGκ* comporte une trentaine de segments $V\kappa$ et 5 segments $J\kappa$. La recombinaison des segments $V\kappa$ et $J\kappa$ code pour la partie variable de la chaîne légère κ. Un seul segment $C\kappa$ code la partie constante. Le gène *IGλ* comporte 30 segments $V\lambda$ et 5 segments $J\lambda$ dont la recombinaison code pour la partie variable de la chaîne λ et 6 segments $C\lambda$ pour la partie constante.^{4,5}

Mise en place de la diversité des immunoglobulines

Chaque lymphocyte porte un BCR spécifique d'un antigène. La variété des BCR est le fruit des réarrangements des gènes des immunoglobulines avec un nombre important de segments V, D et J pour les chaînes lourdes et V et J pour les chaînes légères. Dans les conditions physiologiques, les lymphocytes B constituent une population polyclonale dans laquelle chaque lymphocyte (ou clone) porte un BCR spécifique d'un antigène. L'ensemble des BCR définit le répertoire B.

Cette diversité du répertoire du BCR est assurée par un mécanisme de diversité combinatoire et un mécanisme de diversité jonctionnelle.

Le mécanisme de **diversité combinatoire** repose sur la recombinaison aléatoire des segments géniques constituant les régions variables des immunoglobulines. La séquence codant pour la partie variable des chaînes lourdes est obtenue par la recombinaison au hasard d'un segment de diversité D_H à un segment de jonction J_H pour former un premier segment D_H-J_H . Ce segment réarrangé est recombiné de façon aléatoire à un segment de variabilité V_H pour former un exon unique VDJ (**Figure 2**). Un réarrangement aléatoire similaire a lieu sur les gènes codant la partie variable des chaînes légères mais alors seulement entre les segments V et J. Ce mécanisme de recombinaison s'effectue grâce à la présence de « séquence signal de recombinaison » (RSS) au niveau des segments V, D et J. Le rapprochement de deux segments juxtapose deux séquences RSS qui constituent un motif reconnu par les recombinases RAG1 et RAG2. Elles permettent le clivage des séquences RSS et la liaison des deux segments réarrangés⁶⁻⁸.

Le mécanisme de **diversité jonctionnelle** augmente la diversité par insertion et délétion de nucléotides au niveau des zones de jonction entre les segments réarrangés. Des nucléotides sont ajoutés par la Terminal nucléotide Transférase (TdT) ce qui augmente la variabilité de la séquence VDJ⁹.

Ainsi, à partir de la configuration germinale des gènes *IGH* et *IGL*, le mécanisme complexe de recombinaison génère une séquence d'ADN réarrangée, unique, spécifique de chaque antigène dans chaque lymphocyte B au cours du développement. A partir d'un nombre restreint de gènes, il est donc possible de générer un vaste répertoire constitué en théorie de près de 10^9 immunoglobulines différentes⁵.

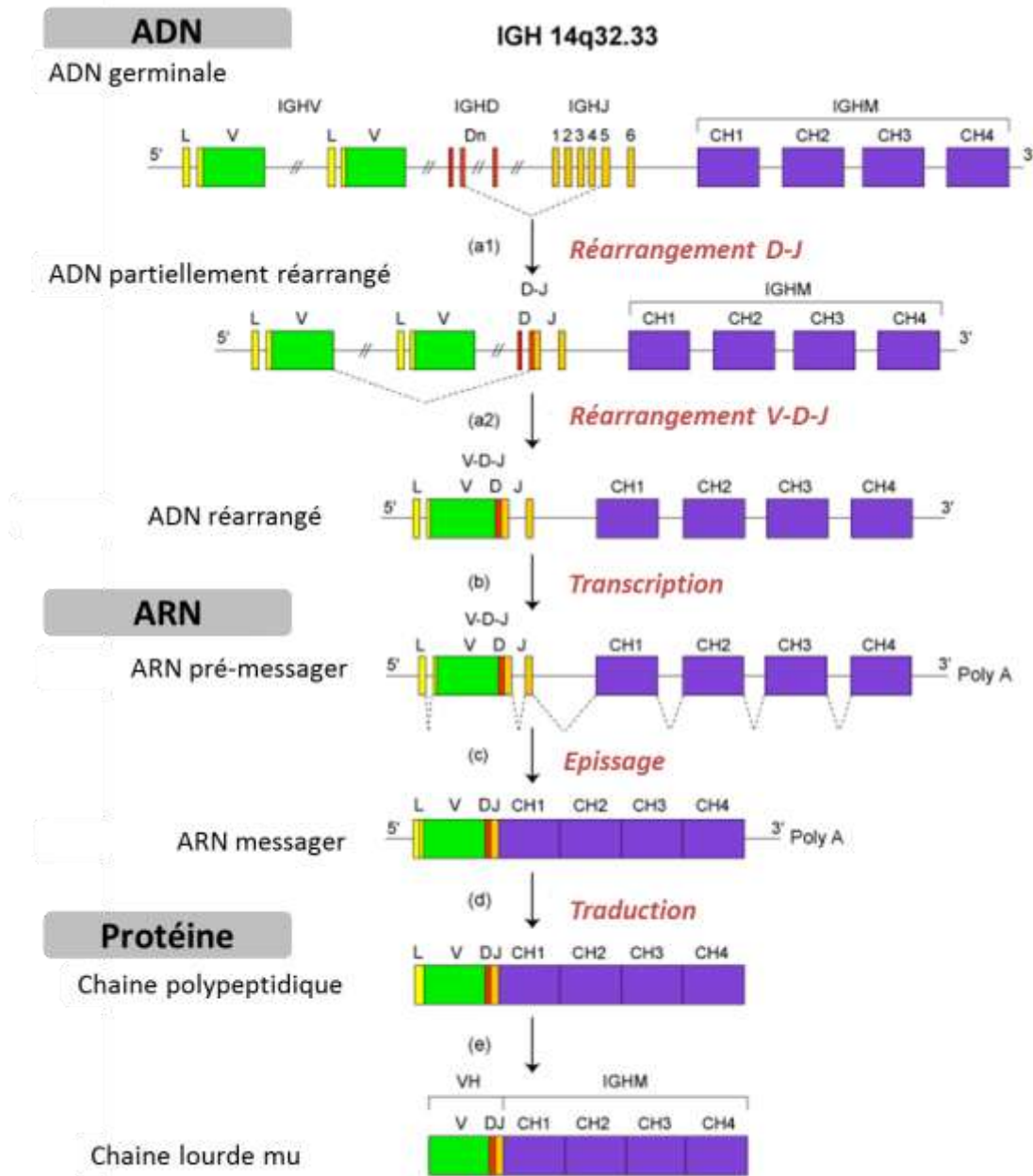


Figure 2 : Synthèse de la chaîne lourde mu des immunoglobulines. Au niveau de l'ADN, un gène D est réarrangé avec un gène J pour créer un segment DJ. Un gène V est ensuite réarrangé avec le segment DJ réarrangé pour former un segment VDJ. Le gène VDJ est transcrit avec le segment codant pour la chaîne constante mu pour former un transcrite VDJ-Cmu. Après épissage des introns, le transcrite mature est traduit en chaîne lourde mu.

1.3. Ontogénèse des lymphocytes B (Moelle osseuse)

La différenciation et la maturation des lymphocytes B ou **lymphopoïèse B** se déroule dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique (HSC) et aboutit à la formation de lymphocytes B exprimant une immunoglobuline de surface capable de reconnaître un antigène. Cette première étape de maturation se fait indépendamment de toute stimulation antigénique. Le lymphocyte B mature issu de la moelle osseuse est immunocompétent, il est qualifié de « naïf » ou vierge. Ces lymphocytes B matures circulent ensuite dans le sang et la lymphe jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, en particulier la rate et les ganglions lymphatiques.

Les différents stades médullaires de la lymphopoïèse B

Dans la moelle osseuse, une cellule souche hématopoïétique de phénotype Lin-SCA1+KIT+FLT3-CD34-(**HSC**), définie par une importante capacité d'auto-renouvellement, de différenciation et capable de donner naissance à tous les lignages sanguins, se différencie en **MPP** (*multipotent progenitors*) de phénotype Lin-SCA1+KIT+FLT3-CD34+ puis en **LMPP** (*lymphoid-primed multipotent progenitors*) Lin-SCA1+KIT+FLT3+ ce qui marque une première étape dans l'engagement vers la différenciation lymphoïde. Les MPP et LMPP perdent progressivement leur capacité d'auto-renouvellement en faveur de leur potentiel de différenciation et se différencient en précurseur lymphoïde **CLP** Lin-SCA1^{low}KIT^{low}IL-7R+. Ce dernier est à l'origine des lignées lymphocytaires T, B et Natural Killer NK (**Figure 3**)¹⁰⁻¹².

Le premier stade de développement lymphocytaire B est le stade **pré-pro-B**, pendant lequel le réarrangement des gènes des immunoglobulines n'a pas encore eu lieu. La chaîne CD79a est détectable dans le cytoplasme et les gènes codant pour les recombinaisons *RAG1* et *RAG2* (*Recombination-activating gene1/2*), nécessaires au réarrangement du locus *IGH* commencent à s'exprimer^{8,13}.

La cellule évolue ensuite en lymphocyte **pro-B**, où le réarrangement d'un allèle du locus *IGH* débute avec une recombinaison entre un segment D_H et J_H parallèlement à l'expression du CD19, suivi d'une recombinaison entre un segment V_H avec le segment DJ_H réarrangé. Un

réarrangement V_HDJ_H fonctionnel en phase de lecture et sans codon stop permettra la synthèse d'une chaîne lourde μ intracytoplasmique. Si le réarrangement est non productif, le deuxième allèle du locus *IGH* sera réarrangé à son tour pour tenter de fournir un réarrangement fonctionnel^{14,15}.

La chaîne lourde μ commence ensuite à être exprimée en surface et s'associe à une pseudo-chaîne légère constituée des protéines $\lambda 5$ et VpreB pour former un pré-BCR. Le stade **pré-B** est défini par l'expression du pré-BCR, dont la signalisation va permettre l'expansion clonale de la cellule et une diminution transitoire des RAG pour permettre le mécanisme d'exclusion allélique qui bloque le réarrangement de l'allèle *IGH* non réarrangé. A la fin du stade pré-B, les RAG sont à nouveau exprimées pour permettre le réarrangement des segments V_L et J_L des gènes des chaînes légères. Le réarrangement débute toujours au niveau d'un allèle du gène *Igk*. Si le réarrangement est non productif, l'autre allèle est réarrangé. Si le réarrangement n'est toujours pas productif, la recombinaison est démarrée au niveau du locus *Igλ*¹⁶.

La chaîne légère fonctionnelle réarrangée va alors remplacer la pseudo-chaîne $\lambda 5/VpreB$ pour former une immunoglobuline de surface complète, spécifique d'un antigène. La partie constante de l'immunoglobuline de surface est transcrite en ARN qui contient à la fois les régions constantes μ et δ . L'épissage alternatif de cet ARN va fournir une chaîne de chaque isotype et l'associer à la région variable. Par conséquent, la cellule exprimera une IgM et une IgD de surface de même spécificité, définissant le lymphocyte **B immature ou naïf**.

Les lymphocytes B dont les immunoglobulines de surface réagissent avec les antigènes du soi subissent un phénomène de sélection négative, c'est la tolérance immune centrale, faisant notamment intervenir la reconnaissance des antigènes du soi exprimés par les cellules stromales. Certains lymphocytes auto-réactifs qui réagissent avec les antigènes du soi sont éliminés par apoptose. D'autres lymphocytes subissent un phénomène d'anergie pour diminuer l'expression des immunoglobulines de surface et leur capacité de signalisation. Les lymphocytes B naïfs quittent la moelle osseuse et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires à la rencontre de leurs antigènes spécifiques.

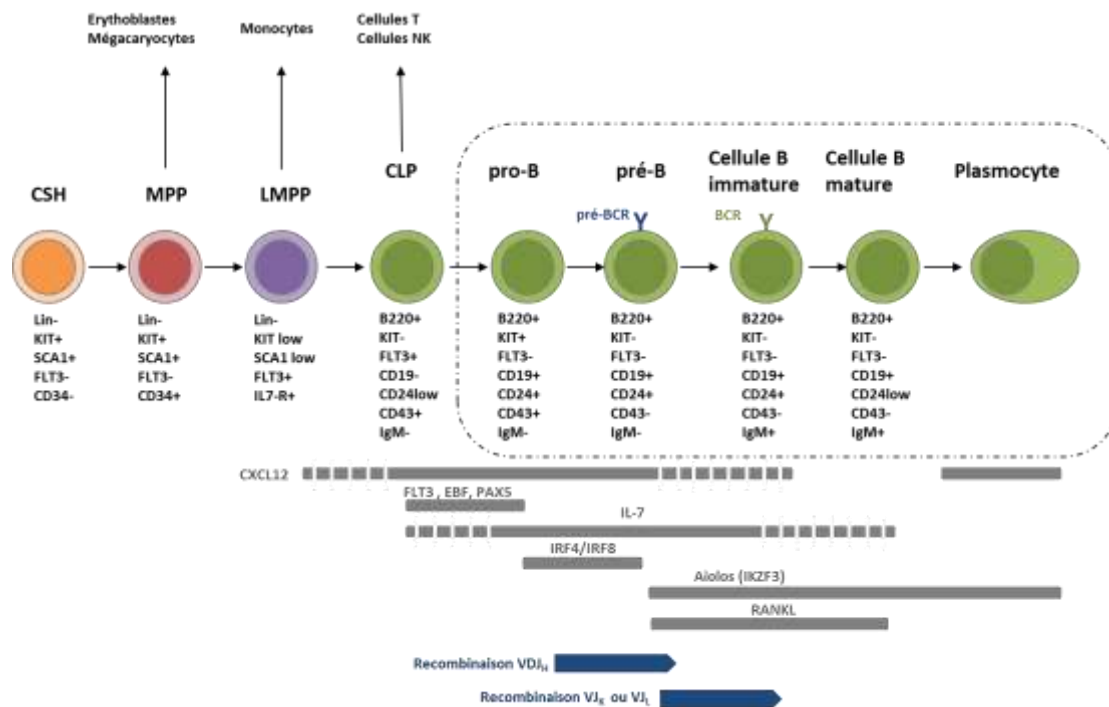


Figure 3 : Schéma de la lymphopoïèse B. Les différents stades de maturation sont associés à l'expression de marqueurs de surface, l'expression de facteurs de transcription et la recombinaison des gènes des immunoglobulines. Le facteur de transcription IKZF3 s'exprime à partir du stade pré-B et son expression augmente jusqu'au stade plasmocyte.

Régulation de la lymphopoïèse B

La différenciation lymphoïde se fait au contact de cellules médullaires stromales, qui créent une niche micro-environnementale dont la fonction est de maintenir la survie des cellules hématopoïétiques par contact direct ou production de facteurs solubles nécessaires à leur développement. Comme pour les autres lignages hématopoïétiques, la différenciation lymphoïde B est également sous le contrôle de l'expression coordonnée de facteurs de transcription. L'expression de ces facteurs est régulée au cours du développement pour permettre la transition à un stade plus mature, en activant ou réprimant l'expression de gènes cibles. La perte de fonction de chacun de ces facteurs de transcription ou de cytokines, aboutit individuellement à l'arrêt de la différenciation à des étapes distinctes, suggérant un rôle non redondant de leur fonction, spécifique à chaque stade.

Les cellules stromales jouent un rôle important dans l'entrée dans la différenciation B au niveau des CLP et des cellules pré-pro B. Elles expriment un ligand du récepteur FLT3 (*fms related tyrosine kinase 3*), porté par les CLP et les cellules pré-pro B, dont l'activation stimule la croissance cellulaire et active l'expression du facteur de transcription PU1. Ce dernier, associé au facteur de transcription IKAROS (*IKZF1*), induit l'expression d'E2A et du facteur B précoce EBF (*Early B cell Factor*) et marque l'engagement dans le lignage B^{10,13,17,18}.

La chimiokine CXCL12, produite par les cellules stromales médullaires, joue également un rôle crucial pour le développement des pré-pro-B¹⁹. En se liant à son récepteur CXCR4, elle a pour effet d'attirer et de retenir les précurseurs immédiatement après leur engagement dans le lignage lymphoïde B au sein de la niche hématopoïétique^{20,21}. En parallèle, la production d'IL7 active son récepteur spécifique IL7R à la surface des pré-pro B et des pro-B ce qui aboutit d'une part à la transcription de la protéine anti-apoptotique MCL1 (*Myeloid cell leukemia 1*) pour favoriser la survie cellulaire et d'autre part à la surexpression du facteur de transcription EBF pour maintenir la différenciation B. D'autres cytokines sont produites pour stimuler la croissance cellulaire comme le SCF (*Stem Cell Factor*) qui se lie au récepteur tyrosine kinase Kit.

Au stade pro-B, le facteur de transcription PAX5 (*Paired Box 5*) commence à s'exprimer et joue un rôle essentiel dans l'expression du CD19 et la mise en place de l'hétérodimère CD79a/b indispensable pour la transduction du signal induite par le BCR¹⁴.

Au stade pré-B, la signalisation induite par le pré-BCR active l'expression du facteur de transcription AIOLOS (*IKZF3*), qui va d'une part réprimer l'expression des chaînes $\lambda 5$ et *Vpreb* et de *MYC* pour diminuer la prolifération et l'activation des cellules pré-B. L'arrêt du cycle cellulaire va favoriser la maturation et le début du réarrangement des gènes des chaînes légères, indispensable à l'acquisition d'un BCR fonctionnel, et la transition vers le stade B immature²²⁻²⁴.

1.4. Différenciation B dépendante de l'antigène (organes lymphoïdes périphériques)

Lorsque le lymphocyte B entre en contact avec l'antigène spécifique en périphérie, il subit une deuxième étape de maturation ou **immunopoïèse**, dépendante de l'antigène, qui va aboutir à la formation de cellules effectrices, les plasmocytes sécréteurs de

l'immunoglobuline ou de lymphocytes B mémoires, tous deux spécifiques de l'antigène. La phase dépendante des antigènes a lieu dans les ganglions, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT).

Les lymphocytes B matures qui ont quitté la moelle osseuse expriment une IgM et une IgD de surface et parcourent l'organisme et les organes lymphoïdes secondaires. Leur activation sera de nature thymo-dépendante ou thymo-indépendante. (**Figure 4**).

Activation Thymo-dépendante

L'activation thymo-dépendante se fait par reconnaissance d'épitopes principalement de nature **protéique** par le BCR au niveau de la zone T des organes lymphoïdes secondaires. Une fraction des lymphocytes B va se différencier rapidement en plasmocytes sécréteurs de leur IgM à courte durée de vie pour induire une réponse immunitaire primaire, rapide et peu intense. En parallèle, les autres lymphocytes B vont internaliser l'antigène, le dégrader puis le réexposer à leur surface sous forme de peptides antigéniques associés au CMH II, pour être présenté à un lymphocyte folliculaire T *helper*. Ce dernier, préalablement activé par le même antigène, reconnaît le peptide exposé par le lymphocyte B via son récepteur T à l'antigène (TCR) qui reconnaît le complexe CMH II/peptide. Le rapprochement entre les deux cellules favorise la délivrance de signaux de co-stimulation avec notamment l'interaction entre le CD40 porté par le lymphocyte B et le CD40L porté par le lymphocyte T qui active la voie non canonique du Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) pour induire la survie et la prolifération cellulaire. L'expression de CD80/CD86 par le lymphocyte B permet également la liaison au CD28 des lymphocytes T à l'origine d'un autre signal de co-stimulation. L'activation cellulaire, la prolifération et la différenciation sont favorisées par la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T telles que l'IL-4, l'IL-6 ou l'IL-21 qui activent la voie de signalisation de STAT3²⁵.

Le lymphocyte B activé migre alors dans la zone B des organes lymphoïdes secondaires pour induire la formation de centres germinatifs où il poursuit sa maturation. Le lymphocyte B subit deux processus de maturation majeurs intervenant successivement dans des zones distinctes des centres germinatifs : l'hypermutation somatique, au niveau de la zone sombre qui comporte principalement des lymphocytes B qui prolifèrent mais ne produisent plus leur

Ig de surface (**centroblastes**) et la commutation isotypique au niveau de la zone claire, où les lymphocytes B réexpriment leur Ig de surface (**centrocytes**)^{26,27}.

Le mécanisme d'**hypermutation somatique** aboutit à l'augmentation de l'affinité de l'Ig de surface par introduction de mutations (insertions/délétions) au niveau de l'exon réarrangé VDJ et des régions *CDR* de la partie variable de la chaîne lourde des Ig par une enzyme, l'AID (Activation-Induced cytidine Deaminase), qui désamine les cytidines de l'ADN, introduit des uraciles et provoque des mésappariements. La réparation de l'ADN au niveau de ces sites modifiés induit des délétions ou des insertions de nucléotides qui modifient la séquence de la partie variable de l'Ig. L'interaction CD40/CD40L induit l'expression de l'AID dans les lymphocytes B au niveau des centres germinatifs. Si les mutations somatiques aboutissent à une Ig de moins bonne affinité pour l'antigène, les lymphocytes sont sélectionnés négativement et sont éliminés par apoptose dans la zone claire. En revanche, les lymphocytes B exprimant un BCR de haute affinité sont sélectionnés au niveau de la zone claire avec l'aide de lymphocytes T *helpers* et des cellules dendritiques folliculaires qui exposent l'antigène sous sa forme native, et vont subir le phénomène de commutation isotypique²⁸⁻³¹.

La **commutation isotypique** (ou switch de classe) est un processus de modification de l'isotype de l'immunoglobuline par remplacement de la partie constante $C\mu$ du gène de la chaîne lourde par un gène $C\gamma$, $C\alpha$, ou $C\epsilon$ pour produire respectivement une IgG, IgA ou IgE. Ce phénomène est essentiel à la diversification de la fonction des immunoglobulines puisque la fonction effectrice est portée par la partie constante. Au cours de la commutation isotypique, l'exon VDJ réarrangé se juxtapose au domaine constant d'une Ig de classe différente par recombinaison somatique. L'AID est indispensable à ce processus³⁰.

Enfin, le lymphocyte B sort du centre germinatif et se différencie en **plasmocyte** sécréteur d'Ig à longue durée de vie plus affin pour l'antigène ou en **lymphocyte B mémoire**, mobilisables plus rapidement en cas de nouvelle exposition à l'antigène.

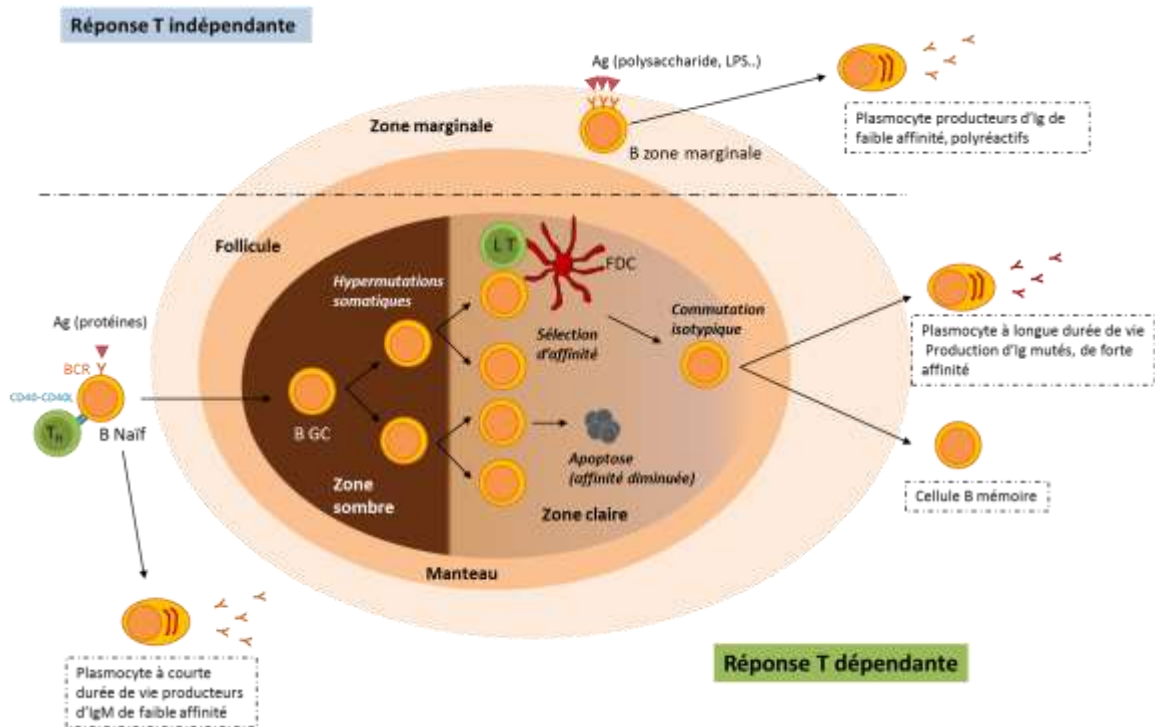


Figure 4 : *Maturation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires après stimulation par un antigène thymo-dépendant (en bas) ou thymo-indépendant (en haut).* (D'après Kuppers, Nat Rev 2005)³²

Activation Thymo-indépendante

L'activation thymo-indépendante joue un rôle important dans la défense spécifique contre une grande variété de pathogènes extracellulaires. Elle se déroule au niveau de la zone marginale et repose sur la reconnaissance d'antigènes saccharidiques ou d'acides nucléiques, retrouvés principalement dans des constituants microbiens tels que les lipopolysaccharides (LPS) de la paroi bactérienne, les flagellines, ou les constituants de la capsule de certains germes B. L'activation des lymphocytes B par ce type d'antigène aboutit à la production rapide d'IgM mais de faible affinité³³.

Deux types de réaction thymo-indépendante sont possibles en fonction de la nature des antigènes. Une activation **thymo-indépendante de type 1**, qui nécessite l'activation de récepteurs membranaires tels que les Toll-like Receptor (TLR), induit une activation polyclonale des lymphocytes B quelle que soit leur spécificité. Les antigènes sont des

mitogènes, ils sont capables d'induire directement l'activation et la prolifération des lymphocytes B. Parmi les antigènes, on retrouve le LPS bactérien qui active les TLR-4 ou le CpG des acides nucléiques qui active les TLR-9.

L'activation **thymo-indépendante de type 2** entraîne une stimulation monoclonale des lymphocytes B. Les antigènes thymo-indépendants de type 2 sont des molécules polysaccharidiques de la paroi bactérienne à motifs répétés. Ils agissent en agrégeant les immunoglobulines de surface des lymphocytes B matures spécifiques. La densité avec laquelle les antigènes agrègent le récepteur est déterminante.

1.5. Signalisation induite par l'activation du BCR

La signalisation du BCR joue un rôle majeur dans l'activation, la fonction et l'homéostasie du lymphocyte B après reconnaissance de l'antigène spécifique. La transduction du signal se fait principalement par la phosphorylation de protéines kinases qui s'activent en cascade pour induire *in fine* l'expression et l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire.

Phase précoce d'activation : formation du signalosome

Le BCR est composé d'une immunoglobuline IgM liée de façon non covalente à un hétérodimère constitué des chaînes CD79a(Ig α)/CD79b(Ig β). La reconnaissance de l'antigène par l'IgM induit la phosphorylation des motifs intracytoplasmiques ITAM (immunoreceptor tyrosine-based-activation motif) du CD79a et CD79b par la kinase LYN (kinase de la famille Src) et la kinase SYK (Spleen tyrosine kinase)^{34,35}. Cette phosphorylation induit le recrutement de nombreuses autres kinases et adaptateurs de signalisation incluant la Bruton tyrosine kinase BTK, la kinase LYN, le facteur d'échange de GTP, VAV et les protéines adaptatrices GRB2 et B-cell linker (BLNK). L'ensemble constitue le signalosome. Ces protéines kinases jouent également un rôle important pour l'amplification du signal en recrutant d'autres kinases et en formant des complexes avec des molécules de co-stimulation comme le CD19 ce qui abaisse le seuil d'activation du BCR³⁶. Cette propagation du signal passe par la liaison de l'antigène au récepteur qui induit une agrégation des BCR et la

formation de micro-clusters au niveau de radeaux lipidiques dans la membrane plasmique³⁷. Cette agrégation est favorisée par le co-récepteur CD19 et l'activation de la kinase BTK (**Figure 5**)^{38,39}.

Propagation du signal

La signalisation initiée au BCR se propage via plusieurs voies passant par la phospholipase C- γ 2 (PLC- γ 2), la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), et BTK. Après le recrutement de SYK et de LYN au niveau des motifs ITAM phosphorylés de CD79, l'adaptateur BLNK est recruté sur la séquence ITAM phosphorylée du CD79a, où il se lie via son domaine Src homology 2 (SH2) pour être rapidement phosphorylé à son tour par SYK^{40,41}. Il se lie alors à la PLC- γ 2 et à BTK⁴²⁻⁴⁴. Une fois que SYK, BTK, BLNK sont phosphorylés, la PLC- γ 2 est activée par une double phosphorylation de SYK et BTK. Elle induit alors l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) de la membrane plasmique en diacylglycerol (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP3)⁴⁵. Le DAG est un activateur classique de la protéine kinase C, impliquée dans de nombreuses voies en aval de la signalisation. La génération d'IP3 induit un relargage calcique dans le cytoplasme à partir des stocks du réticulum endoplasmique⁴⁶.

Les cascades de phosphorylation qui s'enchaînent après l'activation du BCR entraînent également l'activation de la voie PI3K. Au repos, la sous-unité p85 de PI3K forme un complexe avec la sous-unité catalytique p110. Après activation du BCR, p85 est recruté à la membrane plasmique où il s'associe avec les kinases LYN et FYN. De plus, la phosphorylation par Lyn du CD19 permet à la sous-unité p85 de se lier au CD19, ce qui résulte dans l'activation de la sous-unité p110 *delta*⁴⁷⁻⁵⁰. La PI3K δ phosphoryle le PI(4,5)P2 pour former le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). Au niveau de la membrane plasmique, PIP3 recrute BTK et d'autres kinases portant un domaine PH (pleckstrin homology domain), aboutissant à une activation amplifiée du signal émanant du BCR.

La kinase BTK joue un rôle critique dans l'amplification du signal du BCR. Après sa phosphorylation par SYK et LYN sur le résidu Y551 du domaine kinase, l'activation de BTK est amplifiée par une auto-phosphorylation sur le résidu Y223 au niveau du domaine SH3⁵¹. En plus de son rôle dans l'activation de la voie PI3K/AKT, BTK peut activer directement la kinase IKK, qui phosphoryle I- κ B α , permettant alors la translocation nucléaire de NF- κ B⁵².

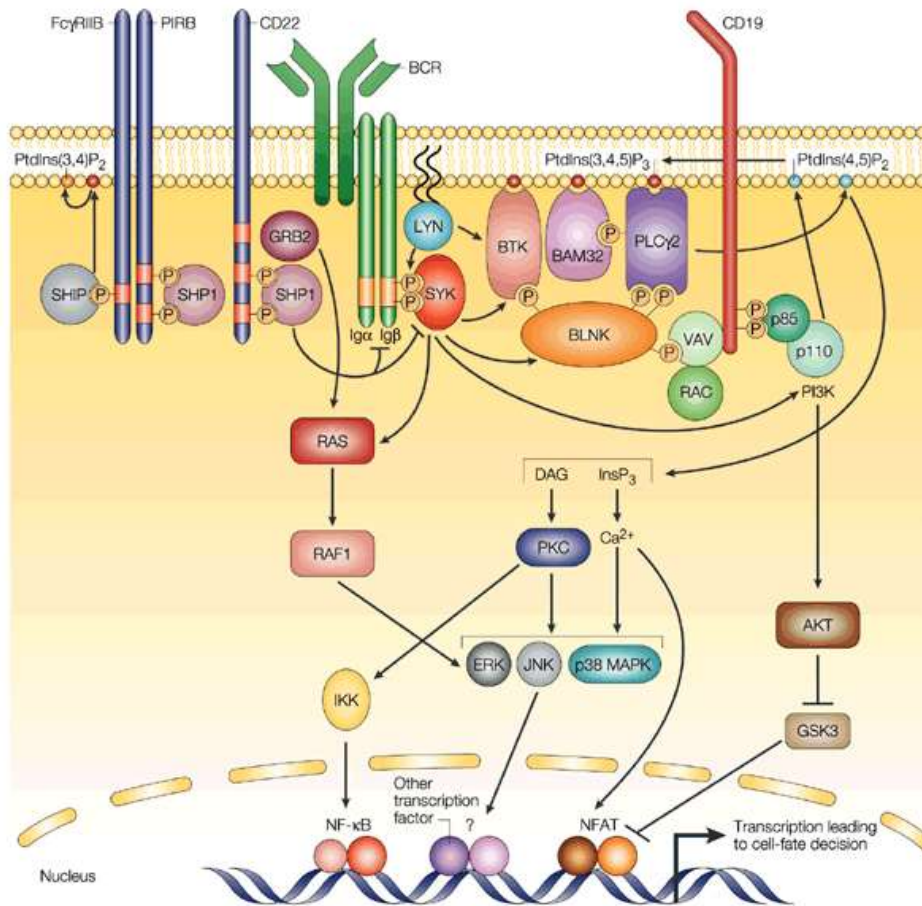


Figure 5 : Voie de signalisations induites par l'activation du BCR (D'après Niuro, *Nat Review Immunology*, 2002)⁵³ Le signalosome induit la phosphorylation de kinases aboutissant à l'activation des facteurs de transcription dont NF-κB et NFAT.

Activation de voies en aval de la signalisation membranaire

La libération de calcium intracellulaire active les facteurs de transcription NF-κB, Jun et NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) dont les activités dépendent de la durée et de l'amplitude du flux calcique⁵⁴. NFAT est activé par l'intermédiaire de la calcineurine elle-même activée au préalable par le calcium. La phosphatase déphosphoryle NFAT pour permettre sa translocation nucléaire et la régulation de gènes codant pour des cytokines et d'autres effecteurs de la réponse immune⁵⁵. L'influx calcique module également l'activité de NF-κB, dont les gènes cibles jouent un rôle important dans la prolifération, la survie cellulaire et la commutation de classe⁵⁶.

L'activation de la protéine kinase C ainsi que celle de VAV et GRB2 induit **les voies des petites GTPases (Rho, Ras, Rac) et des MAPK** (*mitogen-activated protein kinase*) également essentielles à la survie et la prolifération cellulaire⁵⁷. Les voies MAPK aboutissent à l'activation des facteurs *MYC* et *JUN* respectivement via ERK et JNK. Selon le stade de maturation et d'activation, ces facteurs de transcription induisent la prolifération, la survie ou l'apoptose de la cellule^{57,58}.

La voie **PI3K/Akt** contribue également à la survie cellulaire induite par le BCR. Akt est activé quand le PIP3 est produit par la PI3K, ce qui phosphoryle et recrute Akt à la membrane. Akt favorise la survie cellulaire en inhibant par phosphorylation les protéines pro-apoptotiques Bad et FOXO1 et en induisant l'accumulation nucléaire de NFAT par la phosphorylation inhibitrice de GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*)^{50,59}.

La **voie canonique de NF-κB** est activée par la signalisation du BCR et joue un rôle important dans la survie cellulaire et la prolifération. NF-κB (avec les différentes sous-unités p50, p52, p65/RelA, RelB, ou c-Rel) est présent dans le cytoplasme sous forme inactive en formant un dimère avec I-κB⁶⁰. L'activation de la voie canonique via la PKC active le complexe IKK (formé des protéines IKKα, IKKβ et NEMO), qui phosphorylent à leur tour I-κB, l'inhibiteur de NF-κB. I-κB est alors dégradé par le protéasome alors que NF-κB transloque dans le noyau pour activer un large éventail de gènes cibles responsables de l'inflammation, de la prolifération et la survie cellulaire⁶¹.

Régulation de l'activation de la voie du BCR

La régulation du signal délivré par le BCR est indispensable et son activation est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques tels que les phosphatases SHIP (*FcγRIIb SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase*), SHP-1 (*SH2 domain-containing phosphatase*) et d'autres kinases régulatrices incluant notamment Lyn.

La régulation du signal passe par des protéines transmembranaires telles que FcγRIIb, le CD5, le CD22 ou BTLA possédant un motif ITIM d'inhibition des récepteurs immuns⁶²⁻⁶⁴. Ces récepteurs peuvent se lier au BCR et phosphoryler le motif ITIM, ce qui induit un signal négatif en recrutant SHIP, SHP-1 à la membrane plasmique⁶⁵.

1.6. Conséquences de la dérégulation de la lymphopoïèse et de la maturation des lymphocytes : transformation maligne des lymphocytes B

A tous les stades du développement des lymphocytes B des anomalies peuvent être à l'origine d'une prolifération clonale non maîtrisée : dans la moelle osseuse, le blocage de la lymphopoïèse B au stade lymphoblaste induira des leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL B) alors que dans les organes lymphoïdes périphériques, la transformation d'un lymphocyte B mature (naïf ou activé par l'antigène) produira un syndrome lymphoprolifératif ou lymphome. Il existe une grande diversité de lymphomes B classés selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en fonction du stade de maturation où a lieu le blocage (**Figure 6**). Ces lymphomes se distinguent par leurs caractéristiques cliniques, histologiques, immunophénotypiques et moléculaires.

Au stade pré-B, le lymphocyte B subit un ensemble de modifications génétiques avec des cassures de l'ADN double-brin et des réarrangements chromatinien (recombinaisons V-D-J), au niveau du centre germinatif, les hypermutations somatiques et la commutation de classe rendent le génome instable et favorisent l'introduction de mutations et de modifications de l'architecture des gènes des immunoglobulines en particulier. Certains lymphomes sont définis par des translocations chromosomiques récurrentes impliquant le plus souvent le promoteur fort du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines sur le chromosome 14 et un gène impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire ou de l'apoptose.

La classification OMS des lymphomes B suit la maturation normale du lymphocyte B, quelques exemples :

- Les **lymphomes pré-centre germinatifs**, développés aux dépens de lymphocytes B naifs
 - lymphomes à cellules du manteau, caractérisés par la translocation t(11 ;14) acquise au stade pré-B qui aboutit à la surexpression du gène codant pour la cycline D1 et dérégule le cycle cellulaire.
 - leucémie lymphoïde chronique sans mutations somatiques des gènes des immunoglobulines
- Les **lymphomes d'origine centro-folliculaire** :

- lymphome folliculaire, associé à la translocation t(14 ;18) acquise au stade pré-B, ce qui entraîne la surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL2
- lymphome B diffus à grandes cellules
- lymphome de Burkitt, caractérisé par la translocation t(8 ;14) acquise au stade pré-B qui surexprime l'oncogène *MYC*
- Les lymphomes **post-centre germinatif** ou à cellules B mémoires
 - Lymphome de la zone marginale
 - LLC et lymphome du manteau avec mutations somatiques des gènes des immunoglobulines
- Lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (lymphome du MALT)
- Lymphome lymphoplasmocytaire
- Myélome

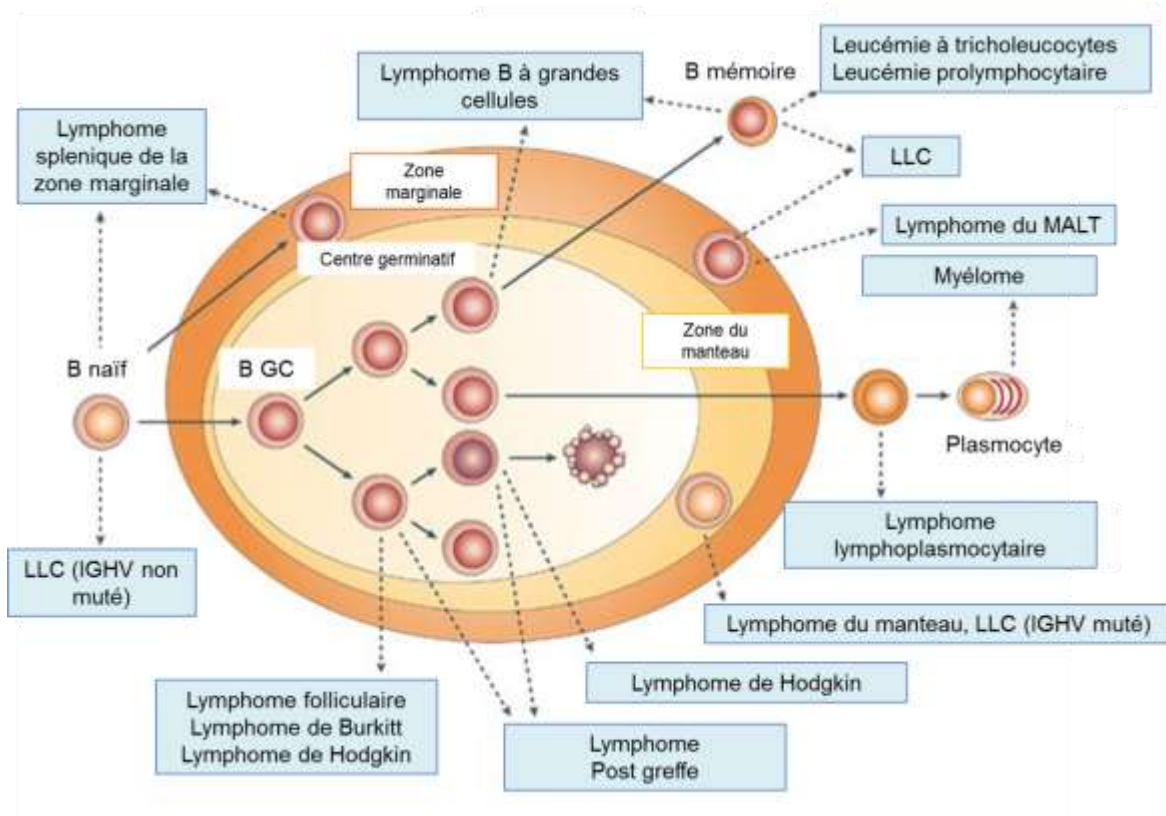


Figure 6 : *Equivalent physiologique des principaux syndromes lymphoprolifératifs B (d'après Küppers, 2005)³²*

Bien que certaines anomalies aient lieu au stade pré-B, la question des évènements conduisant à la transformation cellulaire au stade mature se pose.

La dérégulation de la signalisation du BCR est commune à tous les lymphomes B. L'activation constitutive du BCR joue un rôle central dans la survie et la prolifération des cellules (en particulier la LLC, le lymphome du manteau, le lymphome B diffus à grandes cellules). L'activation du BCR peut se faire à travers deux mécanismes distincts : Le premier mécanisme est lié à une signalisation tonique ou « *tonic BCR signaling* ». C'est un signal permanent qui permet à la cellule B de survivre sans stimulation antigénique. Le deuxième mécanisme est appelé « *chronic active BCR* » ou signalisation chronique liée à l'antigène. Le signal induit par la fixation à l'antigène induit plusieurs voies de signalisation (telles que PI3K/AKT/mTOR, MAP kinases, NFAT et BTK/PKC β /NF- κ B) pour promouvoir la survie et la prolifération⁶⁶⁻⁶⁹. Cette activation du BCR a une conséquence majeure en thérapeutique puisqu'il est possible de cibler directement des intermédiaires de signalisation de cette voie par des inhibiteurs de tyrosines kinase. Nous présentons un exemple du rôle important de la signalisation du BCR dans une étude fonctionnelle que nous avons réalisé dans le lymphome à cellules du manteau en **Annexe 1**.

Dans ce travail de thèse, nous nous focaliserons sur la leucémie lymphoïde chronique (LLC), un syndrome lymphoprolifératif B chronique fréquent dont l'origine n'est pas définie par une translocation chromosomique récurrente, ni à des mutations somatiques acquises communes mais qui au stade leucémique montre une grande hétérogénéité génétique entre les patients et une architecture clonale complexe associée à un rôle prépondérant de la voie du BCR. Dans le domaine de la cancérologie, la LLC est un modèle idéal pour étudier l'évolution génétique clonale et l'hétérogénéité génétique inter- et intra-tumorale car contrairement aux autres lymphomes, les cellules de LLC sont présentes par définition dans le sang périphérique ce qui rend l'accès au matériel tumoral aisé. L'étude de la maladie et de son évolution est facilitée grâce à la réalisation de simples prélèvements sanguins. Ceux-ci sont réalisés à différents moments de l'évolution de la maladie (phase stable, phase évolutive, rechute) et permettent d'analyser l'évolution clonale. Nous nous concentrerons en particulier sur le rôle de certaines anomalies génétiques dans le développement de la maladie et leur contribution à la résistance au traitement.

2. La Leucémie Lymphoïde Chronique

2.1. Définition

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est un syndrome lymphoprolifératif chronique caractérisé par une prolifération clonale de lymphocytes B matures, responsable d'une infiltration sanguine, médullaire, ganglionnaire et des autres organes lymphoïdes. Ces lymphocytes B clonaux ont un phénotype caractéristique et expriment en grande majorité le CD5. D'après la classification OMS 2016 des néoplasies lymphoïdes, le diagnostic est porté lorsque la population lymphocytaire B présentant le phénotype de LLC est supérieure à 5G/L dans le sang périphérique⁷⁰.

Les patients présentant une population de type LLC circulante inférieure à 5 G/L et sans adénopathies ont un diagnostic de lymphocytose B monoclonale (ou MBL pour *monoclonal B cell lymphocytosis*). La présence d'un clone MBL constitue un stade pré-leucémique mais seule une fraction minoritaire de ces patients évolue vers une LLC. Enfin le terme de lymphome lymphocytaire correspond à une atteinte essentiellement ganglionnaire, splénique ou extra-médullaire de la population de type LLC, avec toutefois une phase leucémique possible mais inférieure à 5 G/L.⁷¹

2.2. Épidémiologie

La LLC est la plus fréquente des leucémies de l'adulte dans les pays Occidentaux. En France, le nombre de nouveaux cas annuel en 2012 était estimé à 4464 d'après l'Institut de Veille Sanitaire, ce qui représente environ 13% des hémopathies malignes. Il existe une prédisposition masculine, avec 60% des cas survenant chez les hommes.³⁹

Les études menées par l'institut national du cancer aux Etats-Unis, le SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) ont montré une prédisposition de la maladie dans la population blanche par rapport aux populations noire, asiatique et aux habitants des îles du Pacifique.^{73,74}

La LLC est une maladie du sujet âgé. Elle est inexistante chez l'enfant jusqu'à 14 ans, extrêmement rare entre 15 et 49 ans puis le taux d'incidence augmente avec l'âge. Plus de 44 % des cas sont observés chez les plus de 75 ans et l'âge médian au diagnostic est de 71 ans chez l'homme et 74 ans chez la femme.⁷⁵

Il n'existe pas de facteur de risque formellement identifié qui favoriserait la survenue de la maladie. Le rôle de l'exposition aux radiations ionisantes ou aux agents chimiques dans l'incidence de la LLC n'est pas encore totalement élucidé. Les principaux facteurs de risques connus sont l'âge avancé et l'existence d'une histoire familiale de leucémie ou de lymphome qui est retrouvée chez 5 à 10% des patients, évoquant une susceptibilité génétique à la maladie^{73,75-77}. Le risque de développer un lymphome lymphoplasmocytaire ou une leucémie à tricholeucocytes est également augmenté chez ces patients.^{73,75,78,79}

2.3. Diagnostic

Présentation clinique

Le diagnostic de LLC est porté dans plus de 80% des cas lors de la découverte fortuite d'une hyperlymphocytose au cours d'un examen de routine alors que le patient est encore asymptomatique⁸⁰. Dans certains cas, les malades au diagnostic peuvent présenter un syndrome tumoral avec des adénopathies périphériques et/ou une splénomégalie, une anémie ou une thrombopénie.

Une altération de l'état général, une fièvre ou des sueurs nocturnes ainsi qu'une augmentation rapide de la taille d'un ganglion témoigne d'une maladie progressive et doivent évoquer une transformation en lymphome de haut grade de malignité (syndrome de Richter).

Diagnostic biologique

Du fait de la présence systématique des cellules tumorales dans le sang périphérique, le diagnostic de LLC se fait à partir d'une prise de sang et repose sur la numération sanguine, le frottis sanguin (analyse morphologique des cellules) et l'immunophénotypage lymphocytaire.

L'**hémogramme** met en évidence une hyperlymphocytose supérieure à 5 G/L. L'examen du frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa permet de préciser la morphologie des cellules lymphoïdes. Les cellules leucémiques de LLC ont classiquement un aspect de petites cellules matures, un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, un cytoplasme basophile dépourvu de granulation, une chromatine dense et mottée conférant un aspect fissuré et habituellement sans nucléole visible. La présence de nombreuses ombres nucléaires (ombres de Gümprrecht), marqueur de la fragilité des membranes cytoplasmiques et nucléaires des cellules leucémiques, est un critère diagnostique cytologique supplémentaire.

L'**immunophénotypage lymphocytaire** par cytométrie en flux est indispensable pour le diagnostic de LLC. Il permet d'affirmer le caractère monoclonal de la prolifération lymphocytaire et de différencier la LLC des autres syndromes lymphoprolifératifs par le profil des marqueurs de surface.

Les cellules leucémiques portent les antigènes caractéristiques du lignage B : le marqueur pan-B **CD19** et le marqueur des cellules B matures **CD20**, dont l'intensité d'expression est généralement diminuée dans la LLC.

Chaque clone de cellule leucémique exprime à sa surface un seul type de **chaîne légère d'immunoglobuline** composant le BCR, kappa ou lambda, caractérisant la nature monotypique de la prolifération lymphocytaire. L'intensité d'expression des chaînes légères de surface est diminuée sur le clone leucémique par rapport aux lymphocytes B normaux.

La molécule **CD5**, antigène normalement exprimé par les cellules lymphoïdes T et par une sous-population de lymphocytes B naïfs, est retrouvée de façon constante à la surface des cellules leucémiques. Le **CD23**, récepteur de faible affinité du fragment Fc des IgE (FcεRII) et marqueur d'activation des lymphocytes B, est également habituellement présent. Le **FMC7** est négatif alors qu'il est présent sur les lymphocytes B physiologiques. Enfin, le **CD22** et le **CD79b** (chaîne composant le BCR) sont peu exprimés voire absents.^{81,82}

L'ensemble de ces observations phénotypiques a permis d'établir le score Royal Marsden Hospital (RMH), encore appelé score de Matutes⁸³. Ce score attribue une valeur de 1 à une positivité du CD23, du CD5, une négativité ou une faible expression du FMC7 et du CD22

(ou du CD79b dans le score modifié par Moreau ⁸¹) et une faible expression de la chaîne légère kappa ou lambda. Un score de 4 ou 5 est compatible avec une LLC, un score de 3 peut correspondre à une LLC de phénotype atypique et un score inférieur à 3 doit faire remettre en cause le diagnostic de LLC.

Marqueur	1 point	0 point
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
CD22 OU CD79b	Faiblement exprimé ou négatif	Fortement exprimé
Chaînes légères de surface	Faiblement exprimées	Fortement exprimées

Tableau 1 : Critères immunophénotypiques pour le diagnostic de la LLC (score de Matutes, modifié par Moreau)^{81,83}.

2.4. Classification anatomo-clinique

Les classifications de Rai et Binet permettent la stratification pronostique des patients atteints de LLC ^{84,85}. Ces classifications sont basées sur des critères cliniques d'extension de la maladie aux aires lymphoïdes (adénopathies, hépatomégalie, splénomégalie) et sur l'hémogramme (anémie, thrombopénie) afin de classer les patients en 5 stades (0 à IV) pour la classification Rai ou en 3 stades (A à C) pour la classification de Binet. En France, la classification de Binet reste le système de classification le plus utilisé (**Tableau 2**).

Stade	Définition
Stade A : bon pronostic	Moins de 3 aires lymphoïdes atteintes, Hb \geq 100 g/L et plaquettes $>$ 100 G/L
Stade B : pronostic intermédiaire	Plus de 3 aires lymphoïdes atteintes, Hb $>$ 100 g/L et plaquettes $>$ 100 G/L
Stade C : mauvais pronostic	Hb $<$ 100 g/L et/ou plaquettes $<$ 100G/L quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes

Tableau 2 : Classification de Binet⁸⁵. (Hb : hémoglobine)

Au diagnostic, environ 80% des patients sont en stade A et ne nécessitent qu'une simple surveillance. Environ la moitié évoluent vers un stade B ou C et nécessiteront un traitement.

Bien que ces classifications datent de plus de 30 ans, elles restent encore largement utilisées du fait de leur simplicité d'application et parce qu'elles permettent une bonne classification pronostique du patient. Ainsi, un patient LLC au stade A de Binet ou 0 de Rai a une probabilité de survie à 10 ans supérieure à celle d'un patient au stade C de Binet ou III-IV de Rai (**Figure 7**).

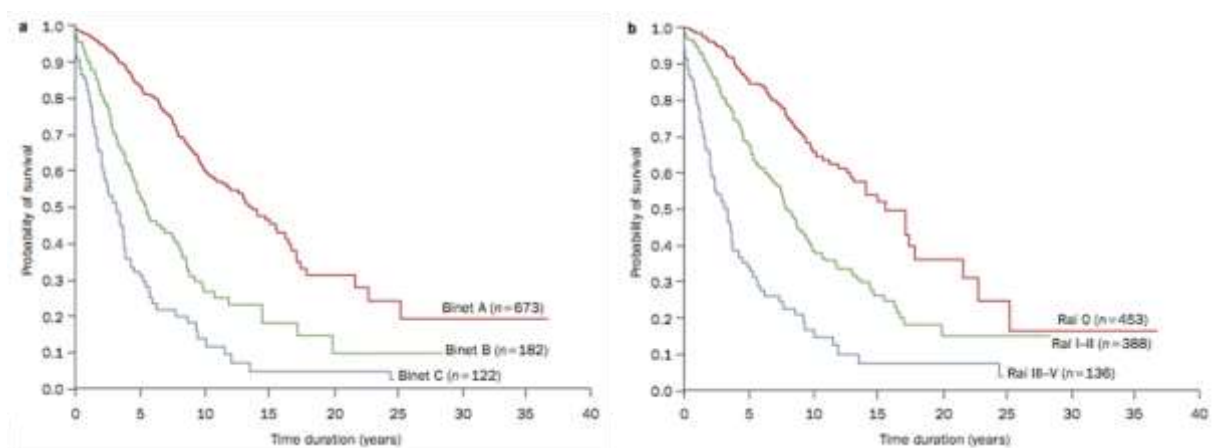


Figure 7 : Survie globale des patients LLC selon la classification clinique de Binet (a) et de Rai (b). D'après Monserat et al⁸⁶.

Cependant, le stade pronostic d'un patient n'est pas fixe et peut progresser vers des formes plus agressives notamment au stade précoce de la maladie. De plus, la limite de ces classifications cliniques est qu'elles ne permettent pas d'estimer la réponse au traitement.

2.5. Marqueurs pronostiques de la LLC

La LLC est une maladie d'évolution clinique très hétérogène. La survie des patients atteints peut varier de quelques mois à plus de 15 ans.^{87,88} La recherche de marqueurs pronostiques est donc nécessaire pour prédire l'évolution de la maladie et ainsi orienter la prise en charge thérapeutique.

2.5.1. Marqueurs de prolifération tumorale

Hémogramme

Le temps de doublement des lymphocytes est le nombre de mois nécessaires pour que la valeur absolue des lymphocytes sanguins double, ce qui donne une indication sur l'évolutivité de la maladie. Un temps de doublement court est lié à un taux de prolifération lymphocytaire élevé et donc à une maladie plus agressive. Le temps de doublement lymphocytaire est corrélé au stade clinique et au niveau d'infiltration médullaire.^{89,90} Un temps de doublement de lymphocytes inférieur à 6 mois est un des critères devant faire initier le traitement.⁹¹

Marqueurs sériques

La **lactatedéshydrogénase** (LDH) est une enzyme du métabolisme catalysant la transformation du pyruvate en lactate dont le taux est augmenté dans la LLC comme dans d'autres lymphomes. Le taux de LDH reflète donc la masse tumorale. Un taux élevé de LDH est un marqueur de mauvais pronostic, de mauvaise réponse au traitement et peut faire suspecter une transformation en syndrome de Richter.^{92,93}

La **β 2-microglobuline** (B2M) est un constituant du CMH de classe I. Elle est présente sur toutes les cellules nucléées de l'organisme et est synthétisée par les lymphocytes T CD8, les

lymphocytes B et les cellules tumorales. Un taux sérique de B2M important est corrélé à un stade clinique avancé du patient avec une masse tumorale élevée.⁹⁴¹¹

La **thymidine kinase** (TK) est une enzyme cellulaire qui a un rôle clé dans la réparation de l'ADN. Deux isoenzymes ont été mises en évidence dans les cellules : TK1 de localisation cytosolique et TK2 mitochondriale. C'est essentiellement la TK1 (95%) qui est responsable de l'activité de l'enzyme qui augmente quand le cycle cellulaire passe de la phase G1 à la phase S, ce qui en fait un marqueur de prolifération cellulaire.⁹⁵ Un taux élevé de TK a été associé à une maladie plus agressive qui évolue rapidement chez les patients de stade A.^{94,9622}

Expression du CD38

Le **CD38** est une glycoprotéine transmembranaire exprimée par de nombreuses cellules hématopoïétiques, notamment les lymphocytes B et T activés. Il joue un rôle dans l'interaction cellule-cellule, la migration et la transduction du signal. Sa liaison avec le CD31 augmente la survie cellulaire en inhibant l'apoptose dans les centres germinatifs. Dans la LLC, un niveau d'expression élevé du CD38 est associé à un stade clinique avancé, une lymphadénopathie et une hépatomégalie plus fréquente.⁹⁷ Il semble être un marqueur pronostique indépendant reflétant la présence d'un pool prolifératif.⁹⁸³⁻⁵³⁻⁵ Cependant son intérêt reste discuté du fait d'une expression inconstante au cours de la maladie et qu'il n'existe pas de valeur seuil de positivité clairement définie.

2.5.2. Marqueurs de prolifération liés à la signalisation du BCR

Mutations somatiques des gènes des immunoglobulines

Dans la LLC, les cellules tumorales des patients possèdent des degrés variables de mutation somatique des gènes des immunoglobulines *IGHV*. Il est possible de constituer deux groupes de patients de pronostic différent en fonction du statut mutationnel des gènes *IGHV*. Pour établir ce statut mutationnel, le réarrangement *IGHV* est étudié par séquençage dans les lymphocytes B de LLC. La séquence obtenue, spécifique du clone tumoral, est comparée avec des séquences *IGHV* de référence en conformation germinale. Ainsi, le caractère non muté est

défini lorsque la séquence des gènes *IGHV* des cellules leucémiques présente une identité supérieure ou égale à 98% par rapport à la séquence de référence. A l'inverse, une identité inférieure à 98% définit le statut muté.⁹⁹ Les patients dont le statut *IGHV* est muté ont un pronostic favorable et une excellente réponse au traitement par chimiothérapie en l'absence d'anomalie de *TP53*. A l'inverse, les patients dont le statut *IGHV* est non muté ont un pronostic défavorable. L'impact pronostic du statut mutationnel *IGHV* dans la LLC a été décrit pour la première fois dans deux études en 1999 et reste aujourd'hui un des plus pertinents facteurs pronostics^{100,101} (**Figure 9**).

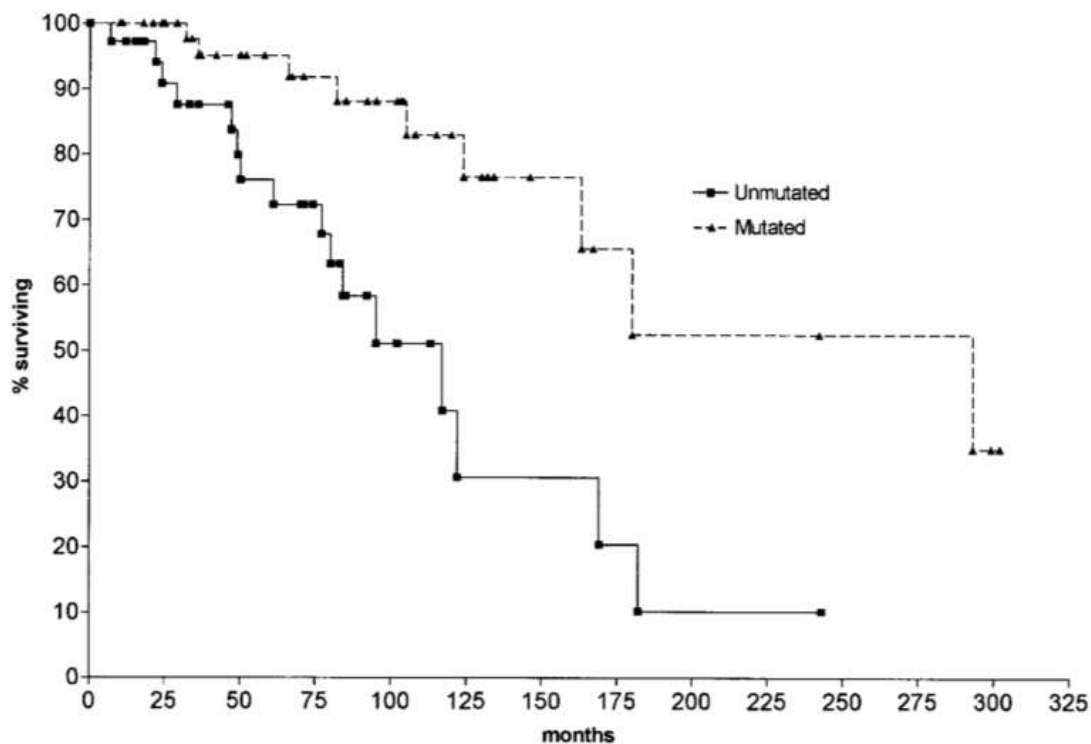


Figure 7 : Courbes de survie comparant des patients atteints de LLC avec des gènes *IGHV* mutés et non mutés. La médiane de survie des LLC *IGHV* non mutés de 117 mois contre 293 mois pour les LLC *IGHV* mutés. D'après Hamblin et al¹⁰¹.

Par ailleurs, le répertoire B des réarrangements VDJ des cellules de LLC est restreint. Dans des conditions physiologiques, le répertoire des lymphocytes B est déterminé par les réarrangements aléatoires des gènes V_H , D_H , J_H , aboutissant en théorie à un nombre de combinaisons proche de 10^9 . Dans la LLC, certains réarrangements sont surreprésentés ce qui

suggère d'une part le rôle d'une stimulation antigénique qui sélectionne certains clones et d'autre part, que tous les lymphocytes B n'ont pas la même capacité à engendrer une LLC. Il a été montré que l'utilisation préférentielle de certains gènes VH était également corrélée au pronostic des patients. Certains gènes VH sont préférentiellement utilisés chez les patients *IGHV* non mutés (IGHV1-69, IGVH4-39 notamment), alors que d'autres sont plus fréquemment retrouvés dans les populations *IGHV* mutées (IGHV4-34, IGHV3-7, IGHV3-23).

De plus, l'analyse des séquences hypervariables CDR3 des chaînes lourdes et légères, principal déterminant pour la reconnaissance de l'antigène, ont permis d'identifier des séquences en acides aminés presque identiques, définissant des sous-ensembles (ou *subset*) de CDR3 stéréotypés.^{102,103}

La mise en évidence de BCR stéréotypés chez les patients atteints de LLC suggère un rôle clé de l'antigène dans la leucémogénèse.^{104,105} Il existe à ce jour, une centaine de *subsets* de CDR3 et environ 30% des patients possèdent un BCR stéréotypé.¹⁰⁶ Au sein de ces sous-ensembles, les patients ont des caractéristiques cliniques communes.¹⁰⁷ Le subset 1 inclut des patients qui portent tous des gènes *IGHV* non mutés et ayant un pronostic particulièrement défavorable alors que le sous-ensemble 4 inclut des patients ayant des gènes *IGHV* mutés, un âge jeune au diagnostic et ayant rarement besoin d'un traitement. Le subset 2 associé au réarrangement IGHV3-21 est de pronostic défavorable indépendamment du statut mutationnel. Ceci suggère un rôle central du BCR dans la pathogénèse.

La présence de LLC avec *IGHV* mutés ou non mutés soulève la question de l'origine cellulaire différente entre les deux groupes, et donc de la possibilité de deux maladies distinctes, l'une pré-centre germinatif et l'autre post-centre germinatif. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'évolution clinique est clairement différente entre les deux groupes. Pourtant, au début des années 2000, une étude transcriptomique par microarray a permis de montrer que les cellules de LLC présentaient une signature d'expression génique commune à toutes les LLC quel que soit le statut mutationnel *IGHV*, distincte des autres lymphomes. Ceci suggère un mécanisme physiopathologique commun malgré un stade de maturation différent entre les LLC *IGHV* mutés et non mutés. Cependant, l'étude a montré qu'il existait une expression différentielle de gènes entre les LLC *IGHV* mutés et non mutés, parmi lesquelles des gènes de l'activation de la cellule B. En analyse supervisée l'expression de *ZAP70*, un

gène codant pour une kinase impliquée dans la transduction du signal du récepteur T à l'antigène (TCR) faisait partie des gènes les plus exprimés de façon différentielle, *ZAP70* étant plus exprimé dans les LLC *IGHV* non mutés¹⁰⁸.

Expression de la protéine ZAP-70

La protéine ZAP-70 (*Zeta-Associated Protein 70 kDa*) est une tyrosine kinase intracellulaire de la famille SYK partenaire du complexe CD3 associé au récepteur des lymphocytes T (TCR) et du récepteur FcγRIIIA (CD16) des lymphocytes NK où elle joue un rôle dans la transduction du signal. ZAP-70 ne semble pas être détectée dans les cellules B matures normales. L'expression de ZAP-70 par les cellules leucémiques constitue un facteur pronostique péjoratif avec une évolution défavorable de la maladie mais sa corrélation au statut non muté des gènes *IGHV* demeure imparfaite^{109–112}.

2.6. Evolution

Transformation en lymphome de haut grade

Dans 5 à 10% des cas, une transformation en lymphome B diffus à grandes cellules ou syndrome de Richter peut survenir. Il s'agit d'un lymphome agressif, le pronostic des patients est alors très péjoratif, avec une médiane de survie abaissée à 4 mois. L'atteinte est localisée au niveau d'un territoire ganglionnaire dont la taille évolue rapidement. Le patient présente des signes cliniques fréquemment rencontrés dans les lymphomes : altération de l'état général, amaigrissement et sueurs associés à de volumineuses adénopathies superficielles ou profondes. La transformation pourrait être liée à une évolution clonale de la maladie qui accumule des anomalies génétiques, tout en conservant des similarités génétiques et phénotypiques avec la LLC initiale. Des mutations du suppresseur de tumeur *TP53*, la perte de *CDKN2A*, les mutations de *NOTCH1* et l'activation de *MYC* contribuent au développement du lymphome de Richter.¹¹³ Les patients atteints de LLC avec une mutation de *NOTCH1* et un statut mutationnel *IGHV* non muté utilisant le VH4-39 avec un CDR3 stéréotypé appartenant au subset 8 ont un risque accru de transformation.^{114,115}

2.7. Traitements de la LLC

L'évolution clinique de la LLC est hétérogène et par conséquent la décision de traiter le patient prend en compte le stade de la maladie. Les patients stables et non évolutifs ne sont pas traités et nécessitent une simple surveillance. Un traitement sera proposé aux patients évolutifs. Les traitements reposent principalement sur l'utilisation d'immunochimiothérapie ou de thérapies ciblées en fonction des caractéristiques biologiques de la maladie, de l'âge et de l'état de santé du patient. Les rechutes sont fréquentes et nécessitent l'utilisation de nouvelles lignes de traitement. Il n'existe pas de traitement curateur de la LLC à ce jour.

2.7.1. Chimiothérapie

Les chimiothérapies utilisées dans la LLC comprennent :

- Les **analogues des purines** (la fludarabine, la pentostatine et la cladribine). Ce sont des analogues fluorés de l'adénine à action anti-tumorale par inhibition de la synthèse de l'ADN. Les patients porteurs d'une anomalie de la voie p53 (mutation de *TP53* ou délétion 17p) sont systématiquement résistants aux analogues des purines, la voie de réponse au dommage de l'ADN n'étant pas fonctionnelle.
- Les **agents alkylants** (le chlorambucil, la bendamustine et le cyclophosphamide) qui induisent une inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN. Ils sont peu efficaces en monothérapie et sont souvent associés à un anticorps monoclonal et/ou un analogue des purines. La bendamustine a également des propriétés anti-métaboliques.

2.7.2. Immunothérapie

L'immunothérapie repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre un antigène spécifique des cellules tumorales, induisant une cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps. Le **rituximab**, l'**ofatumumab** et l'**obinutuzumab** (GA101) sont dirigés contre le CD20, un antigène spécifique des lymphocytes B. L'alemtuzumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le CD52 (glycoprotéine principalement exprimée à la surface des lymphocytes B et T). Il est de moins en moins utilisé depuis l'arrivée des thérapeutiques ciblées chez les patients présentant une anomalie de p53^{116,117}.

2.7.3. Thérapies ciblées

L'arsenal thérapeutique de la LLC s'est considérablement modifié au cours des 5 dernières années grâce à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie qui ont permis le développement de thérapies ciblant spécifiquement des voies cruciales dans la biologie de la LLC. Ces inhibiteurs ciblent la voie du BCR et de l'apoptose. Ils représentent une avancée majeure pour les patients porteurs d'une mutation de *TP53* et/ou délétion 17p chez qui ils sont efficaces, puisqu'ils contournent la voie de p53.

Inhibiteur de la voie du BCR

L'**ibrutinib**, inhibiteur de BTK (*Bruton Tyrosine Kinase*), un intermédiaire de signalisation précoce dans la voie du BCR, est le premier inhibiteur à avoir été utilisé en thérapeutique dans la LLC. Il agit en formant une liaison covalente irréversible avec le résidu cystéine 481 situé au niveau du site actif de BTK, empêchant ainsi l'activation et la propagation du signal du BCR mais aussi des voies d'activation chimiokines (CXCR4/CXCR5) qui participent à l'ancrage ganglionnaire. L'**idelalisib** cible l'isofome δ de la PI3K, un autre effecteur de ces voies de signalisation. Il agit en inhibant sélectivement la fixation de l'ATP sur la PI3K δ et bloque la propagation du signal notamment délivré par le BCR^{118,119}.

L'interruption de ces voies de signalisation induit une diminution de la survie, de la prolifération et de l'interaction des cellules tumorales avec le microenvironnement ganglionnaire, et s'accompagne généralement d'une réduction rapide de la masse ganglionnaire associée à une hyperlymphocytose sanguine transitoire par chasse des lymphocytes du ganglion vers le sang.

Malgré la très bonne efficacité de l'ibrutinib, même chez les patients porteurs d'altérations de p53, des mutations de résistances sur *BTK* et la *PLCG2* sont identifiées chez des patients qui ré-évoluent sous traitement¹²⁰. (Annexe 3)

Inhibiteur de la protéine anti-apoptotique BCL-2

Ces inhibiteurs sont représentés par le **Vénétoclax**, une molécule appartenant à la famille des BH3-only mimétiques. Physiologiquement, les molécules BH3-only sont des protéines pro-apoptotiques dont les rôles principaux sont d'inhiber des protéines pro-survie comme BCL-2 et d'activer des effecteurs directs de l'apoptose. Le vénétoclax est un inhibiteur sélectif puissant de BCL-2, molécule anti-apoptotique constamment surexprimée dans la LLC. Il se fixe au niveau du sillon reconnu par les protéines BH3-only et permet ainsi le déplacement des protéines pro-apoptotiques comme BIM. Il en résulte une activation des protéines effectrices de l'apoptose. L'efficacité du Venetoclax est indépendante de la présence d'anomalies de *TP53* (mutation/délétion)^{121,122}. La présence de mutations de résistance sur *BCL2* a néanmoins été identifiée chez certains patients qui ré-évoluent sous traitement¹²³.

2.7.4. Indication de traitement et schémas thérapeutiques

Les recommandations de l'IWCLL (*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*)¹²⁴, actualisées en 2018, préconisent la mise en place d'un traitement pour les patients atteints de LLC de stade C ainsi que ceux atteints de LLC de stade A et B avec critères de maladie active. Il s'agit de patients présentant des adénopathies et/ou une splénomégalie, volumineuses, progressives ou symptomatiques, une augmentation rapide de la lymphocytose avec temps de doublement des lymphocytes court ou des signes généraux.

Lorsque la décision de traiter est prise, les schémas thérapeutiques tiennent compte de l'état général du patient (condition physique et âge) et de la présence d'anomalies de *TP53*.

Pour les patients en bonne condition physique et sans anomalies de *TP53*, l'immunochimiothérapie associant la fludarabine, le cyclophosphamide et le rituximab (FCR) constitue actuellement le traitement de référence. Le schéma FCR est particulièrement bénéfique pour les patients avec statut mutationnel *IGHV* muté et permet d'obtenir une rémission à long terme¹²⁵. La toxicité de la combinaison FCR est accrue chez les patients âgés, il est donc préférable d'utiliser l'association bendamustine et rituximab (BR).

Chez les patients âgés (>75 ans) et/ou présentant des comorbidités, un traitement d'emblée par ibrutinib peut être envisagé.

Pour les patients avec anomalies de *TP53* (mutation de *TP53* et/ou délétion 17p), l'utilisation d'analogues des purines est contre-indiquée car les clones porteurs de ces anomalies sont résistants à la fludarabine. L'utilisation de l'ibrutinib, éventuellement associé au rituximab sera indiquée, puisque les inhibiteurs du BCR contournent la voie p53. Enfin, en première ligne de traitement, le vénétoclax doit être réservé aux patients ne pouvant recevoir des inhibiteurs du BCR.

Malgré les avancées thérapeutiques réalisées ces dernières années, les rechutes restent fréquentes. Une nouvelle ligne de traitement est alors proposée aux patients et adaptée en fonction de l'évolution clonale de la maladie (acquisition de mutations de *TP53*, *BTK*, *PLCG2*, *BCL2*) et limite progressivement les options thérapeutiques.

2.8. Physiopathologie de la LLC

2.8.1. Défaut d'apoptose

Les cellules de LLC dans le sang sont des cellules quiescentes arrêtées en phase du cycle cellulaire G0. Elles sont caractérisées par un défaut d'apoptose lié à la surexpression de protéines anti apoptotiques telles que BCL-2 (*B cell lymphoma -2*) et MCL-1 (*myeloid cell leukemia-1*).

Ces protéines anti-apoptotiques sont localisées dans la membrane externe de la mitochondrie où elles favorisent la survie cellulaire en inhibant l'action des protéines pro-apoptotiques telles que BAX et BAK. Ces dernières agissent normalement en favorisant la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération de cytochrome C dans le cytoplasme, ce qui déclenche l'apoptose par la voie des caspases. Les protéines pro-apoptotiques sont inhibées par BCL-2 et MCL-1^{126,127}.

Dans la LLC, la surexpression de BCL-2 et MCL-1 aboutit à une augmentation de la survie cellulaire par diminution de l'apoptose. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer la surexpression de ces protéines. Des études précoces ont montré qu'il existe une hypométhylation du promoteur de BCL-2 à l'origine d'une augmentation de son niveau d'expression basale dans les cellules de LLC¹²⁸. Par ailleurs, il a été montré dans un modèle murin (modèle *MDR*) porteur d'une anomalie chromosomique comparable à la délétion 13q

retrouvée chez plus de 50% des patients, que la délétion entraîne la perte d'expression des microARNs miR-15a et miR/16-1, deux régulateurs négatifs de l'expression de BCL-2. De plus, la stimulation du CD38 porté par les cellules de LLC et le CD31 favorise l'expression de BCL-2 et donc la survie cellulaire^{129,130}.

2.8.2. Prolifération

Même si l'augmentation importante du nombre de lymphocytes dans la LLC est attribuée à une accumulation de cellules par défaut d'apoptose, des études récentes ont démontré qu'il existait un pool prolifératif localisé dans les ganglions. Dans une étude menée par Mesmmer et al., des patients ont ingéré de l'eau lourde marquée au deutérium, un isotope stable non radioactif, afin de marquer l'ADN des cellules en division. L'isotope a ensuite été détecté par spectrométrie de masse pour mesurer le taux de renouvellement des cellules. L'étude a montré que les cellules tumorales proliféraient dans la moelle osseuse et dans les ganglions et que le taux de cellules générées chaque jour était inférieur à 2% de la population tumorale. Il existe donc un pool prolifératif très faible, localisé dans des sites anatomiques préférentiels alors que les cellules circulantes sont quiescentes^{131,132}. Il a été montré par ailleurs que la prolifération cellulaire est corrélée à la progression et à l'évolution de la maladie. L'expression de marqueurs tels que le CD38 ou le CD69 reflètent un clone prolifératif et est associée à une maladie de moins bon pronostic¹³³.

2.8.3. Anomalie de la réponse à la signalisation du BCR

Anomalie de la réponse à la stimulation du BCR

Le BCR est un complexe multimérique composé d'une immunoglobuline de surface associée à l'hétérodimère Ig α /Ig β (CD79a et CD79b). La liaison de l'antigène induit l'activation en cascade de kinases dont SYK et LYN, qui phosphorylent les motifs intracellulaires ITAM du CD79A et CD79B. Cette phosphorylation active les kinases BTK et PI3K et des voies en aval incluant la voie de la phospholipase C gamma 2 (PLC- γ 2), la signalisation calcique, NF- κ B, PKC et MAPKs. L'activation de phosphatases dont SHP1 et SHIP1/2 et l'activation de co-récepteurs (CD5, CD22) contribuent à la régulation négative du signal délivré par le BCR.

Dans la LLC, la signalisation du BCR joue un rôle central dans la pathogénèse.^{134,135} Il est possible de distinguer deux types de réponse à la stimulation du BCR, corrélées au statut mutationnel *IGHV* des patients. Les cellules *IGHV* non mutés, exprimant des niveaux élevés de CD38 et la molécule ZAP-70 ont généralement une bonne réponse à la stimulation du BCR.¹³⁶⁻¹³⁹ A l'inverse, les cellules *IGHV* mutées montrent une activation constitutive de certaines protéines dont la kinase ERK et ont une moins bonne réponse à la stimulation du BCR.^{140,141} Cette faible activation est proche de celle du lymphocyte B anergique.

Même si la nature des antigènes stimulant le BCR n'est pas totalement élucidée, des études ont montré que les BCR *IGHV* non mutés sont polyréactifs et reconnaissent des auto-antigènes et des antigènes du microenvironnement tels que la vimentine, MYHIIA (*myosin heavy chain IIA*), la cofilin-1, la portion Fc tail des IgG, l'ADN simple brin (ssDNA) ou double-brin (dsDNA), le lipopolysaccharide (LPS) ou des antigènes viraux.¹⁴²⁻¹⁴⁶ A l'inverse, les BCR *IGHV* mutés se lient à un ensemble plus restreints d'antigènes dont les β -(1,6)-glucanes de levures et les fragments Fc du facteur rhumatoïde.^{144,145,147,148}

Binder et al. ont également montré que des BCR recombinants de patients LLC *IGHV* non mutés étaient capables de reconnaître la vimentine et la calréticuline présentes à la surface des Nurse-Like Cells (NLC) et que leur interaction favorise la survie des cellules tumorales¹⁴³ (**Figure 8**).

En plus de la réponse dépendante de l'antigène, une capacité de signalisation autonome liée à la reconnaissance de certains épitopes du BCR qui induit sa propre dimérisation a été décrite chez certains patients. Cette activation autonome est retrouvée dans un sous-groupe de patients porteurs d'un CDR3 stéréotypé et induit une prolifération des cellules de LLC.¹⁴⁹

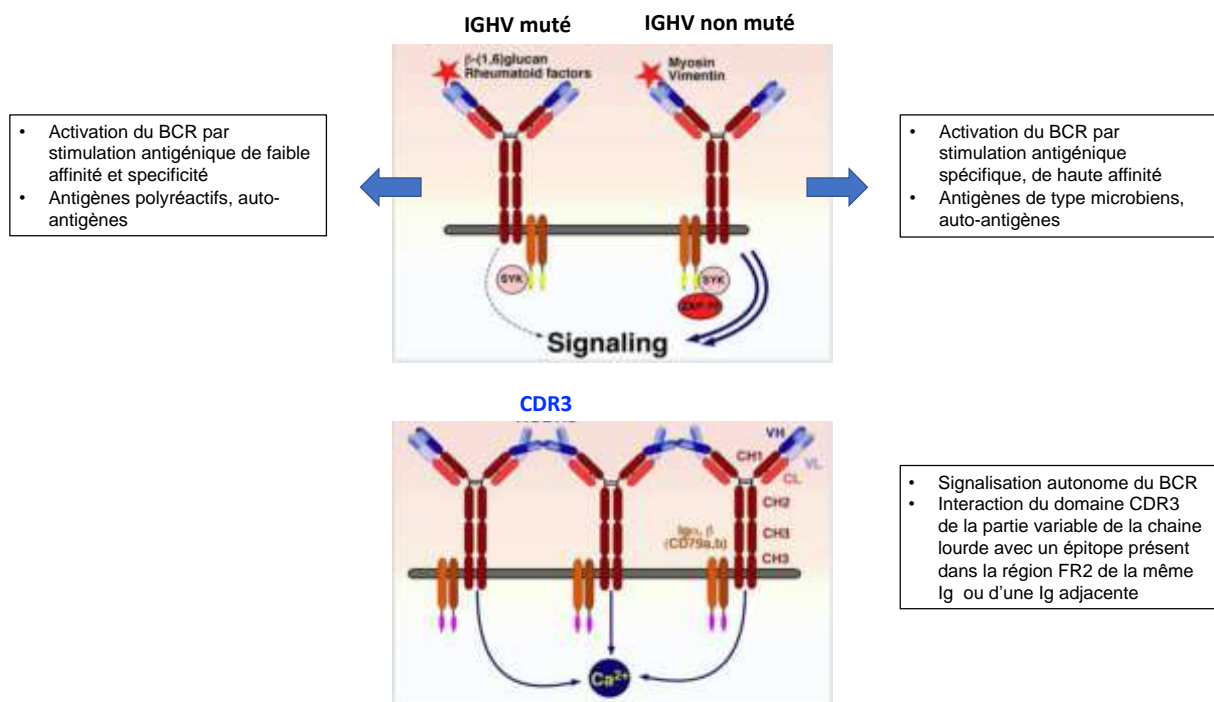


Figure 8 : Les différents mécanismes d'activation de la stimulation du BCR (D'après Burger et.al)¹⁵⁰

2.8.4. Microenvironnement tumoral

Les interactions des cellules de LLC avec les cellules qui composent le microenvironnement jouent un rôle important dans la lymphomagenèse. Le ganglion constitue un site privilégié où une certaine proportion du clone tumoral prolifère¹³¹. Le nichage des cellules de LLC ou « *homing* » dans le microenvironnement ganglionnaire est finement régulé par des interactions entre des chemokines sécrétées par les cellules stromales qui attirent et retiennent les cellules tumorales exprimant les récepteurs correspondants. Cet effet est renforcé par la présence de molécules d'adhésion à la surface des cellules de LLC.

Les cellules Nurse-like (NLC) sont d'origine monocyttaire et sont présentes dans les organes lymphoïdes de patients.^{151,152} Des études de profil d'expression génique de cellules de LLC après co-culture avec des NLC ont montré que ces dernières activent la voie de signalisation du BCR et la voie de NF- κ B dans les cellules tumorales.¹⁵³ Les NLC ont un effet chimiotactique et favorisent la survie des cellules de LLC en sécrétant des chemokines C-X-C motif ligand 12 (CXCL12) et CXCL13,^{152,154} qui ont pour récepteurs respectivement le

CXCR4 et le CXCR5 surexprimés à la surface des cellules tumorales. Les NLC attirent les cellules et favorisent leur survie en exprimant également des membres de la famille du TNF (*Tumor Necrosis Factor*) tels que BAFF (*B-cell activating factor*) et APRIL (*proliferation-inducing ligand*).⁵³

Les NLC expriment des antigènes qui peuvent activer directement le BCR des cellules de LLC, incluant la vimentine et la calreticuline.¹⁴³ L'expression du CD31 active le ligand CD38 présent sur les cellules de LLC.¹⁵⁵ A l'inverse, les cellules de LLC pourraient modifier le microenvironnement à son avantage en libérant des facteurs tels que HMGB1 (*high mobility group box 1*) qui stimulent la différenciation des NLC en activant la voie du récepteur RAGE (*receptor for advanced glycation end-product*) et les TLR9 (*toll like receptor 9*).¹⁵⁶

Les cellules stromales mésenchymateuses, telles que les cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC), sont des cellules nourricières ou « *feeders* » pour les cellules progénitrices hématopoïétiques normales. Les cellules stromales mésenchymateuses sont fréquemment retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires des patients LLC, où elles envoient des signaux de migration et de survie aux cellules tumorales.¹⁵⁷ Les cellules sont protégées de l'apoptose spontanée ou induite par les traitements par contact direct avec les BMSC.^{158,159} Les cellules stromales sécrètent également des cytokines, qui régulent la circulation des cellules de LLC et leur « *homing* » dans les ganglions ce qui renforce la survie cellulaire et la résistance aux chimiothérapies.

Les cellules de LLC interagissent également avec les cellules immunitaires T et NK. Les interactions entre le CD40 porté par les cellules B et le CD40 ligand (CD40L) des lymphocytes T sont essentielles pour la stimulation des cellules B et l'induction d'une réponse immunitaire. L'activation des cellules de LLC par le CD40L favorise également la survie cellulaire.¹⁶⁰ Dans la LLC, les sous-populations lymphocytaires T CD4+ et CD8+ sont augmentées, mais leurs fonctions semblent altérées : Elles ne parviennent pas à maintenir une synapse immunologique fonctionnelle et expriment des marqueurs d'épuisement dont PD-1 (*programmed cell death protein 1*). Les cellules de LLC quant à elles, expriment fortement le ligand de PD-1 (PD-L1).¹⁶¹⁻¹⁶⁴

Il existe donc des signaux bidirectionnels entre les cellules de LLC et le microenvironnement qui joue un rôle protecteur en attirant la cellule tumorale et en stimulant des voies qui favorisent la survie cellulaire. Le ciblage du microenvironnement par des thérapies ciblées constitue donc une stratégie thérapeutique intéressante pour lutter contre la maladie, en permettant d'interrompre les signaux de survie délivrés par le microenvironnement et la rétention des cellules tumorales dans les sites anatomiques propices à la survie des cellules de LLC.

La dépendance des cellules de LLC à leur environnement explique pourquoi la réalisation d'études *in vitro* est délicate avec les cellules primaires de patients. En effet, en l'absence de signaux de survie, ces cellules rentrent en apoptose dans les 48h dans un milieu de culture standard. Il est donc nécessaire de créer des modèles de co-culture avec des cellules stromales reproduisant le microenvironnement ou de stimuler des voies impliquées dans la survie cellulaires (activation du BCR avec des anti-IgM, stimulation du CD40 avec le CD40L ou ajout de cytokines) pour maintenir les cellules en culture afin d'analyser leurs fonctions. Les modèles animaux de LLC sont également des modèles précieux car les cellules tumorales évoluent dans des conditions physiologiques en prenant en compte les effets du microenvironnement. Ces modèles sont peu nombreux dans la LLC et il est indispensable de les développer.

2.8.5. Anomalies génétiques

Depuis une dizaine d'année, plusieurs études ont rapporté le séquençage de l'ensemble de l'exome et du génome de cellules de LLC et ont permis de dresser le portrait complexe des altérations génomiques de la LLC. Ces études ont mis en évidence une importante hétérogénéité génétique entre les patients et au sein de la tumeur, traduisant l'accumulation d'évènements génétiques au cours du processus de lymphomagenèse.

Même si un très grand nombre de mutations aux conséquences physiopathologiques diverses a été identifié, l'impact fonctionnel de la majorité d'entre elles n'est pas connu. Devant la profusion d'informations apportées grâce aux technologies de séquençage à haut-débit, il est néanmoins important de distinguer les mutations qui participent activement à la progression de la tumeur en favorisant la prolifération et la croissance tumorale (altérations génétiques

dites conductrices ou *driver*) des mutations dites passagères ou neutres, qui n'ont pas de conséquences fonctionnelles, impactant peu l'évolution tumorale.

Dans la LLC, ces altérations génétiques sont principalement des variations du nombre de copies des gènes (anomalies cytogénétiques, détectables par des techniques de FISH) ou des mutations somatiques. Elles peuvent avoir pour conséquence l'activation d'oncogènes (gènes favorisant la transformation tumorale) ou l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs (gènes capables d'inhiber la croissance cellulaire en jouant un rôle sur le cycle cellulaire ou l'apoptose).

Sur le plan clinique, de nombreuses études ont montré que l'hétérogénéité génétique reflète la variabilité d'évolution clinique entre les patients et la résistance au traitement. La compréhension du rôle de ces mutations dans l'agressivité de la maladie ou la résistance aux traitements est donc une priorité dans la LLC pour prévoir les évolutions cliniques et offrir la meilleure stratégie thérapeutique aux patients. Même si l'impact clinique et fonctionnel de nombreuses mutations sur la fonction des gènes est encore en cours d'investigation, ces mutations permettent d'identifier la nature des voies cellulaires impliquées dans la LLC. Les différentes anomalies génétiques sont discutées dans le chapitre suivant. Les données de la littérature concernant ces anomalies génétiques et leur impact clinique ont été repris dans une revue présentée en **Annexe 2**¹⁶⁵.

3. Les caractéristiques génétiques de la LLC

3.1. Altérations cytogénétiques et anomalies du nombre de copies

Depuis les années 80, les premières études génétiques s'intéressant aux anomalies du nombre de copie et reposant sur des techniques de caryotype conventionnel, de FISH et plus tard de SNP array, ont mis en évidence la présence d'anomalies cytogénétiques récurrentes dans la LLC chez plus de 80% des patients au diagnostic, révélant un premier niveau d'hétérogénéité génétique entre les patients. Toutes les études réalisées depuis ont confirmé que les anomalies chromosomiques les plus fréquentes sont les délétions partielles de chromosomes, telles que les délétions 13q (del(13q) ; 50 à 60% des cas), 17p (del(17p); 5 à 10%) et 11q (del(11q); 6 à 20% des cas), ou les gains chromosomiques telle que la trisomie 12 (tri(12); 10 à 16% des cas)^{129,166-168}. Les translocations équilibrées sont également décrites dans de plus rares cas. Ces études ont également montré que la présence de ces anomalies cytogénétiques permettent de classer les patients selon des groupes pronostiques et permettent d'appréhender l'évolution de la maladie (**Figure 10**)¹⁶⁶. Les patients présentant une délétion 17p ont de loin le plus mauvais pronostic, suivi des patients présentant une délétion 11q et ceux qui ont une trisomie 12. Les patients présentant une délétion 13q comme seule anomalie présentent la plus longue survie globale, supérieure à celle des patients pour lesquels aucune de ces anomalies n'a été retrouvée. De plus, il a été montré que plus le nombre d'anomalie génomique augmente, plus la maladie semble de mauvais pronostic¹⁶⁹.

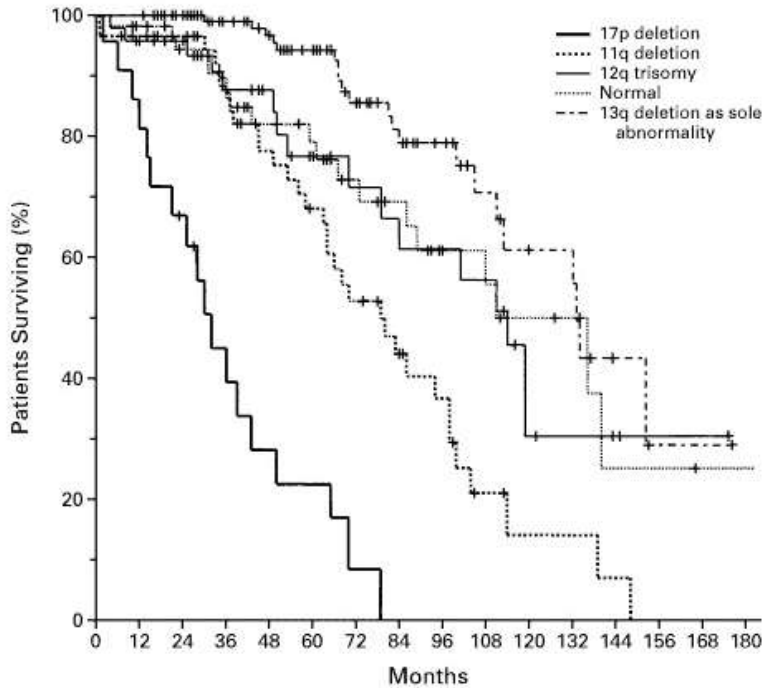


Figure 9 : Probabilité de survie depuis la date du diagnostic dans les différents groupes cytogénétiques. D'après Döhner et al. ¹⁶⁶

Sur le plan fonctionnel, la caractérisation des régions minimales délétées grâce à l'étude de la taille des délétions sur un grand nombre de cas de patients a mis en évidence la perte de loci de gènes « *drivers* » et fourni des arguments physiopathologiques pour comprendre l'impact de ces anomalies cytogénétiques dans la LLC.

Délétion 13q14

La délétion 13q14 est l'anomalie cytogénétique la plus fréquente, retrouvée chez plus de 50% des patients. Sa présence, lorsqu'elle est isolée, est associée à un bon pronostic. Elle est présente à l'état monoallélique dans la majorité des cas. La région minimale délétée inclut les micro-ARN *miR 15a/16-1* codés dans un intron du gène *DLEU2* (*Deleted in Lymphocytic Leukemia 2*). Ces micro-ARN jouent un rôle dans la régulation négative de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2 en induisant la dégradation de son transcrite. La perte de *DLEU2* et des *miR15a/16-1* jouerait donc un rôle dans l'expansion clonale B en entraînant un défaut de régulation de l'apoptose. L'importance de la délétion 13q dans la biologie de la

LLC a été montrée par Klein et al. grâce à un modèle murin *MDR* mimant la délétion 13q et comportant la région minimale délétée de façon restreinte dans les lymphocytes B^{129,130}. Ces souris ont développé des lymphoproliférations B avec des caractéristiques phénotypiques comparables à la LLC : les cellules B expriment le CD5 et un récepteur B à l'antigène non muté et stéréotypé. De plus les souris développent une LLC non agressive entre 15 et 18 mois et avec une faible pénétrance aux alentours de 25%, à l'image de la maladie indolente qu'est la LLC.

Bien que la région minimale délétée inclue toujours *DLEU2* et les *miR15a/16-1*, la taille de la délétion 13q est variable. Les délétions de plus grande taille peuvent induire la perte du gène suppresseur de tumeur *RBI*. Ce gène joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et sa perte est associée à un pronostic plus mauvais que la délétion isolée des *miR15a/16-1*. A noter que les délétions 13q bialléliques sont plus courtes et n'incluent pas le gène *RBI*. L'impact pronostique de ces délétions bialléliques est cependant mal connu¹⁶⁷.

Trisomie 12

La trisomie 12 est considérée comme un marqueur biologique de risque intermédiaire mais son impact fonctionnel sur le développement de la maladie n'est pas élucidé. Elle est fortement associée à la présence d'une mutation de *NOTCH1* et un statut mutationnel *IGHV* non muté^{166,170}. Sur le plan pathogénique, il est difficile d'établir clairement un ensemble de gènes candidats affectés par la trisomie puisque contrairement aux délétions qui ciblent une région critique, c'est l'ensemble du chromosome qui est dupliqué. Cependant, des études ont corrélées la trisomie 12 à la surexpression de gènes portés par le chromosome tels que *P27*, *CDK4*, *HIP1R*, *MYF6* ou *MDM2* mais le lien physiopathologique n'est pas toujours clair. Parmi ces gènes, *MDM2* est impliqué dans la dégradation de p53 et par conséquent, sa surexpression pourrait affecter le cycle cellulaire^{171,172}.

Délétion 11q22

La délétion monoallélique du bras long du chromosome 11 est retrouvée dans 6 à 27% des cas. La région minimale de délétion est située en 11q22.3-q23.1 qui comporte le gène

suppresseur de tumeur *Ataxia telangiectasia mutated* ou *ATM*. La copie restante d'*ATM* est généralement ciblée par des mutations, d'où l'association del(11q) et mutation d'*ATM* fréquemment retrouvée chez les patients. La délétion 11q peut aussi inclure la perte de *BIRC3* en position 11q22, un régulateur négatif de la voie NF-κB, également affecté par des mutations inactivatrices. Sur le plan clinique, la del(11q) est associée à une maladie à localisation davantage ganglionnaire, progressive et constitue un facteur de mauvais pronostic^{173,174}.

Délétion 17p

La délétion du bras court du chromosome 17 est retrouvée chez environ 10% des patients et constitue le facteur de plus mauvais pronostic. La del(17p) est associée à la perte du gène suppresseur de tumeur *TP53*. Dans presque la totalité des cas, des mutations inactivatrices sont détectées sur la copie restante du gène *TP53*. La perte d'expression de *TP53* ou expression d'une protéine mutée aboutit à une dérégulation du contrôle du cycle cellulaire et de la réponse au dommage à l'ADN. Depuis le travail pionnier publié en 2000 par Döhner et al. montrant que l'altération de *TP53* par délétion 17p est l'un des facteurs majeurs de résistance à la chimiothérapie conventionnelle, une multitude d'études ont toutes confirmé sans ambiguïté le rôle pronostique défavorable de l'altération de *TP53*, que ce soit par délétion 17p ou la mutation de *TP53*^{173,175}. L'acquisition des anomalies de *TP53* dans les cellules de LLC augmente avec l'évolution de la maladie, marqueurs de l'évolution clonale, elles sont présentes dans 10% des cas avant traitement et dans 50% des cas au moment de la transformation en Richter. Nous présentons un travail sur l'évolution des anomalies de *TP53* (délétion 17p et mutations de *TP53*) dans la LLC chez des patients à haut-risque dans le **manuscrit n°2** de cette thèse¹⁷⁶.

Autres anomalies cytogénétiques

D'autres anomalies ont été identifiées avec une incidence plus faible, parmi lesquelles le gain 2p (*amp(2p)* ; 2 à 7%), contenant *MYCN*, *REL* et *BCL11A*, le gain 8(q) (*amp(8q)* ; 2 à 4%) entraînant une amplification de *MYC*, et les délétions 8p (2 à 5%) et 15q comprenant respectivement les gènes *TNFRSF10A/B* et *MGA*¹⁷⁷⁻¹⁸¹.

3.2. Mutations somatiques

Hétérogénéité génétique inter- et intra-tumorale de la LLC

Depuis une dizaine d'année, le développement des approches de séquençage à haut-débit à l'échelle du génome a transformé notre compréhension de la génétique de la LLC et a permis de caractériser le paysage mutationnel de la maladie. Des études de séquençage haut-débit de l'exome ou du génome entier de patients ont identifié un nombre élevé d'anomalies génétiques récurrentes de façon non biaisée ce qui a fourni de nouvelles hypothèses sur les mécanismes qui sous-tendent le développement et la progression de la maladie ainsi que la résistance aux traitements. Au lieu d'identifier un événement génétique universel commun à tous les patients, ces études ont révélé l'importante hétérogénéité génétique qui existe entre les patients et qui reflète l'hétérogénéité d'évolution clinique caractéristique de la maladie. Le développement d'algorithmes et de modèle statistiques robustes a conduit à identifier des mutations vraisemblablement sélectionnées positivement au cours du processus tumorigénique et par conséquent considérées comme « *driver* » potentiels de la maladie.

Deux études récentes ont rapporté collectivement les résultats de séquençage du génome et de l'exome tumoral d'environ 1000 patients atteints de LLC et ont identifié au total 75 mutations somatiques récurrentes^{182,183}. En cumulant les résultats de ces deux études, *SF3B1*, *ATM*, *NOTCH1* et *TP53* ont été identifiés comme les gènes les plus fréquemment mutés (**Figure 11**). Le nombre élevé de cas a permis d'atteindre une puissance statistique suffisante pour mettre en évidence des mutations récurrentes dont la fréquence est inférieure à 1% et de découvrir de nouveaux gènes mutés tels que *RPS15*, *IKZF3* ou *PTPN11*. Dans la très grande majorité des cas, l'ensemble des mutations somatiques identifiées affectent des exons, mais dans la série de Puente et al., le séquençage extensif du génome a mis en évidence des mutations récurrentes au niveau de régions non-codantes avec notamment des mutations dans la région 3'UTR de *NOTCH1* ou dans un *enhancer* du gène *PAX5*. Même si ces deux cohortes de patients caractérisées par séquençage NGS font partie des plus grandes publiées à ce jour, il a été estimé qu'au moins 2000 cas de LLC seraient nécessaires pour atteindre la saturation de découverte de nouveaux *drivers*.

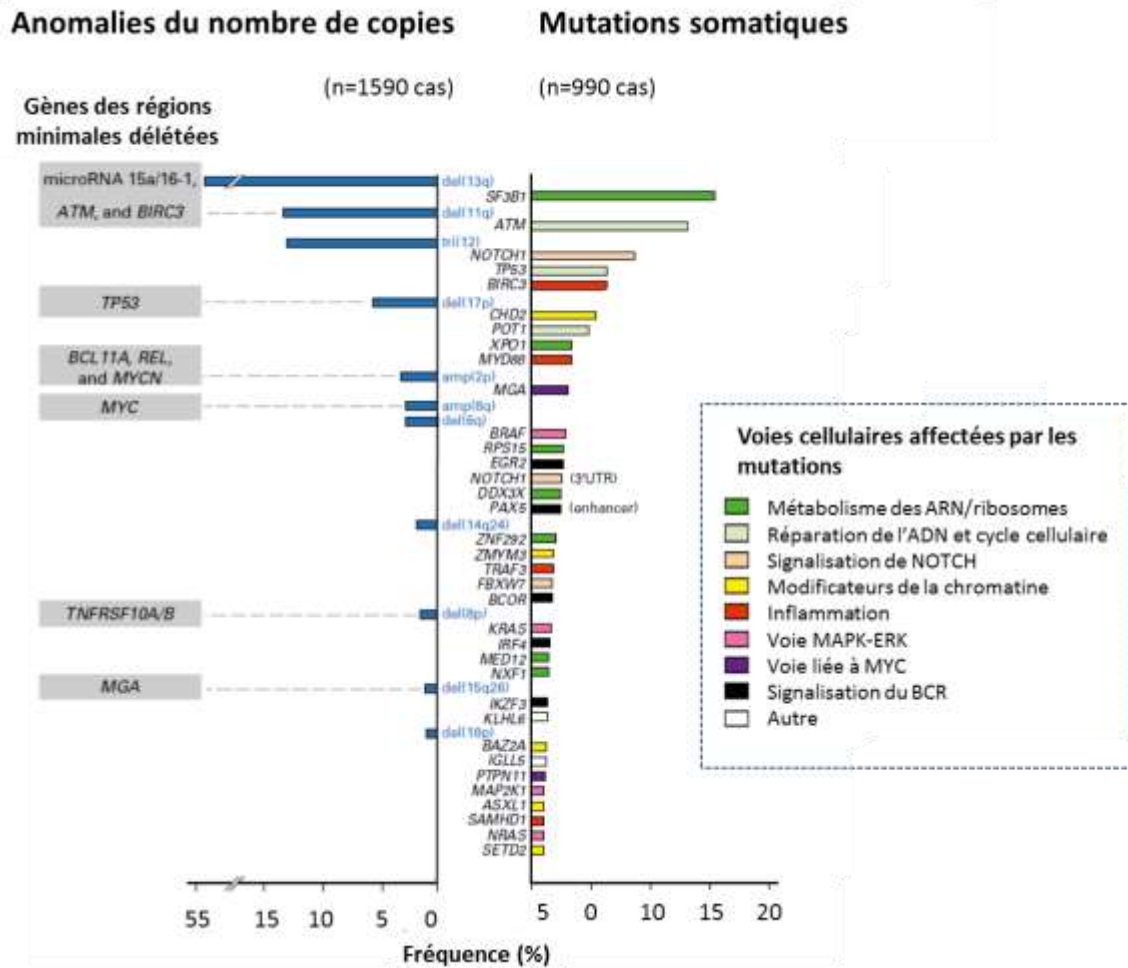


Figure 10 : Fréquence des mutations somatiques et anomalies du nombre de copies dans la LLC. Les mutations sont regroupées par voies biologiques (D'après Lazarian et.al¹⁶⁵, annexe 2)

De plus, l'hétérogénéité génétique se retrouve sur le plan intra-tumoral, plusieurs anomalies génétiques pouvant être retrouvées chez un même patient. Dans la série du Dana Farber/Broad Institute caractérisée par WES¹⁸², approximativement 60% des patients sont porteurs de plus d'une altération génomique et chaque combinaison de *drivers* retrouvée est presque unique (**Figure 12**). Plusieurs études ont mis en évidence des associations récurrentes entre mutations, suggérant des interactions préférentielles et des coopérations entre *drivers*. La délétion 17p est presque constamment associée à la mutation de *TP53*, la del(11q) avec les mutations de *SF3B1* et/ou *ATM*, et la tri(12) avec la mutation de *NOTCH1*. A l'inverse, certaines associations sont peu fréquentes voire même mutuellement exclusives, telles que

l'association entre la mutation de *SF3B1* et la mutation de *NOTCH1* et/ou la tri(12), ce qui suggère une redondance de leurs fonctions.

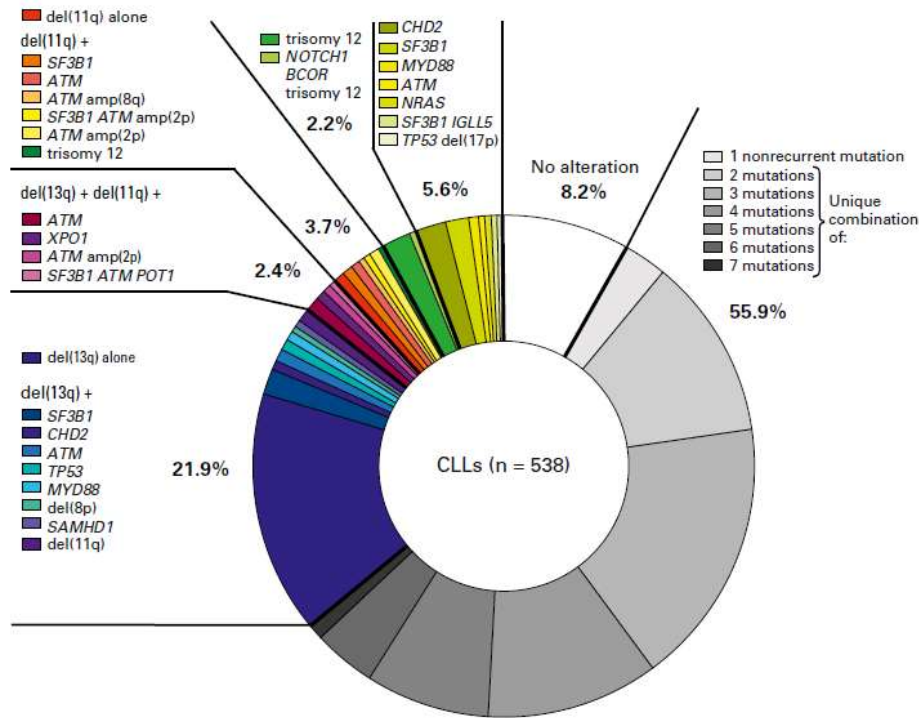


Figure 11 : Diversité des associations de mutations retrouvées au sein de la cohorte de 538 patients LLC (DFCI/Broad Institute) analysée par whole exome sequencing mettant en évidence l'importante hétérogénéité intratumorale (d'après Lazarian et al.¹⁶⁵, annexe 2)

3.3. Voies biologiques impactées par les altérations génétiques

La présence de mutations récurrentes dans des gènes codants pour des effecteurs biologiques a permis d'identifier des voies fréquemment ciblées dans la cellule tumorale et essentielles pour le développement et la progression de la maladie, et/ou la résistance au traitement.

L'indentification de voies dérégulées dans la LLC présente un intérêt majeur pour mettre en évidence des mécanismes de résistance aux traitements et guider le choix thérapeutique.

3.3.1. Voie de réponse aux dommages de l'ADN et contrôle du cycle cellulaire

La protéine p53 joue un rôle central dans le processus de réparation des dommages de l'ADN, elle assure le maintien de l'intégrité du génome en répondant aux stress extracellulaires ou aux dommages de l'ADN¹⁸⁴. En induisant ou réprimant la transcription de nombreux gènes cibles, p53 est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose de la cellule, empêchant ainsi la propagation de défauts de l'ADN et le développement de tumeurs¹⁸⁵. Son importance dans la carcinogénèse est facilement appréciable par le fait que les voies métaboliques de la protéine p53 sont altérées dans la majorité des cancers humains^{186,187}.

L'activité de p53 dépend de sa localisation cellulaire. Dans les conditions normales, l'ubiquitine ligase MDM-2 (*mouse double minute 2*) régule négativement p53 dans le cytoplasme en se liant au domaine de transactivation pour l'empêcher d'activer la transcription des gènes cibles. De plus, la protéine MDM-2 enclenche par l'ubiquitination de p53 la dégradation de la protéine au travers de la machinerie protéolytique dépendante du protéasome^{188,189}.

Dans des conditions de stress cellulaire, l'activation des voies ATM/Chk2 et ATR/Chk1 stabilise p53 par des phosphorylations qui la libèrent de l'effet régulateur négatif de la protéine MDM-2, permettant à p53 de transloquer dans le noyau pour remplir sa fonction de facteur de transcription grâce à son domaine de transactivation afin et de contrôler les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence voire l'apoptose de la cellule dont l'ADN est endommagé. Les gènes cibles de p53 incluent des protéines intervenant dans le contrôle de l'apoptose (comme les protéines mitochondriales BAX et PUMA ou des effecteurs proapoptotiques comme Fas) et dans l'arrêt du cycle cellulaire (comme p21 ou les cyclines G1). La protéine p53 joue également un rôle au niveau de la mitochondrie où elle peut induire le relargage du cytochrome c entre autre, par la formation d'un complexe avec les protéines anti-apoptotiques BCL-XL et BCL-2.

Dans la LLC, les mutations inactivatrices de **TP53** (ou la perte du locus par délétion 17p) sont fréquentes, associées à un pronostic défavorable et à une résistance aux chimiothérapies

conventionnelles¹⁹⁰. Elles jouent un rôle majeur dans la LLC en altérant les capacités de la protéine à stopper la division cellulaire et à induire l'apoptose. L'inactivation de *TP53* permet donc aux cellules de LLC, qui devraient normalement entrer en apoptose ou stopper leur cycle cellulaire pour réparer leur ADN, de survivre et de proliférer, et ainsi d'accumuler des anomalies génomiques. La défaillance de la voie p53 explique donc le phénomène de résistance à la fludarabine chez les patients porteurs d'une mutation/délétion de *TP53* en raison d'un défaut d'apoptose.

La présence d'une anomalie du gène *TP53* fait partie des critères qui définissent les patients à haut-risque avec une survie sans progression et une survie globale raccourcies. Le dysfonctionnement de la voie peut être lié soit à une délétion isolée du chromosome 17p (10% des cas), soit à une mutation isolée de *TP53* (30%), mais dans plus de la majorité des cas les deux anomalies sont associées (Figure 13)^{175,191}..

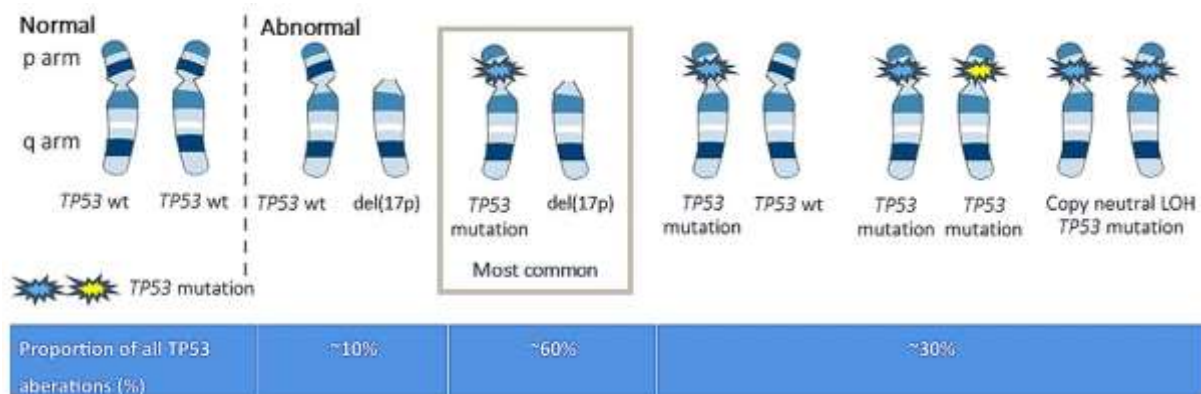


Figure 12 : Répartition des anomalies de *TP53* (D'après Campo et.al¹⁹²)

Le gène *ATM* est muté dans environ 10% des cas de LLC. *ATM* code pour une kinase jouant un rôle central dans la signalisation de réparation des dommages à l'ADN. Sa délétion et/ou mutation entraîne un défaut dans cette signalisation, conférant aux cellules une

résistance à l'apoptose, par l'inhibition de l'apoptose dépendante de la protéine p53. La perte de fonction du gène conduit à une instabilité génomique dans les cellules lésées génétiquement et ne pouvant entrer en apoptose. La mutation, lorsqu'elle est clonale, est associée à une diminution de la survie sans progression (PFS) et de la survie globale (OS) après la première ligne de traitement. L'impact pronostic des mutations sous-clonales d'*ATM* n'est pas clair. Le gène *ATM* comporte 66 exons et les mutations se répartissent sur toute la séquence du gène, sans sites préférentiels.

3.3.2. Signalisation de NOTCH

Le gène *NOTCH1* code pour un récepteur transmembranaire hétérodimérique à activité facteur de transcription. La signalisation de NOTCH1 est déclenchée par la liaison d'un ligand spécifique de la famille SERRATE/JAGGED ou DELTA, exprimé sur une cellule adjacente. L'activation du récepteur aboutit au clivage protéolytique de la partie intracellulaire du récepteur par un complexe γ -sécrétase, libérant le peptide actif NOTCH1-ICD (*NOTCH1-intracellular domain*) qui transloque dans le noyau pour contrôler la transcription de gènes-cibles régulant plusieurs voies biologiques importantes pour le contrôle de la croissance cellulaire. L'intensité et la durée du signal sont régulées par le complexe ubiquitine ligase FBXW7-SCF qui reconnaît un domaine riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T) de NOTCH1-ICD (domaine PEST), et induit sa dégradation par le protéasome¹⁹⁰.

Une mutation récurrente de *NOTCH1* a été identifiée grâce aux premières études de séquençage NGS ciblé. Dans plus de 80% des cas, il s'agit d'une délétion de 2 paires de base dans l'exon 34, c.7541_7542delCT (p.P2514fs), entraînant un décalage du cadre de lecture et la génération prématurée d'un codon STOP dans le domaine PEST. L'interruption précoce de ce domaine stabilise NOTCH1 en interférant avec sa phosphorylation et la dégradation protéasomale. Il en résulte une accumulation de NICD, une activation constitutive de la voie associée à une signature transcriptionnelle distincte. Dans la LLC, cette mutation est retrouvée dans environ 10% des cas. Les patients présentant une mutation de *NOTCH1* ont fréquemment des facteurs de mauvais pronostic associés : augmentation des LDH, profil *IGHV* non muté, une forte expression du CD38 et de ZAP-70 et la présence d'une trisomie 12. La mutation est associée de façon significative à une réduction de la médiane de survie

globale et de la survie sans progression¹⁹³⁻¹⁹⁵. Dans certaines études, la présence de la mutation de *NOTCH1* est un marqueur pronostique indépendant et identifie les patients avec un risque intermédiaire et les patients à risque de transformation en lymphome de Richter¹⁹³.

La voie NOTCH1 peut également être activée par des mutations ciblant d'autres effecteurs ou régulateurs de la voie. Des mutations perte de fonction de l'ubiquitine ligase *FBXW7* sont retrouvées dans 4.5% et ciblent le domaine de liaison au substrat W40, ce qui affecte la capacité de reconnaissance de son substrat NICD, entraînant une accumulation du peptide et une augmentation de l'activité de la voie¹⁹⁶. L'activité de FBXW7 peut aussi être modulée par la déubiquitinase USP28, codée dans la région délétée de façon récurrente 11q22-q23 à proximité du gène *ATM*. Il a récemment été suggéré que sa perte pourrait impacter l'activité de FBXW7 et activer la voie de NOTCH1. Dans une cohorte de 285 patients atteints de LLC, la faible expression d'USP28 est significativement corrélée à une augmentation de l'expression des gènes cibles de NOTCH1¹⁹⁷.

En 2015, Puente et al. rapporte pour la première fois des mutations récurrentes dans la partie 3' non transcrite du gène *NOTCH1* (*NOTCH1* 3'UTR) dans des cas de LLC non traités ou de MBL, avec une fréquence de 2%¹⁸³. La mutation en 3'UTR cible la région non codante de l'exon 34 à la position 7668+371A>G ou 7668+378A>G, générant un nouveau site de *splicing* accepteur favorisant un épissage alternatif avec un site donneur cryptique localisé dans l'exon 34. Il en résulte une troncature de la partie codante du domaine PEST et par conséquent une stabilisation du peptide NOTCH1-ICD.

3.3.3. Voie de maturation des ARNs

Grâce aux approches de séquençage à haut débit extensives, la découverte inattendue de mutations récurrentes du gène *SF3B1* a mis en évidence l'importance de la voie de maturation des ARN dans le processus oncogénique de la LLC^{198,199}. Par ailleurs, des mutations de *SF3B1* avait déjà été décrites dans les anémies sidéroblastiques et les tumeurs solides²⁰⁰⁻²⁰². Dans la LLC, la mutation est retrouvée avec une fréquence de 15 à 25 % selon les études^{182,183,194}, ce qui fait de *SF3B1* l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans la maladie.

L'épissage des transcrits est catalysé par un complexe, le spliceosome, composé d'un ensemble de petites ribonucléoprotéines (snRNPs) U1, U2, U4, U5 et U6 ainsi que de nombreux facteurs d'épissages. Le facteur d'épissage SF3B1 est un composant principal du complexe U2. Il joue un rôle central dans la maturation des pré-ARN en orchestrant le retrait d'introns. La vaste majorité des mutations est localisée dans un domaine hautement conservé carboxy-terminal, comprenant 22 répétitions de motifs HEAT (*Huntington Elongation Factor 3 PR65/A TOR*). La plupart des mutations sont rapportées entre le 5^{ème} et le 8^{ème} HEAT, codées par les exons 14 à 16, avec la mutation p.K700E représentant plus de 50% des cas¹⁹⁹.

Les premières études menées pour comprendre l'impact fonctionnel de la mutation dans la LLC ont montré que les cellules mutées avaient une activité d'épissage altérée, avec un enrichissement en ARNm non épissés par rapport aux formes épissées pour les transcrits des gènes *BRD2* et *RIOK*, connus pour nécessiter l'activité du spliceosome SF3B1 pour leur maturation^{199,203}. Des niveaux élevés de transcrits de *FOXPI* tronqués et d'autres protéines cibles du complexe SF3B1 ont également été rapportées en présence de la mutation¹⁹⁸.

Le mécanisme précis de dérégulation de l'épissage a été étudié récemment dans une étude basée sur l'exploration globale de l'épissage par RNA-sequencing et single-cell RNA-sequencing²⁰⁴. Il a été montré que la protéine mutante SF3B1 K700E conserve sa capacité à se lier aux composants du complexe de splicing U2, une petite ribonucléoprotéine nucléaire (snRNP), et sa surexpression entraîne un biais d'utilisation de sites de *splicing* alternatifs en 3', à l'origine de l'augmentation de l'expression de variants d'épissage. L'étude par *single-cell* RNA-seq a confirmé le lien entre la mutation de *SF3B1* et l'altération du splicing à l'échelle cellulaire. Compte tenu de l'importance du mécanisme de maturation des ARNm dans la régulation de l'expression génique, la mutation de *SF3B1*, en ciblant un acteur central du spliceosome, touche la maturation d'un large spectre d'ARNm, et donc entraîne l'expression différentielle de nombreux gènes affectant des voies biologiques variées impliquées dans l'oncogénèse. La mutation affecte par exemple l'activité des télomérases en entraînant la surexpression d'une télomérase codée par le gène *TERC*. Elle favorise également le *splicing* du gène *DVL2*, un régulateur négatif de la voie NOTCH, à l'origine de l'activation de la voie.

L'expression de la mutation K700E dans des lignées cellulaires reproduit les anomalies d'épissage observées dans les cellules primaires de LLC et montre une augmentation de la sensibilité aux dommages de l'ADN, comme en témoigne les niveaux élevés de γ H2AX après γ -irradiation. Dans un modèle de souris porteuse de la mutation de façon restreinte dans le lignage B, l'expression de la mutation conduit à un phénotype de senescence et un niveau élevé d'apoptose. L'expression de la mutation isolée n'est cependant pas suffisante pour induire le développement d'une LLC, suggérant que *SF3B1* nécessite la coopération avec d'autres facteurs²⁰⁵.

D'autres mutations somatiques impactent des gènes codants pour des composants ou des régulateurs de la maturation des ARN, tels que l'hélicase d'ARN *DDX3X*, la protéine d'export nucléaire d'ARNm *XPO1* ou la riboprotéine *RPS15*, ce qui souligne l'importance de ces processus biologiques dans la LLC^{182,183}.

3.3.4. Voie du BCR et des TLR et signalisation de NF- κ B

La signalisation du BCR et des TLR joue un rôle important dans la biologie de la LLC en activant la voie NF- κ B, voie qui est activée de façon constitutive et qui régule l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire et la prolifération. En plus de facteurs extrinsèques pouvant conduire à son activation, des mutations au niveau d'effecteurs ou de régulateurs de la voie participent à son activation.

MYD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) est muté de façon récurrente au niveau d'un hotspot (p.L265P) avec une fréquence de 1,5 à 4% selon les études^{206,207}. Cette mutation est retrouvée quasi exclusivement dans les LLC *IGHV* muté et sa présence est associée à un bon pronostic. MYD88 est un adaptateur des Toll-like récepteurs (TLR), recruté après stimulation des récepteurs TLR pour former un complexe avec IRAK4 (*Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 4*) qui phosphoryle IRAK1/2 pour les activer. Il en résulte un recrutement de TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*) en aval de la signalisation ce qui aboutit à la phosphorylation de I κ B α et l'activation du facteur de transcription NF- κ B^{208,209}. La mutation p.L265P a pour effet d'activer constitutivement la signalisation même en l'absence de stimulation des TLR, ce qui active NF- κ B et JAK de façon constitutive. A noter

que cette mutation a également été retrouvée dans d'autres syndromes lymphoprolifératifs tels que la maladie de Waldenström et les lymphomes B diffus à grandes cellules.

Le gène *NFKBIE* (inhibiteur de NF-κB I-kappa-B-epsilon) code pour un régulateur négatif de NF-κB, dont la fonction est de séquestrer la protéine REL dans le cytoplasme. Il joue un rôle dans le rétro contrôle tardif de la réponse de la cellule B a un stimulus externe via le BCR ou les TLRs. Dans la LLC, dans environ 7% des cas, *NFKBIE* est inactivé par une délétion récurrente de 4 pb entraînant un décalage du cadre de lecture et la formation d'une protéine tronquée. La délétion de *NFKBIE* entraîne la perte du contrôle négatif de NF-κB²¹⁰.

Le gène *BIRC3* (*Baculoviral IAP Repeat Containing 3*) code pour un membre de la famille de protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), qui régule négativement la voie non canonique de NF-κB. *BIRC3* coopère avec TRAF3/2 pour inhiber MAP3K14 (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 14*), un activateur central de la voie non canonique. Des mutations inactivatrices de *BIRC3* conduisent à l'activation de la signalisation NF-κB. Ces mutations sont retrouvées dans environ 5% des cas au diagnostic et chez 25% des patients réfractaires à la fludarabine ce qui suggère un rôle de cette mutation dans la résistance au traitement. D'autre part, le locus de *BIRC3* se trouve à proximité d'*ATM* sur le chromosome 11q. La délétion de *BIRC3* est associée au statut mutationnel *IGHV* non muté, aux mutations d'*ATM* et à la délétion 11q^{211,212}.

Enfin, d'autres effecteurs de la signalisation du BCR comprenant des kinases régulant la transduction du signal extracellulaire tels que *ERK*, *BRAF*, *KRAS*, *MAP2K1* ou des facteurs de transcriptions tels que *EGR2*, *BCOR*, *IRF4* sont affectés par des mutations^{182,183}.

3.3.5. Mutation au niveau de facteurs de transcription : exemple d'*IKZF3*

Le gène *IKZF3* code pour la protéine à doigt de zinc AIOLOS, un facteur de transcription appartenant à la famille IKAROS qui comprend 4 autres membres : IKAROS (*IKZF1*), HELIOS (*IKZF2*), EOS (*IKZF4*) et PEGASUS (*IKZF5*). A l'inverse des autres membres de la famille, AIOLOS a une expression restreinte au lignage lymphoïde. Dans le développement B, son expression commence au stade pré-B et augmente graduellement pour être maximale dans les lymphocytes matures et les plasmocytes^{17,213-215}.

Le rôle d'AIOLOS dans le développement et la maturation des cellules B a été mis en évidence initialement dans un modèle murin déficient en AIOLOS. Les souris knock-out (KO) présentaient une accumulation de précurseur B dans la moelle et une déplétion en cellules B matures en périphérie dans la rate et dans le sang. La maturation des cellules B était également perturbée, avec une réduction importante des cellules B de la zone marginale alors que des centres germinatifs prolifératifs étaient présents même en l'absence d'immunisation. Sur le plan fonctionnel, les cellules AIOLOS KO avaient également une meilleure capacité de prolifération *in vitro* après stimulation et un BCR hyperactif^{216,217}. Dans une autre étude réalisée sur le même modèle murin, les auteurs ont montré qu'AIOLOS était indispensable pour la génération de plasmocytes à longue durée de vie²¹⁸.

Sur le plan des mécanismes de régulation de la lymphopoïèse B, les données sont peu nombreuses pour AIOLOS et souvent considérées comme proches des mécanismes de régulation d'IKAROS, les deux protéines interagissant très souvent ensemble au sein de complexes macromoléculaires. Les membres de la famille IKAROS ont une structure très conservée et un mode de fonctionnement similaire : la partie N-terminale est composée de 4 doigts-de-zinc (Zf) parmi lesquels les deux doigts du milieu (Zf2 et Zf3) sont essentiels pour l'interaction et la reconnaissance de la séquence d'ADN spécifique commune à tous les membres de la famille a/gGGAA. Les deux autres doigts (Zf1 et Zf4) n'interviennent pas directement dans le contact avec l'ADN mais sont indispensables pour le repliement du domaine de liaison à l'ADN. La partie C-terminale de la protéine contient deux autres doigts de zinc constituant un domaine d'interaction protéique permettant aux protéines de se dimériser entre elles ou avec les autres membres de la famille, mais aussi de se lier à des remodelleurs de la chromatine tels que le remodelleur du nucléosome ATP-dépendant Mi-2 β (ou CHD4), l'histone déacétylase HDAC-1, ou le co-represseur transcriptionnel SIN3A. A travers ces interactions, il a été montré qu'IKAROS et AIOLOS font partie du complexe remodelleur chromatinien NURD (Nucleosome Remodeling histone Deacetylase), indispensable à la régulation de l'expression spécifique de gènes impliqués dans le développement lymphoïde B. Grâce au domaine d'interaction protéique, AIOLOS et IKAROS recrutent les composants du complexe NURD spécifiquement au niveau du promoteur de gènes-cibles lymphoïdes contenant la séquence d'ADN consensus^{219,220}. Les membres de la famille IKAROS peuvent donc réguler l'expression de leurs gènes cibles de

plusieurs manières : soit par interaction directe avec le promoteur de gènes cibles pour activer ou réprimer l'expression, soit par modification épigénétique des gènes cibles par le biais de recrutement de remodeleurs chromatinien.

Dans la LLC, la mutation récurrente d'*IKZF3* récemment découverte se situe au niveau du 2^{ème} doigt de zinc composant le domaine de liaison à l'ADN. Elle est présente à l'état hétérozygote et cible un *hotspot* unique aboutissant au remplacement d'une leucine par une arginine en position 162 (p.L162R). L'impact fonctionnel de cette mutation est inconnu (**Figure 14**). Mon travail de thèse s'est centré sur l'étude du rôle fonctionnel de cette mutation dans un modèle murin et les résultats sont présentés dans le **manuscrit n°1** .

Des études récentes ont montré que l'initiation de l'expression d'AIOLOS dans le stade pré-B était sous le contrôle de la signalisation du pré-BCR via la protéine BLNK. L'augmentation de l'expression d'AIOLOS a pour conséquence la suppression du gène *IGLL1* qui code pour la pseudo-chaine légère $\lambda 5$ qui compose le pré-BCR, aboutissant *in fine* à l'inhibition du signal du pré-BCR. Ce rétrocontrôle négatif est nécessaire pour la transition au stade pré-B2, pour le début du réarrangement des gènes des chaînes légères et pour l'acquisition d'un BCR mature²²¹. L'augmentation de l'expression d'AIOLOS permettrait également de diminuer la prolifération des cellules pré-B et de favoriser leur sortie du cycle cellulaire en inhibant l'expression de *MYC*, ce qui favoriserait la transition au stade plus mature²².

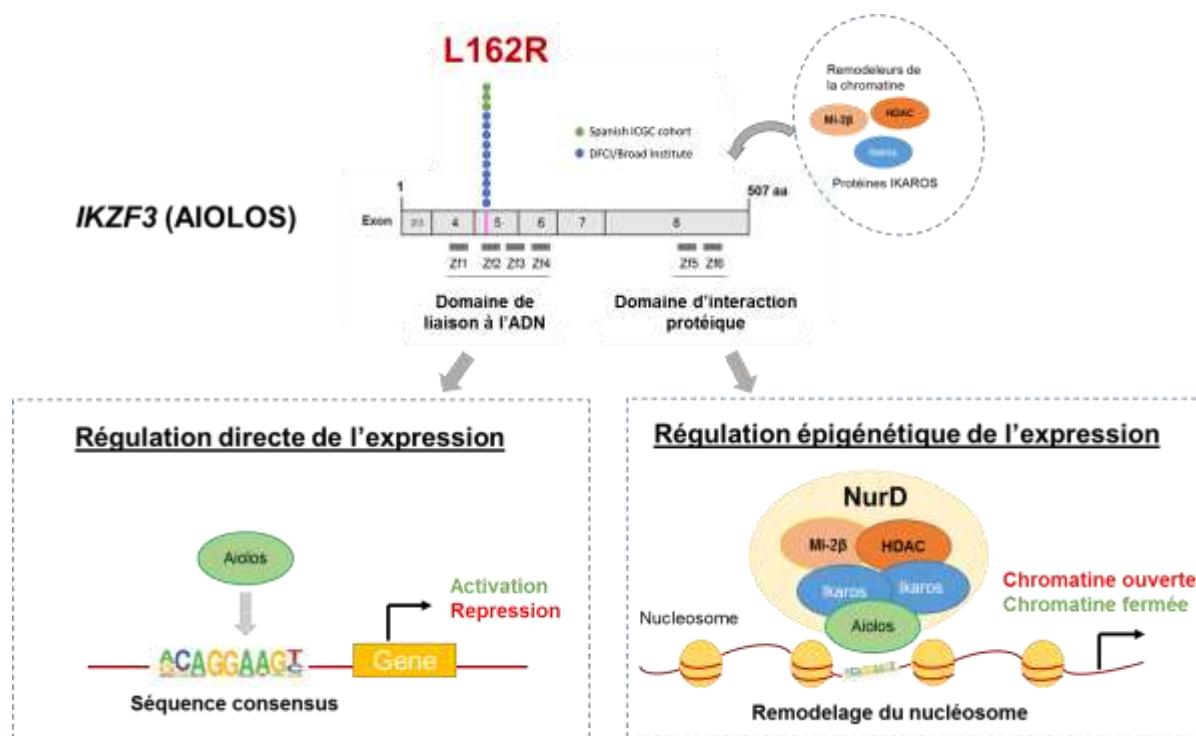


Figure 13 : Représentation schématique de la protéine AIOLOS. La position de la mutation est identifiée dans les études de séquençage du DFCI/Broad institute¹⁸² et de l'ICGC¹⁸³ indiquée

Malgré la similitude fonctionnelle d'IKAROS et d'AIOLOS, plusieurs arguments indiquent que leurs fonctions ne sont pas redondantes et que chaque protéine a un rôle spécifique dans le développement et la maturation lymphoïde. En effet, l'inactivation d'IKZF1 ou d'IKZF3 dans des modèles murins n'a pas les mêmes conséquences : les souris exprimant un mutant dominant négatif d'IKZF1 développent rapidement des leucémies aiguës lymphoblastiques alors que les souris IKZF3 KO développent des lymphomes B. Ceci suggère un rôle suppresseur de tumeur pour ces deux protéines avec un effet prédominant sur les cellules B immatures pour IKZF1 et sur les cellules B matures pour IKZF3. Par ailleurs chez l'homme, des mutations-délétions d'IKZF1 sont fréquentes dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B alors que les mutations d'IKZF3 sont présentes dans des pathologies B matures telles que la leucémie lymphoïde chronique, les lymphomes B diffus à grandes cellules, le lymphome du manteau et la maladie de Waldenström^{182,222,223}. Récemment, un rôle central d'IKZF1/3 a été montré dans le myélome. Dans les plasmocytes tumoraux, IKAROS et AIOLOS favorisent la survie cellulaire et la prolifération tumorale en augmentant l'expression du gène *IRF4* qui

induit à son tour l'expression de MYC. De plus, IKZF1/3 inhibent l'activité antitumorale des lymphocytes T en réprimant l'expression de l'IL2 ce qui favorise la progression du myélome. Ces deux protéines sont ciblées spécifiquement par les molécules de la famille des IMiD (dont le lenalidomide), utilisés en thérapeutique pour le traitement du myélome. Les IMiDs induisent la dégradation spécifique de ces deux protéines en formant un complexe avec l'ubiquitine ligase CRBN-CRL4 E3 ligase qui ubiquitine IKZF1/3 ce qui favorise leur dégradation par le protéasome²²⁴.

Autres voies biologiques et mutations somatiques

Si le séquençage à haut débit nous a permis d'identifier un grand nombre de mutations de faible fréquence, il nous laisse cependant face à de nombreuses interrogations sur leur rôle physiopathologique. Cette complexité génétique complique notre compréhension de la biologie de la maladie, du rôle individuel de chaque altération génomique et comment celles-ci coopèrent entre elles. Les modèles actuels *in vivo* et *in vitro*, sont parfois limités pour reproduire les combinaisons de *drivers* retrouvées chez les patients. L'émergence des technologies de séquençage *single-cell* va transformer notre capacité à décrypter la complexité génétique de la LLC en identifiant de nouveaux *drivers* et leurs associations à l'échelle cellulaire.

Enfin, certains patients ne présentent aucune anomalie génétique connue, ce qui suggère que dans ces cas précis, d'autres mutations sont présentes mais n'ont pas encore été découvertes à ce jour, ou que d'autres mécanismes biologiques jouent un rôle prédominant dans le développement de la maladie, telles que les dérégulations épigénétiques ou des facteurs micro-environnementaux.

3.4. Hétérogénéité génétique intratumorale et évolution clonale

3.4.1. Modèle d'évolution clonale

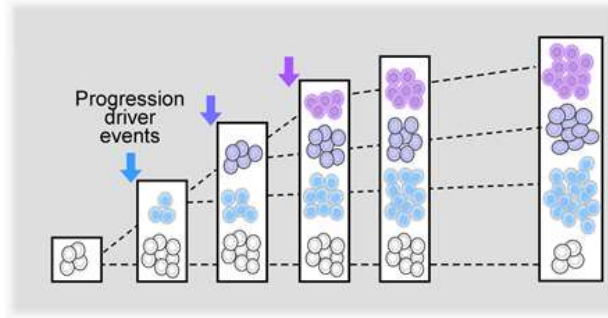
L'évolution clonale correspond au processus par lequel les cellules tumorales accumulent des événements génétiques et épigénétiques au cours de leur évolution et donnent naissance à de

nouveaux sous-clones. Malgré une origine clonale, la LLC est donc composée d'une population hétérogène sur le plan génétique au sein de la tumeur. Les clones de LLC, comme les autres cancers, évoluent selon un schéma Darwinien et subissent des processus d'expansion, de diversification et de sélection clonale au sein de l'environnement tumoral.²²⁵

Ces modèles d'évolution des cancers sont connus depuis plus d'une dizaine d'année, mais le développement des technologies de séquençage NGS a fourni une nouvelle approche technologique pour caractériser la dynamique des clones en détectant des mutations sous-clonales avec une bonne sensibilité, ce qui permet de quantifier la taille des clones dans la tumeur. Dans la LLC, grâce à l'accès relativement aisé de prélèvements de cellules tumorales avec une bonne pureté à partir du sang périphérique, le séquençage à haut-débit a rendu possible la détection de variants somatiques de faible fréquence allélique, permettant de définir des populations clonales ou sous-clonales au sein de la tumeur et de caractériser l'architecture tumorale^{182,226}.

Des études longitudinales de *whole genome* et de *whole exome sequencing* réalisées sur des prélèvements séquentiels ont permis de définir deux principaux modèles d'évolution clonale dans la LLC. Le premier est un modèle d'évolution linéaire, dans lequel un clone fondateur acquiert successivement des mutations additionnelles qui s'accumulent en plus des anomalies génétiques préexistantes. Dans ce modèle, la composition clonale est homogène sur le plan génétique. Le deuxième modèle est un modèle d'évolution branché, dans lequel plusieurs sous-clones coexistent et évoluent individuellement en parallèle de façon compétitive. Ces clones peuvent coexister dans les mêmes proportions pendant plusieurs années (équilibre clonal), ou bien un sous-clone peut devenir dominant en raison d'un avantage de survie lié à l'acquisition d'une mutation (compétition clonale) (**Figure 15**). Dans les premières études longitudinales, Landau et al. suggèrent qu'en l'absence de traitement, la composition clonale reste relativement stable au cours du temps alors que l'exposition à une chimiothérapie est associée à une évolution clonale marquée. Dans les échantillons non traités, plus de temps est nécessaire pour qu'un nouveau clone émerge et prenne l'ascendant sur les clones dominants existants. Landau et al. ont montré que la présence de mutations sous-clonales est un facteur de risque indépendant de progression. L'évolution des sous-clones semble donc restreinte aux patients évolutifs. De plus le traitement semble favoriser l'expansion de ces sous-clones.

Equilibre clonal



Emergence d'un sous-clone avec avantage prolifératif

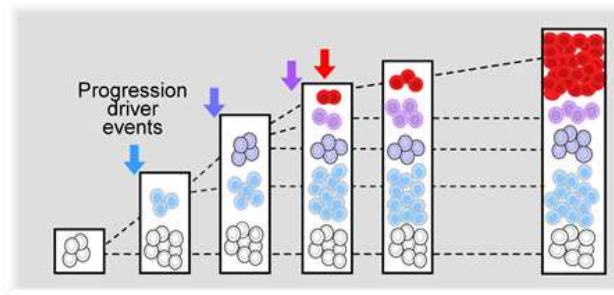


Figure 14 : *Modèle d'évolution clonale de la LLC. Les flèches de couleur indiquent l'acquisition de mutation dans les sous-clones (d'après Landau, Cell 2013)²²⁶*

En plus de l'évolution temporelle que subissent les clones, l'application du NGS réalisé sur des prélèvements provenant de sites anatomiques différents (sang périphérique, ganglions, moelle osseuse) chez un même patient a montré qu'il existe également une évolution tumorale sur le plan spatial. Plusieurs études ont montré qu'il existe une hétérogénéité génétique clonale entre les différents sites anatomiques et que les mutations retrouvées dans les ganglions sont retrouvées dans le sang périphérique à la rechute sous l'effet d'une pression sélective réalisée par le traitement^{227,228}. En se basant sur l'analyse des données de séquençage NGS et d'études du nombre de copies dans les cellules leucémiques d'un même patient, Del Giudice et al. ont identifié des mutations retrouvées à l'état clonal dans les ganglions (mutations de *SF3B1*, délétion de *BIRC3*, del8p et gain 2p) alors qu'elles sont détectées dans le sang périphérique sous forme de sous-clones minoritaires.

3.4.2. Reconstitution phylogénétique

La détermination de la fréquence des variants alléliques par séquençage NGS au sein de la tumeur a également permis de définir l'ordre d'acquisition des mutations dans la LLC et de reconstruire la phylogénie de chaque cas étudié.

D'après les modèles d'évolution clonale à laquelle la LLC est soumise, la composition clonale chez un patient donné est dynamique au cours du temps. Le séquençage NGS, en déterminant la fréquence des variants alléliques (VAF), permet d'établir une image instantanée de l'architecture clonale correspondant à une étape précise du processus évolutif. De ce fait, chez un même patient, à partir de prélèvements séquentiels sur lesquels on détermine la VAF, il est possible de reconstruire la phylogénie génétique de la maladie et d'identifier des lésions génétiques fondatrices, correspondant aux mutations clonales présentes précocement et initiant le cancer, et des mutations acquises secondairement, sous-clonales.

L'étude de l'évolution clonale d'un grand nombre de patients a permis d'établir que la tri(12), la del(13q), la del(11q) et les mutations de *MYD88* sont fréquemment retrouvées à l'état clonal, ce qui suggère qu'elles sont acquises précocement dans le développement de la maladie et qu'elles ont un rôle prédominant dans l'initiation de la LLC. A l'inverse, les mutations de *TP53*, *SF3B1* et d'*ATM* sont acquises secondairement et sont plus souvent retrouvées à l'état sous-clonal^{182,226}.

L'application d'approches de type « *machine learning* » sur de grandes séries de patients LLC permettant de modéliser l'évolution génétique de la maladie montre également, une acquisition séquentielle et temporelle de lésions génétiques de façon spécifique plutôt que d'une accumulation aléatoire, et confirme que la del(13q) et la tri(12) sont des événements génétiques initiateurs précoces, avec des trajectoires d'évolution préférentielle²²⁹.

Le développement actuel des technologies de séquençage unicellulaire (*single-cell sequencing*), va encore améliorer notre compréhension de l'architecture clonale de la maladie, en déterminant précisément les associations de mutations au sein d'une cellule ce qui permettra, à travers des études longitudinales, d'établir la phylogénie précise entre chaque clone.

3.4.3. Impact des altérations génétiques sur la résistance au traitement

Il est de plus en plus évident que l'hétérogénéité intratumorale n'alimente pas seulement la progression leucémique mais contribue également à la résistance aux traitements. Même si la thérapie elle-même peut induire des anomalies génétiques et favoriser la diversification génétique intratumorale, de nombreuses études de séquençage longitudinal ont montré que la capacité de résistance génétique est présente avant traitement au niveau d'un sous-clone pré existant (**Figure 16**).

Altération de la voie de p53 et résistance à la fludarabine

De nombreuses études ont clairement identifiés les mutations *TP53/del17p* comme facteurs prédictifs de résistance à la fludarabine. Les anomalies de p53 sont retrouvées chez 5 à 10% des patients au diagnostic avant traitement et la fréquence s'élève à 40% chez les patients réfractaires au traitement.

Les anomalies de la voie de p53 confèrent un avantage de survie aux cellules traitées par fludarabine, qui ne peut plus induire l'apoptose des clones leucémiques en raison de la défaillance de la voie de réponse aux dommages de l'ADN. Les clones mutés sont alors sélectionnés. Grace au séquençage NGS, permettant de détecter de manière très sensible des clones minoritaires *TP53* mutés, il a été montré que les sous-clones présents avant traitement subissent invariablement une expansion clonale après rechute et deviennent majoritaires dans la population leucémique. D'autres études s'intéressant à la cinétique de croissance des clones ont également montré que les clones *TP53* mutés sont associés à un taux d'apoptose plus bas que les clones *TP53* non mutés, ce qui suggère une sensibilité diminuée à la chimiothérapie et une vitesse de repopulation plus importante après traitement.

La présence de ces anomalies avant traitement contre-indique l'utilisation de la fludarabine, quel que soit la taille du clone muté et impose l'utilisation de thérapies ciblées qui contournent la voie de p53.

Mutations des effecteurs de la signalisation du BCR et résistance à l'ibrutinib

L'ibrutinib est le premier inhibiteur de BTK ayant montré une efficacité dans la LLC, notamment chez les patients porteurs de mutations de *TP53*. L'ibrutinib agit en se liant de façon covalente et irréversible à la kinase BTK, ce qui inhibe la transduction du signal délivré par le BCR, dont le rôle est critique pour la survie et la prolifération des cellules de LLC. Les mutations de BTK ciblent le site de liaison de l'ibrutinib à BTK (substitution d'une cystéine par une sérine en position 481, C481S). L'ibrutinib ne peut plus se lier de façon covalente et ne bloque plus efficacement le signal transmis par le BCR. En outre, des mutations gain de fonction de *PLG2* sont responsables d'une activation de la signalisation du BCR par le biais de *PLG2* et de façon indépendante de BTK¹¹⁹.

Environ 80% des patients résistants à l'ibrutinib présentent une mutation dans le gène codant BTK ou son effecteur *PLG2*^{120,230}. Nous présentons en **annexe 3** les résultats de notre étude de patients traités par ibrutinib pendant 3 ans. Les mutations de résistance apparaissent précocement et sont détectables avant la progression de la maladie²³¹.

Bien que mal caractérisés, d'autres mécanismes génétiques interviennent dans la résistance à l'ibrutinib puisque chez environ 20% des patients résistants ou évolutifs sous ibrutinib, les mutations de *BTK* ou *PLCG2* ne sont pas détectées par séquençage classique. Il a été proposé par exemple que la délétion 8p, rapportée dans 3 cas de patients résistants à l'ibrutinib, serait responsable d'une haploinsuffisance du récepteur TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), ce qui aboutirait à une moindre sensibilité des cellules leucémiques à l'apoptose induite par le ligand du récepteur²³².

Mutations de BCL-2 et résistance au venetoclax

Le venetoclax est le dernier inhibiteur ciblé mis sur le marché pour le traitement de la LLC. C'est un BH3-mimétique, antagoniste de la protéine anti-apoptotique BCL-2. Il se lie de façon spécifique à BCL-2, ce qui induit la libération de protéines pro-apoptotiques tels que BAX et les BH3-only, la libération de cytochrome C dans le cytoplasme à partir de la mitochondrie et *in fine* l'apoptose cellulaire. Malgré une utilisation plus récente que

l'ibrutinib, des mécanismes de résistance génétique ont déjà été mis en évidence chez des patients qui évoluent sous traitement.

Une mutation récurrente p.Gly101Val a été mise en évidence initialement chez 50% des patients qui progressaient sous venetoclax¹²³. Cette mutation diminue l'affinité de BCL2 pour le venetoclax ce qui l'empêche de déplacer les molécules pro-apoptotiques associées à BCL2.

Une autre étude a montré que l'amplification de la région 1q23 entraîne la surexpression de *MCL1* ce qui séquestre la molécule pro-apoptotique BIM et compense l'inhibition de BCL2. La voie de l'AMP cyclique mitochondriale est également activée par le biais de la surexpression de *PRKAB2* ce qui altère le métabolisme énergétique mitochondrial en augmentant la phosphorylation oxydative et le transport des électrons, indispensable pour le déclenchement de l'apoptose²³³.

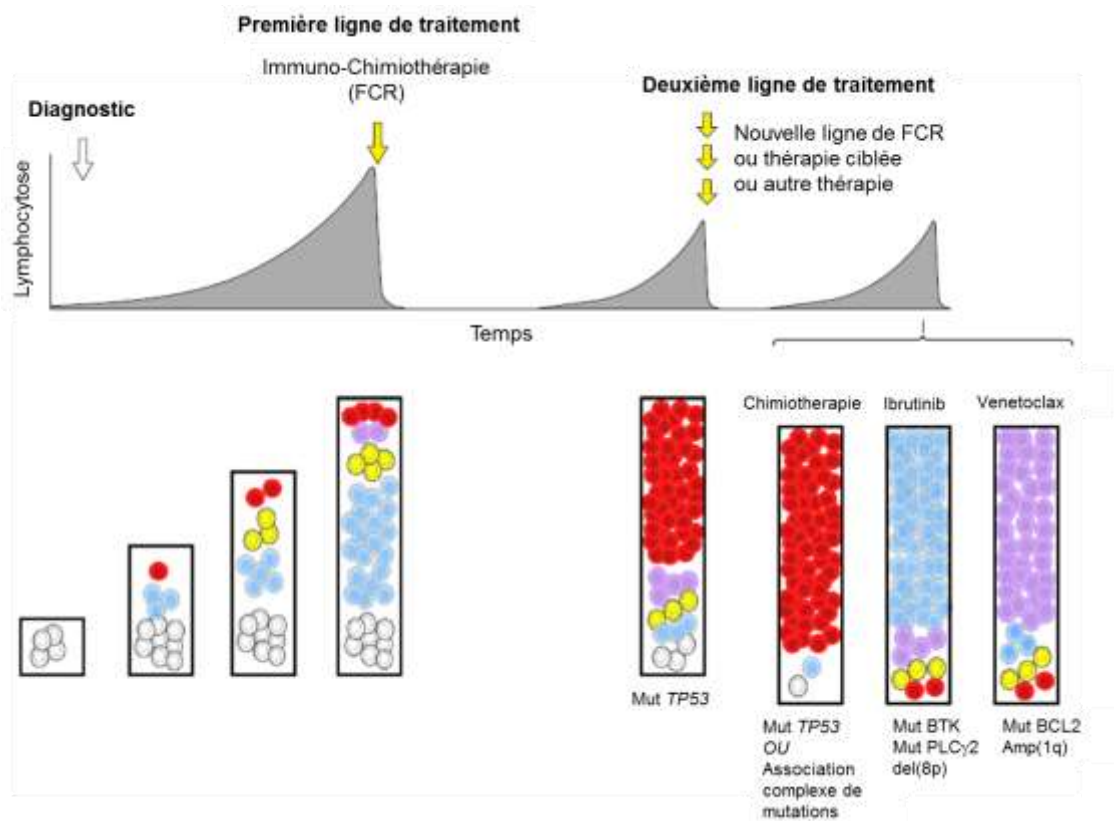


Figure 15 : Schéma de l'évolution clonale spécifique induite par les traitements

3.5. Epigénétique

L'épigénétique correspond à la régulation de l'expression des gènes par modification chimique de la séquence d'ADN (méthylation des bases azotées) ou de la structure de la chromatine (état de compaction ou d'accessibilité, modification post-traductionnelle des histones). La séquence d'ADN n'est pas directement modifiée. La dérégulation de l'expression des gènes liée à des anomalies épigénétiques, telles que la méthylation aberrante de l'ADN et/ou des histones est une caractéristique des cellules cancéreuses. Dans la LLC, des études ont d'abord mis en évidence des méthylations aberrantes de l'ADN au niveau de promoteurs de certains gènes aboutissant à leur sur ou sous-expression.

La méthylation de l'ADN qui intervient au niveau des résidus cytosines des dinucléotides CpG est un mécanisme épigénétique crucial pour la régulation de l'expression normale des gènes et la stabilité du génome. Elle contribue également au développement des cellules B. Même si elle est réversible, cette méthylation est transmissible aux cellules filles après division.

Dans la LLC, il a été mis en évidence des méthylations aberrantes de l'ADN au niveau de promoteurs de certains gènes tels que les *TCL1*, *DAPK1*, *ZAP-70* ainsi que certains microARN, aboutissant à la dérégulation de leur expression par gain ou perte d'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle au promoteur²³⁴⁻²³⁸.

Des études de profilage du méthylome par *whole-genome bisulfite sequencing* ont permis d'étudier globalement les changements de méthylation des cellules de LLC par rapport aux lymphocytes B normaux et ont démontré une importante hétérogénéité du profil de méthylation. Comme les autres cancers, les cellules de LLC sont caractérisées par une hypométhylation globale du génome, mais avec des régions très localisées d'hyperméthylation^{239,240}. Plus globalement au niveau du génome entier, il a été montré ensuite que le méthylome (le statut global de méthylation) était très stable et montrait peu de changement entre les cellules au repos ou celles qui proliféraient²⁴¹.

Dans le modèle murin Eμ-TCL1, un modèle bien établi de LLC, Chen et al. ont montré qu'il existait des anomalies de méthylation au niveau des cellules B bien avant l'apparition de la

maladie, ce qui suggère que les modifications épigénétiques surviennent précocement et jouent un rôle important dans le développement de la maladie²⁴².

Il existe également une hétérogénéité de méthylation entre les patients, les différences portant principalement en dehors des dinucléotides CpG. Ces différences sont en rapport avec le statut *IGHV* du patient. De plus, en se basant sur les homologues d’empreinte du méthylome de cellules de LLC et de sous populations B normales, ces études ont suggéré que les cellules B naïves étaient les cellules d’origine des LLC *IGHV* non mutés alors que les LLC *IGHV* mutés dérivent des cellules B mémoires²⁴⁰.

L’hétérogénéité épigénétique se retrouve enfin sur le plan intra-tumoral. En effet, au sein d’une tumeur, il existe des niveaux de méthylation différents localement pour un même allèle. Landau et al. ont mis en évidence une importante discordance de méthylation localement au niveau de mêmes allèles à travers le génome²⁴³. Ce niveau élevé de bruit de fond épigénétique semble survenir de façon stochastique et serait spécifique aux cancers. Les discordances locales de méthylation impacteraient la variabilité d’expression des gènes entre les patients et au sein des tumeurs, favorisant l’hétérogénéité clonale et l’évolution des clones dans la tumeur. De plus, cette discordance de méthylation locale affecte préférentiellement des gènes associés à la biologie des cellules souches et par conséquent favorise la diversification clonale des cellules leucémiques.

4. Modèles murins de LLC

Les modèles murins sont des outils précieux pour analyser la fonction des gènes dans un contexte physiologique. Dans les années 80, les manipulations génétiques de type recombinaisons homologues sur cellules souches embryonnaires de souris ont permis la génération des premiers modèles murins porteurs de mutations à l'état germinal.^{244,245} La limite de ces modèles est qu'un gène peut avoir un profil d'expression tissulaire restreint et que son expression ectopique dans tous les tissus de l'organisme peut avoir un effet complexe qui altère notre compréhension de son fonctionnement. Pour pallier à ce problème, au cours des 15 dernières années, des modèles d'expression conditionnelle de mutations d'intérêt reposant sur le système Cre/LoxP ont été développés et ont été particulièrement bénéfiques pour comprendre le rôle fonctionnel et le potentiel oncogénique de gènes candidats « *drivers* » dans un contexte physiologique et de façon lignage cellulaire-spécifique.^{246,247}

4.1. Application du système Cre/loxP *in vivo*

Le système de recombinaison Cre/LoxP a été découvert chez le bactériophage ϕ I. Il nécessite l'activité d'une recombinase, la protéine Cre, et la présence dans les molécules d'ADN que l'on veut recombiner de séquences particulières, les sites LoxP. La recombinase Cre reconnaît spécifiquement un site LoxP au sein duquel elle clive l'ADN puis catalyse la réunion de cet ADN avec une séquence d'ADN clivée à un autre site LoxP. Les sites LoxP sont constitués de deux séquences palindromiques dont l'orientation détermine le type de recombinaison : Si les deux sites LoxP sont placés dans une séquence d'ADN avec une orientation identique, l'action de la recombinase aboutit à la délétion du fragment d'ADN situé entre les deux sites. En revanche, si les séquences LoxP ont une orientation différente, la recombinase entraîne l'inversion du fragment d'ADN (**Figure 17**).

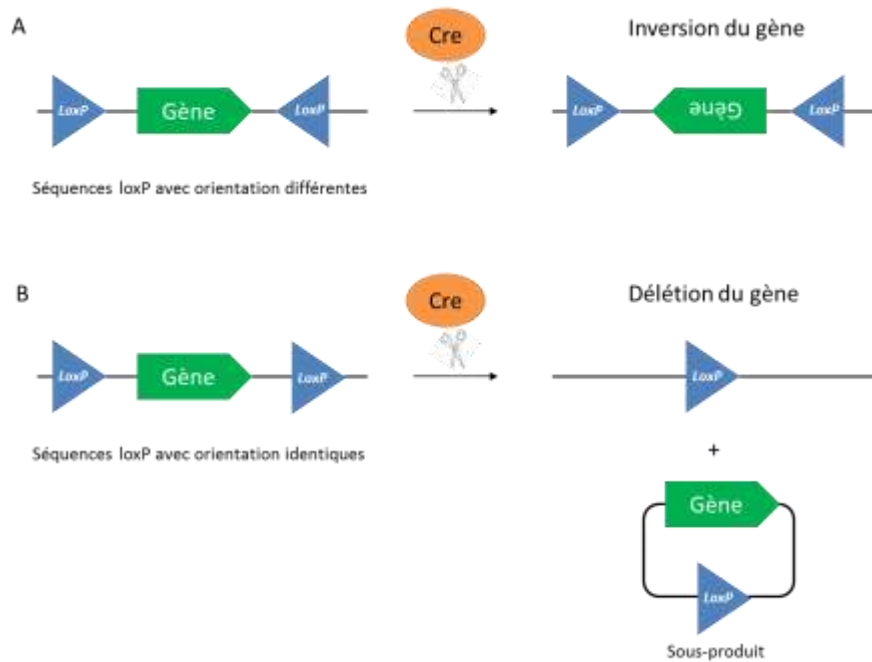


Figure 16 : Représentation schématique de la recombinaison Cre/LoxP. A) Le gène est flanqué par deux séquences LoxP orientées de façon différente. La Cre recombinase catalyse l'inversion de la séquence entre les deux sites LoxP, le gène est inversé. B) Le gène est flanqué par deux séquences LoxP de même orientation. La Cre recombinase clive la séquence entre les deux sites LoxP, le gène est délété.

Ce système a été mis à profit pour la génération de lignées murines afin d'activer (« knock-in ») ou déléter (« knock-out ») spécifiquement un transgène grâce à la Cre recombinase qui est exprimée sous le contrôle d'un promoteur uniquement actif dans un type cellulaire, l'activation du transgène se fait donc de façon restreinte à un lignage. Des systèmes inductibles basés sur la même stratégie Cre/LoxP ont également été générés, en mettant l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur dont l'activité est inductible par une drogue injectée à la souris.

Pour obtenir ces lignées avec knock-in/knock-out ciblé dans un type cellulaire, deux lignées murines transgéniques doivent être générées au préalable par recombinaison homologue des cellules souches embryonnaires. Une première souris transgénique comporte la séquence dite « floxée » au niveau d'un gène d'intérêt dans son génome. L'autre souris est une souris transgénique exprimant la recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur donné, choisi pour son expression restreinte dans le lignage cellulaire d'intérêt (**Figure 18**).^{246,248} Dans la

descendance issue du croisement de ces deux lignées, la Cre recombinase va donc reconnaître la séquence « floxée » uniquement dans la lignée cellulaire où elle est exprimée et induire la délétion/inversion de la séquence d'ADN.

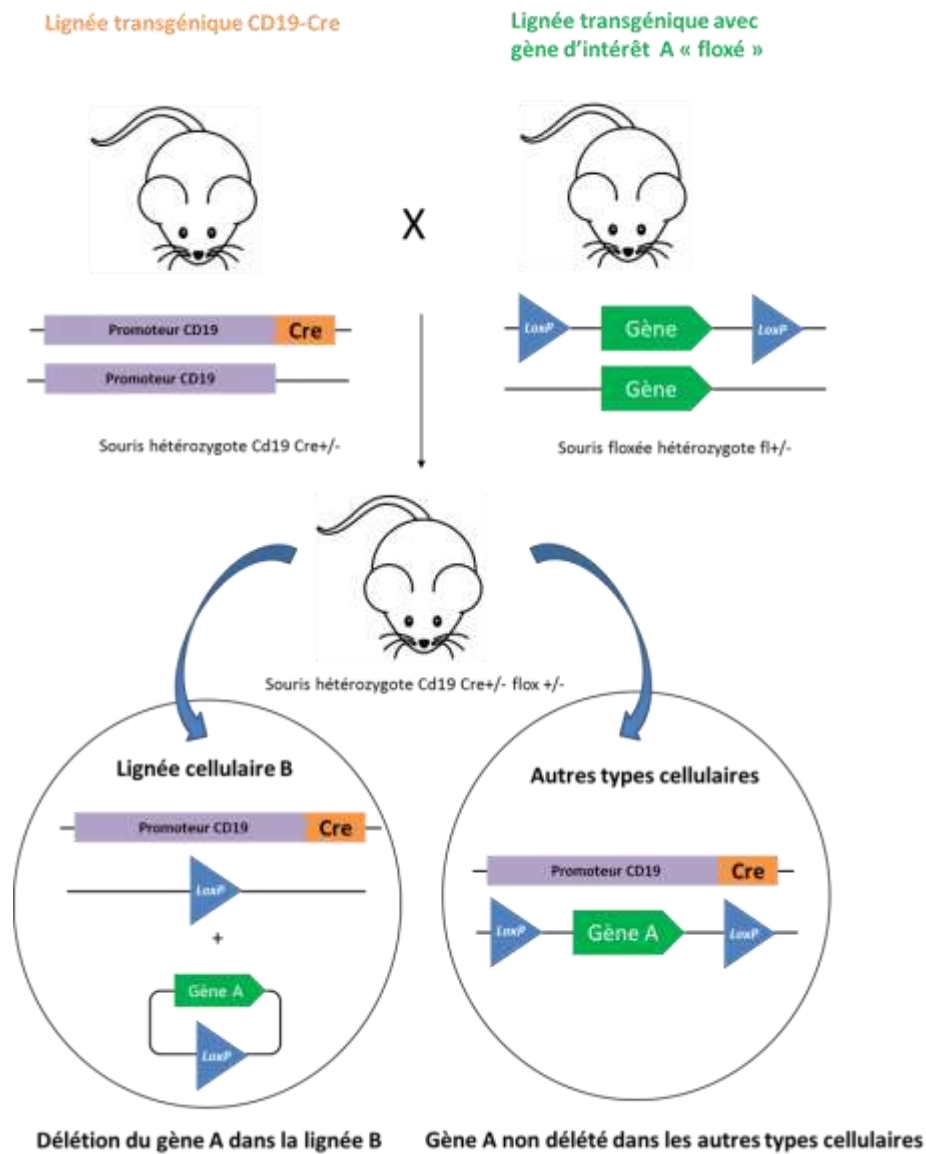


Figure 17 : Le système Cre/loxP in vivo. Exemple de la délétion restreinte d'un gène A dans le lignage lymphoïde B. Dans la souris transgénique Cd19-Cre (en haut à gauche), l'expression de la Cre est sous la dépendance du promoteur du CD19 qui n'est actif que dans les cellules B. Cette souris est croisée avec une souris transgénique comportant le gène A floxé. Dans la descendance, la Cre recombinase catalyse la délétion du gène A uniquement dans les cellules exprimant le CD19. Le gène A est exprimé normalement dans les autres types cellulaires, la Cre n'étant pas exprimée.

Dans le domaine de l'oncologie, les modèles murins basés sur des caractéristiques génétiques retrouvées dans les cancers et qui développent une prolifération tumorale sont des outils précieux pour comprendre les mécanismes sous-jacents qui conduisent au développement tumoral et pour les études précliniques. Néanmoins, l'utilité de tels modèles dans l'étude de maladies humaines peut potentiellement être entravée par des différences biologiques spécifiques à l'espèce dans la cellule cible de la transformation oncogénique. Il est donc crucial que les lésions génétiques ou l'expression dérégulée de gènes associés à la prolifération tumorale résumant le plus fidèlement possible celles observées chez l'Homme sur le plan phénotypique, histologique, génétique et clinique.

Dans le domaine de la LLC, plusieurs modèles murins de LLC ont été développés mais peu d'entre eux sont basés sur des anomalies génétiques identifiées chez l'Homme. Un des enjeux dans la génération de modèles murins de LLC est donc de créer des modèles de LLC basés sur l'expression d'anomalies génétiques identifiées chez l'Homme et qui reproduisent le plus fidèlement possible les caractéristiques biologiques de la maladie pour 1) démontrer le potentiel oncogénique d'une altération génétique dans le développement de la maladie 2) étudier l'effet de ces anomalies génétiques dans la cellule pour comprendre les mécanismes qui conduisent à la lymphomagénèse 3) disposer de modèle de LLC pour tester des drogues *in vivo* dans des études pré-cliniques.

4.2. Modèles murins basés sur l'expression de gènes dérégulés dans la LLC

Souris E μ -TCL1

Plusieurs modèles ont été générés à partir de transgènes identifiés comme étant sur-exprimés dans la maladie. Le premier modèle établi qui a développé une lymphoprolifération « CLL-like » et qui reste le plus couramment utilisé aujourd'hui en recherche est le modèle E μ -TCL1.

Ce modèle repose sur l'expression du gène humain *TCL1* (*T-cell Leukemia 1*) qui est sur-exprimé dans la LLC. Sa surexpression est associée à des facteurs de mauvais pronostic tel que le statut *IGHV* non muté.^{249,250} Dans ce modèle murin, le gène humain *TCL1* est sous le contrôle du promoteur des gènes des immunoglobulines *IGHV* et de l'enhancer IGH (E μ). Les

souris *Eμ-TCL1* développent une prolifération B CD5+IgM+ monoclonale détectable d'abord dans la cavité péritonéale, puis la prolifération gagne la rate, la moelle osseuse et le sang^{251,252}. La pénétrance de ce modèle est très élevée avec 100% des souris développant une maladie agressive avec une latence de 9 à 12 mois. Le statut mutationnel des *IGHV* est toujours non muté, avec un réarrangement stéréotypé dans la plupart des cas. La pénétrance quasi complète de la maladie dans ce modèle est probablement due à un très fort potentiel oncogénique du transgène humain *TCL1*, qui active la kinase AKT, active la voie NF-κB dans les cellules tumorales et inhibe l'activité des DNA-méthyltransferases DNMT3A et DNMT3B²⁵³⁻²⁵⁵.

En raison de la similarité des caractéristiques biologiques entre la LLC humaine et murine, de la pénétrance élevée et de la latence relativement courte, le modèle *Eμ-TCL1* a été largement utilisé pour comprendre les mécanismes physiopathologiques de la LLC.

Souris BCL2xtraf2dn

D'autres modèles murins reposant sur la surexpression de gènes impliqués dans la physiopathologie de la LLC ont été développés, tel que le modèle murin transgénique *BCL2xtraf2dn* qui surexprime le gène humain *BCL2* et la forme dominante négative du *TNF receptor associated factor 2 (Tnrf2dn)* structurellement similaire au *TRAF1* humain, tous deux retrouvés à des niveaux d'expression élevés dans la LLC.²⁵⁶ Ce modèle a montré l'effet anti-apoptotique synergique des deux gènes. A 14 mois, environ 80% des souris doubles transgéniques succombent à une prolifération « CLL-like » avec une infiltration de la rate, de la moelle osseuse, de la cavité péritonéale et une hyperlymphocytose.

Souris transgéniques APRIL

Les souris transgéniques surexprimant le gène humain APRIL (membre de la famille du TNF) ont été générées, compte tenu du niveau élevé d'APRIL retrouvé dans le sérum de patients. Les souris transgéniques ont également des taux élevés d'APRIL dans le sérum et développent des proliférations à cellules B entre 9 et 12 mois avec une pénétrance de 40%.^{257,258}

4.3. Modèles reproduisant des altérations génétiques identifiées dans la LLC

Souris MDR et CDR : modélisation de la délétion 13q humaine

La délétion 13q14 est l'anomalie génétique la plus fréquente dans la LLC avec une fréquence >50%.¹⁶⁶ Sa présence est associée à une maladie indolente et un bon pronostic. Elle est également retrouvée au stade précédant la LLC dans des clones MBL (*monoclonal B cell lymphocytosis*) ce qui suggère un rôle fondateur dans la maladie.²⁵⁹ La délétion 13q14 correspond au locus 14qC3 qui code pour de nombreux gènes conservés entre l'Homme et la souris (**Figure 19**). Une région minimale délétée (*MDR* pour *minimal deleted region*), comprend le premier exon de l'ARN stérile *DLEU1*, le gène *DLEU2* (*deleted in leukemia 2 gene*) qui code pour un transcrit stérile et les micro ARN *miR-15A/16-1* localisés dans un intron de *DLEU2*. Une délétion plus grande en 13q14 (*CDR* pour *common deleted region*) est retrouvée chez un nombre élevé de patients.¹²⁹

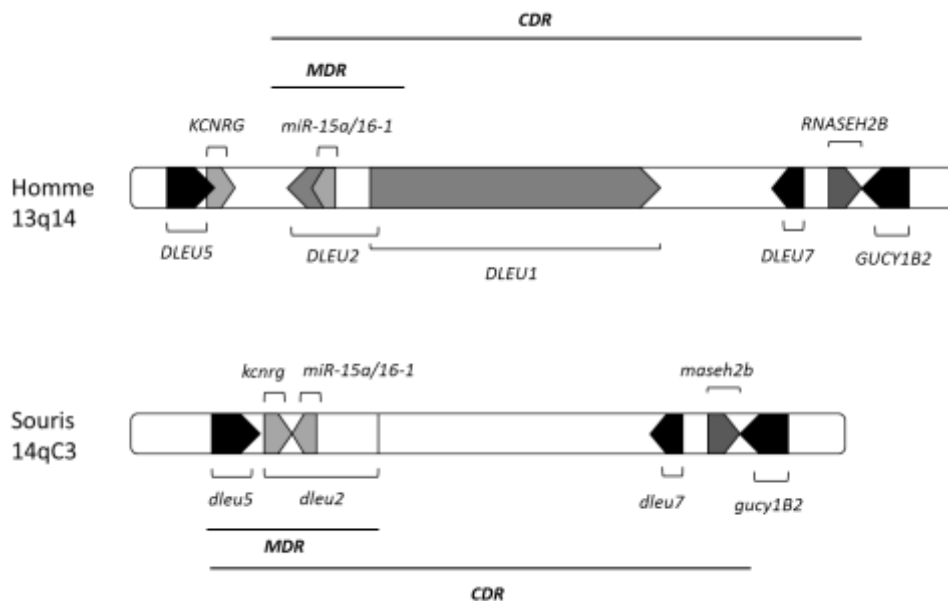


Figure 18 : Représentation schématique du locus humain 13q14 et murin 14qC3. MDR indique la région minimale délétée et CDR la région commune délétée.

Ces délétions de tailles différentes ont été modélisées chez la souris à partir du locus 14qC3 (équivalant au locus humain 13q14), en tirant parti du système Cre/LoxP pour induire les délétions uniquement dans la lignée lymphoïde B (Cre recombinase sous la dépendance du promoteur du gène *Cd19*) : souris MDR^{floxed}*Cd19*-Cre, CDR^{floxed}*Cd19*-Cre ou *miR-15A/16-1*^{floxed}*Cd19*-Cre.¹³⁰ Ces souris ont développé des lymphoproliférations B CD5+ avec des caractéristiques phénotypiques et histologiques proches de la LLC et avec des pénétrances et des sévérités variables en fonction de la taille de la délétion. Les souris porteuses de la délétion ciblée des micro ARN *miR-15A/16-1* développent des lymphoproliférations B de type LLC, MBL ou des proliférations CD5 négatives, tardivement avec une pénétrance de 25%. Les souris MDR, qui ont une délétion supplémentaire des gènes *Dleu2* et *Dleu5*, développent le même spectre de lymphoproliférations que les précédentes souris mais avec une pénétrance de 40% et une agressivité plus importante. Les souris CDR quant à elles développent presque exclusivement des LLC à l'âge d'environ 15 mois. Toutes les LLC de ces modèles ont un statut mutationnel *IGHV* non muté.

Les modèles murins reproduisant la délétion 13q14 ont été les premiers à démontrer *in vitro* le rôle direct d'une altération génétique récurrente dans la pathogénèse de la LLC. La perte des micro ARN *miR-15A/16-1*, qui est la caractéristique commune à toutes les délétions, induit une perte de la régulation négative de la protéine anti-apoptotique BCL2. Le développement de proliférations B clonales avec des sévérités et des pénétrances variables suggère l'implication d'autres gènes codés dans les régions délétées. Par exemple, la délétion des gènes *Dleu2* et *Dleu5* augmente la pénétrance et l'agressivité de la maladie qui est observée chez les souris n'ayant que la délétion des micro ARN *miR-15A/16-1*.

Contrairement au modèle TCL-1, les LLC de souris MDR/CDR ont des caractéristiques plus proches de la maladie humaine. Le modèle reproduit le spectre des lymphoproliférations observées chez l'Homme (stade MBL, LLC et lymphome de haut grade) mais avec globalement une maladie indolente, et la maladie se développe à un âge compatible avec l'âge d'apparition de la LLC chez l'Homme.

Souris ATM/SF3B1 double mutantes

Le gène codant pour le facteur de *splicing* SF3B1 est l'un des plus fréquemment muté dans la LLC, majoritairement au niveau d'un hotspot K700E.¹⁹⁹ Par ailleurs, la mutation de *SF3B1* est fréquemment associée à la délétion du chromosome 11q qui entraîne la perte du gène *ATM*.¹⁸² Cette association de mutation fréquente chez l'Homme a été modélisée dans une lignée murine co-exprimant la mutation *SF3B1* avec la délétion d'*ATM* de façon restreinte dans les cellules B.²⁰⁵ Ces souris ont montré le développement d'une prolifération B CD5+ avec des caractéristiques phénotypiques et histologiques comparable à la LLC humaine avec une pénétrance de 10% chez des souris âgées de plus de 18 mois. Les cellules « LLC-like » ont montré une altération de la voie de réponse aux dommages de l'ADN et de la signalisation du BCR, deux voies bien connues pour être dérégulées dans la pathologie humaine.

Les souris *SF3B1* et *ATM* simple mutantes n'ayant pas développé de LLC, ce modèle montre l'importance de modéliser des combinaisons de mutations pour reproduire des LLC. D'autres modèles murins sont nécessaires afin de reproduire le spectre complet des mutations « drivers » de la LLC.

5. Objectif de la thèse

La LLC a été au premier plan d'analyses génomiques, avec près de 1000 échantillons caractérisés par séquence entière du génome (WGS) et de l'exome (WES), et bien plus par NGS ciblé. Ces études récentes d'analyse extensive du génome ont mis en évidence 1) de nouveaux gènes « *drivers* » candidats à partir des mutations somatiques récurrentes 2) des associations récurrentes entre certaines mutations (avec par exemple l'association récurrente de la mutation de *SF3B1* avec la mutation d'*ATM* et/ou la del(11q) ; 3) les relations temporelles d'acquisition des lésions génétiques, avec la del(13q) et del(11q) considérés comme des événements précoces ; 4) une importante hétérogénéité génétique intratumorale qui alimente l'évolution clonale et contribue à la résistance aux traitements standards associant fludarabine-rituximab-cyclophosphamide et aux thérapies ciblées (inhibiteur de BTK, PLC γ 2 ou venetoclax).

Malgré la richesse d'informations de données génétiques disponibles, l'impact fonctionnel d'une grande majorité d'anomalies génétiques récurrentes identifiées à ce jour n'est pas connu et reste souvent difficile à étudier sur le plan expérimental. La manipulation génétique de cellules primaires B est techniquement difficile et les lignées cellulaires dérivant de patients ou les modèles murins sont peu nombreux et ne possèdent pas tous les événements génétiques identifiés dans la LLC.

L'objectif de cette thèse a consisté à **améliorer notre compréhension du rôle des mutations somatiques récurrentes dans la pathogénèse de la LLC et leurs implications dans l'évolution de la maladie et la résistance au traitement**. Les *drivers* clés de la LLC ont été identifiés mais leur fonction reste à définir. Nous avons centré ce travail de thèse sur l'étude des mutations :

- Du gène *IKZF3*, dont le rôle n'est pas connu et que nous avons analysé grâce au développement d'un nouveau modèle murin de LLC.
- Du gène *TP53*, contribuant à l'agressivité de la maladie et à la résistance au traitement, que nous avons étudié dans une étude rétrospective longitudinale de patients afin d'aborder l'évolution clonale de cette anomalie.

Objectif 1 : La mutation du gène *IKZF3* fait partie des mutations nouvellement identifiées par les études de WES menées par le laboratoire du Dr. Wu (DFCI). Cette mutation est remarquable par le fait qu'elle affecte un *hotspot* unique (L162R), localisé dans un domaine fonctionnel critique de la protéine, ce qui suggère une sélection positive au cours du développement tumoral. Nous avons émis l'hypothèse que cette mutation pouvait avoir un rôle « *driver* » dans la LLC. L'objectif de mon travail a donc été de **caractériser fonctionnellement l'impact de la mutation récurrente du gène *IKZF3* à travers un modèle murin exprimant la mutation ponctuelle de façon spécifique dans le lignage B pour comprendre son rôle dans le développement de la LLC.**

Objectif 2 : Les mutations/délétions de *TP53* sont bien connues pour être associées à un pronostic péjoratif et une résistance systématique aux analogues des purines dans la LLC. Souvent acquises au cours de l'histoire naturelle de la maladie et identifiées à l'état sous-clonal, leur fréquence augmente après traitement. Nous avons émis l'hypothèse que les mutations de *TP53* sont présentes dans des sous-clones minoritaires et peuvent être sélectionnées par le traitement. D'autre part elles favoriseraient l'instabilité génétique et l'apparition d'anomalies génétiques complexes. L'objectif de ce travail a été d'**étudier l'évolution clonale des mutations de *TP53* à travers une étude longitudinale pour comprendre comment elles favorisent le phénotype agressif de la maladie et la résistance au traitement.**

6. Manuscripts

Manuscrit 1: A hotspot mutation p.L162R in *IKZF3* drives B cell neoplasia via transcriptional dysregulation

Les résultats de ce travail font l'objet d'un manuscrit qui sera soumis prochainement pour publication. Une version préliminaire et non définitive est présentée dans cette version de la thèse.

Manuscrit n°2: *TP53* mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication dans la revue *International Journal of Cancer* en octobre 2016¹⁷⁶.

Manuscrit n°1: A hotspot mutation p.L162R in *IKZF3* drives B cell neoplasia via transcriptional dysregulation

Introduction et principaux résultats

Dans ce travail mené dans le laboratoire de Catherine Wu au Dana Farber Cancer Institute à Boston, nous nous sommes intéressés à la mutation récurrente d'*IKZF3*, retrouvée avec une fréquence de 3% dans la LLC. L'équipe de Catherine Wu a été l'une des premières à réaliser le séquençage de l'exome à grande échelle dans la LLC, ce qui a permis d'identifier cette anomalie génétique. Malgré sa faible fréquence, cette mutation a attiré notre attention pour plusieurs raisons. Premièrement, la mutation est retrouvée à l'état hétérozygote, elle cible un *hotspot* unique au niveau du codon 162, aboutissant au remplacement d'une Leucine par une Arginine (L162R), ce qui suggère un gain-de-fonction et une sélection au cours du processus tumorigénique. Deuxièmement, le gène *IKZF3* code le facteur de transcription AIOLOS, une protéine à doigts de zinc appartenant à la famille IKAROS, dont l'expression est restreinte au lignage lymphoïde. AIOLOS/IKZF3 est exprimé depuis le stade pré-B jusqu'au plasmocyte et il joue un rôle important dans le développement et la maturation lymphoïde. Il jouerait un rôle dans la modulation du signal délivré par le BCR pour contrôler la formation de cellules B folliculaires et des centres germinatifs. Par conséquent, une mutation au niveau d'*IKZF3* pourrait potentiellement perturber le développement B. Enfin, la mutation est localisée dans le domaine de liaison à l'ADN d'*IKZF3*, un domaine critique pour la fonction de régulation de l'expression des gènes cibles. En tant que facteur de transcription, IKZF3 reconnaît une séquence consensus spécifique de la famille IKAROS pour activer ou réprimer l'expression de gènes cibles. Nous avons donc émis l'hypothèse que la mutation pourrait perturber la capacité d'*IKZF3* à réguler l'expression de ses gènes cibles.

Pour étudier la fonction de la mutation d'*IKZF3*, nous avons généré un modèle murin exprimant la mutation de façon restreinte dans le lignage B. Des souris transgéniques possédant l'allèle *Ikzf3* mutant floxé (souris *Ikzf3* fl/fl) ont été croisées avec des souris transgéniques exprimant la Cre recombinase sous la dépendance du promoteur du CD19 (souris CD19-Cre) pour activer l'allèle mutant spécifiquement dans les cellules B de la descendance. Des cohortes de souris *Ikzf3* mutantes hétérozygotes et homozygotes ont été

généérées et systématiquement comparées à des souris non mutées. L'expression du transcrit mutant et de la protéine IKZF3 mutée ont été vérifiées au préalable pour valider le modèle.

L'objectif de ce travail était donc multiple : 1) Etudier l'impact de la mutation sur le développement lymphoïde dans le modèle murin et sur la fonction des cellules B, 2) Caractériser le profil d'expression génique de cellules B porteuses de la mutation, 3) Identifier des mécanismes moléculaires de régulation de l'expression des gènes cibles d'IKZF3 en présence de la mutation, 4) Etudier le potentiel oncogénique de la mutation *in vivo* chez les souris.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié le retentissement de la mutation sur le développement lymphoïde et sur la fonction des cellules B chez des souris jeunes âgées de 3 mois. Nous avons montré que la mutation altérait le développement des cellules B spléniques en mettant en évidence une diminution de la proportion des cellules de la zone marginale et une augmentation de la proportion des cellules B folliculaires chez les souris mutantes hétérozygotes et homozygotes. Après immunisation avec des hématies de mouton, les souris mutantes homozygotes génèrent davantage de centres germinatifs dans la rate, ce qui suggère une réponse plus importante des cellules B à une stimulation antigénique. Par ailleurs, des expériences de stimulation *in vitro* des cellules B mutantes par des anti-IgM ont montré que les cellules B ont une meilleure activation en présence de la mutation (phosphorylation plus importante de SYK, AKT et ERK après 5 et 15min, et libération de calcium intracellulaire plus élevé). Ces cellules ont également une capacité de migration augmentée en réponse au SDF1- α .

Ces résultats nous ont ensuite conduits à explorer le profil d'expression génique des cellules B mutées. Nous avons réalisé des études transcriptomiques par RNA-seq dans des cellules B sauvages, ou mutantes homozygotes purifiées à partir de rates de souris de 3 mois. Les résultats ont montré que les cellules B mutantes homozygote avaient un profil d'expression génique unique et surexprimaient des gènes connus pour être impliqués dans le processus de lymphomagenèse tels que *Myc*, *Irf4*, *Jun*, *Cxcr4*, *Il10* ou des gènes de la voie NF- κ B dont *Nfkbid* et *Nfkbiz*. L'analyse des voies par Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) a montré un enrichissement en gènes appartenant à la voie de signalisation du BCR et une signature génique comparable aux cellules B de la zone claire des centres germinatifs.

Compte tenu des modifications d'expression génique observées, nous nous sommes ensuite demandés si la présence de la mutation dans le domaine de liaison à l'ADN modifiait la capacité d'IKZF3 à réguler l'expression de ces gènes cibles. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine avec IKZF3 suivi de séquençage NGS (ChIP-seq) ont été réalisées dans des cellules B mutantes homozygotes et sauvages pour identifier l'ensemble des sites de liaison d'IKZF3 à l'ADN et ses potentiels gènes cibles en présence ou absence de la mutation. Les résultats ont montré qu'IKZF3 mutant était fortement recruté au niveau de sites de démarrage de la transcription. La mutation induit une modification subtile de la reconnaissance du motif spécifique de la famille IKAROS, ce qui modifie la sélection des gènes cibles d'IKZF3. Le facteur de transcription mutant se trouve enrichi dans des régions promotrices où la protéine sauvage ne se lie pas ou peu.

En intégrant les données d'expression génique (données du RNA-seq) et le spectre des sites de liaisons à l'ADN (données du ChIP-seq), nous avons identifié les gènes cibles d'IKZF3 dont l'expression est directement modifiée en présence de la mutation. Pour cela, un score de « cible directe potentielle » a été attribué à chaque gène en prenant en compte la proximité de liaison d'IKZF3 mutant au gène étudié et son changement de niveau d'expression en présence de la mutation. Grâce à cette approche, nous avons montré que les gènes qui avaient les meilleurs scores (gènes cibles directs d'IKZF3 mutant) étaient principalement surexprimés, ce qui évoque un rôle d'activateur transcriptionnel. Parmi les principales cibles d'IKZF3 mutant, on retrouve *Nfkbid*, un composant de la voie NF- κ B, *Tagap*, une protéine à activité Rho-GTPase et *Jun*, un oncogène et facteur de transcription de la voie du BCR. Enfin l'analyse de la signature génique associée aux cibles d'IKZF3 mutant montre un enrichissement en gènes appartenant à des processus de migration, tel que *Cxcr4*, et des gènes de la voie du BCR.

Le dernier objectif de ce travail était d'étudier le potentiel oncogénique de la mutation d'*Ikzf3* *in vivo* et de voir si l'expression restreinte de la mutation dans le lignage lymphoïde B pouvait induire une lymphoprolifération. Pour cela, nous avons constitué des cohortes d'observation de souris mutantes hétérozygotes et homozygotes que nous avons comparées à des souris sauvages (environ 30 souris par groupe). Ces souris ont été suivies mensuellement par cytométrie en flux sur le sang périphérique avec un panel d'anticorps permettant de détecter la présence d'une population B atypique CD5⁺ circulante.

Nous avons détecté l'apparition d'une population clonale circulante de type LLC B220+CD5+Igκ entre 15 et 21 mois chez 11 souris *Ikzf3* mutantes hétérozygotes (36%) et chez 1 souris mutante homozygote (4%) alors qu'aucune souris *Ikzf3* non muté n'a présenté de lymphoprolifération. Après euthanasie des animaux atteints de LLC, la population B220+CD5+ a été retrouvée dans la rate et la cavité péritonéale alors que la moelle osseuse était faiblement infiltrée. La rate était élargie chez toutes les souris avec LLC. Ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie avec un marquage CD5/PAX5. La clonalité des cellules « LLC-like » a été confirmée par séquençage du gène *IGHV* en NGS. Par ailleurs, 2 souris mutantes hétérozygotes ont développé un lymphome B de haut grade diagnostiqué par la présence d'une splénomégalie et par immunohistochimie sur coupe de rate. Enfin, des expériences de greffe des cellules leucémiques ont été réalisées pour confirmer leur caractère tumoral. La greffe a été réalisée chez des souris immunodéprimées NSG et des souris congéniques CD45.2 irradiées. La population clonale était détectable dans le sang périphérique des souris receveuses 4 à 6 semaines après la greffe et infiltrait la rate, la cavité péritonéale, le foie et la moelle osseuse. Ces résultats montrent donc que la mutation *Ikzf3* est suffisante à elle seule pour induire une lymphoprolifération CD5+ de type LLC et démontrent pour la première fois son caractère oncogénique.

Nous avons ensuite entrepris une étude transcriptomique pour comprendre les événements oncogéniques conduisant au développement de la maladie. Nous avons trié les cellules de LLC *Ikzf3* muté ainsi que les cellules B *Ikzf3* muté issues du même animal d'une part, ou des cellules B de souris *Ikzf3* non muté d'autre part pour réaliser une étude transcriptomique par RNA-seq. Cette approche a permis de comprendre les changements d'expression de gène entre le stade B muté qui précède le développement de la maladie et le stade LLC. Nous avons observé que les cellules de LLC avaient un profil d'expression génique distinct des lymphocytes B non tumoraux porteurs de la mutation. Certains gènes identifiés comme étant surexprimés dans les cellules B mutantes l'étaient encore plus dans les cellules tumorales, ce qui suggère qu'ils jouent un rôle prédominant dans le développement de la maladie. Parmi eux, on retrouve les gènes *Myc*, *Il10*, *Egr1* et *Nfkbid*. L'analyse GSEA a montré un enrichissement en gène appartenant à la voie du BCR dans les cellules de LLC.

Enfin, la dernière partie du travail a consisté à étudier le transcriptome de patients porteurs de la mutation *IKZF3*, pour voir si les signatures transcriptionnelles identifiées chez la souris

sont similaires à celle de l'Homme. Le RNA-seq a été réalisé sur cellules de LLC de 4 patients *IKZF3* muté et 6 patients sans la mutation. Tous les patients avaient un statut *IGHV* non muté. L'analyse retrouve une fois encore un enrichissement en gènes de la voie du BCR, suggérant un rôle important de la mutation dans la régulation de cette voie.

A hotspot mutation p.L162R in *IKZF3* drives B cell neoplasia via transcriptional dysregulation

Gregory Lazarian^{1,2,3*}, Shanye Yin, PhD^{1,4*}, Elisa Ten Hacken, PhD^{1,4*}, Tomasz Sewastianik, MSc, PhD^{4,5,6}, Shuqiang Li^{7,8}, Heather Joyal¹, Leah Billington¹, Mariano Severgnini⁹, Elizabeth Witten¹, Mei Zheng¹⁰, Alba Font-tello, PhD¹¹, Valerie Lefebvre³, Catherine Gutierrez^{1,4}, Christopher J. Ott, PhD¹², Donna S Neuberg, ScD¹³, Fanny Baran-Marszak^{2,3}, MD, PhD, Florence Cymbalista^{2,3}, MD, PhD, Lili Wang, MD, PhD¹⁴, Ruben D. Carrasco, MD, PhD^{4,5,9} and Catherine J. Wu, MD^{1, 4,8#}

Affiliations

¹Department of Medical Oncology, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA

²INSERM, U978, Université Paris 13, Bobigny, France

³Laboratoire d'Hématologie, APHP Hôpital Avicenne, Bobigny, France

⁴Harvard Medical School, Boston, MA

⁵Department of Oncologic Pathology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA

⁶Dept. of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

⁷Translational Immunogenetics Lab, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA

⁸Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA

⁹Center for Immuno-Oncology, Dana-Farber Cancer Institute and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

¹⁰Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA

¹¹Center for Functional Cancer Epigenetics, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA

¹²Center for Cancer Research, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA

¹³Department of Data Sciences, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA

¹⁴Department of Systems Biology, Beckman Research Institute, City of Hope National Comprehensive Cancer Center, Monrovia, CA

*These authors contributed equally

#Correspondence: cwu@partners.org

Keywords: CLL, *IKZF3*, murine model, NF- κ B, BCR signaling

Abstract

IKZF3 encodes an IKAROS Family transcription factor and has been recently identified as a novel mutated gene in chronic lymphocytic leukemia (CLL), with all mutations occurring at a single hotspot (L162R) located within the DNA binding domain of the protein. Here we show that B cell-restricted conditional knock-in of this mutation skews B cell development and induces CLL-like disease in elderly mice (30% penetrance), confirming its role as a CLL driver. Furthermore, this mutation alters the DNA binding specificity and target selection of *IKZF3*, leading to overexpression of BCR/NF- κ B signaling genes and hyperactivation of these pathways. Likewise, we find an upregulated BCR signaling signature in human CLLs with *IKZF3*-L162R. Our studies highlight a novel mechanism by which mutation in a transcription factor activates the critical oncogenic BCR/NF- κ B signaling axis in CLL.

INTRODUCTION

Recent large-scale DNA sequencing studies of chronic lymphocytic leukemia (CLL) have identified a vast array of genetic alterations^{6,7}, however, their functions remain largely unknown. Amongst the novel discovered putative drivers, a hotspot mutation (L162R) in IKAROS Family Zinc Finger 3 (*IKZF3*, or AIOLOS) gene, which encodes a lymphoid-specific transcription factor with well-established roles in B cell development, mutated in ~3% CLLs and associated with fludarabine refractoriness^{6,8}. The same hotspot mutation has been previously identified in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), mantle cell lymphoma and Waldenström's macroglobulinemia, suggesting its critical role in malignant B cell transformation⁹⁻¹¹. In line with this notion, germline knockout of *Ikzf3* in mice causes B cell lymphomas¹². *IKZF3* contains four zinc-finger domains at the N-terminus essential for its binding to a consensus DNA motif a/gGGAA¹³⁻¹⁵, and the mutation is localized at the 2nd zinc-finger domain. Given the localization of this hotspot mutation at a critical functional domain for transcriptional regulation, we hypothesize that it might interfere with DNA sequence recognition and alter target selection of *IKZF3*.

As the conditional knock-in of mutations into endogenous murine gene loci is feasible¹⁶⁻²⁰, we generated a novel conditional knock-in murine model with B-cell restricted expression of the *IKZF3* mutation. We here demonstrate that *Ikzf3* mutation skews B cell development, enhances B cell activation, and leads to leukemia development in elderly mice. Mechanistically, *IKZF3* mutation directly impacts transcriptional regulation in B cells through altered target DNA recognition and thereby causing deregulated expression of genes involved in key CLL-associated pathways, including BCR/NF- κ B signaling.

RESULTS

Generation of a conditional knock-in mouse model with the *Ikzf3* mutation

To investigate the consequences of the *IKZF3* mutation *in vivo*, we generated a conditional knock-in mouse model with B cell-restricted expression of the *Ikzf3-L161R* mutation (analogous to human *IKZF3-L162R*) using the *Cd19-Cre/LoxP* system (**Figure 1a-b, Supp 1 a-b**). Our breeding strategy yielded cohorts of wild-type (*Cd19-Cre/+Ikzf3+/+, Ikzf3^{WT}*), heterozygous mutant (*Cd19-Cre/+Ikzf3fl/+, Ikzf3^{Het}*) and homozygous mutant (*Cd19-Cre/+Ikzf3fl/fl, Ikzf3^{Homo}*) mice (**Methods**). Presence of the floxed allele was confirmed by targeted PCR of genomic DNA (**Figure 1c**). We further confirmed that the mutant allele was specifically activated and expressed at ~50% and 100% allelic ratio in cDNA, respectively, in *Ikzf3^{Het}* and *Ikzf3^{Homo}* animals in CD19+ expressing cells, as detected by quantitative targeted cDNA pyrosequencing (**Figure 1d**). At the protein level, IKZF3 mutation did not lead to aberrant expression levels (**Figure 1e**), but immunofluorescence staining of purified splenic B cells (**Methods**) revealed a greater number and with higher intensity of a punctiform pattern of expression consisting of diffuse foci within nuclei ($p=0.02$; **Figure 1f**).

Ikzf3 mutation alters B cell development and function

We asked whether the *Ikzf3-L161R* mutation alters lymphoid development and function. To this end, we examined B-cell subpopulations within the bone marrow, spleen and peritoneal cavity in young mice (3 months of age) using multi-parameter flow cytometry (**Supp Figure 2a-b**). Despite the lack of differences in splenic B cell counts (**Supp Figure 3a**), we observed a dramatic decrease in proportions of splenic marginal zone B cells (defined as B220⁺ CD21^{high} CD23 negative) in the *Ikzf3^{Het}* ($p=0.005$) and *Ikzf3^{Homo}* mice ($p=0.002$) compared to *Ikzf3^{WT}* mice (**Figure 2a, top**), confirmed by immunohistochemical staining of spleen sections (**Figure 2a, bottom**). In parallel, we observed markedly increased proportions of splenic follicular B cells (B220⁺ CD21 negative, CD23^{high}) ($p=0.016$ and $p=0.0112$ in *Ikzf3^{Het}* and *Ikzf3^{Homo}* mice, respectively) (**Figure 2a**). No differences were detected across mouse lines in the splenic T1/T2 subpopulations (**Supp 3b**), nor in B cell fractions within the bone marrow or peritoneal cavity (**Supp 3c-f**).

Previous studies have provided evidence for the role of *Ikzf3* in the regulation of germinal center (GC) formation during immune responses¹². Upon immunization of 3-month-old mice

(6 mice per group) with the T-cell dependent antigen sheep red blood cells (SRBCs), we observed higher proportions of GC B cells in immunized *Ikzf3*^{Homo} compared to *Ikzf3*^{WT} and *Ikzf3*^{Het} mice (p=0.002), suggesting enhanced immune response in the presence of the mutation (**Figure 2c-d; Supp 3g**). Indeed, higher numbers of BCL6⁺ GCs were detected by immunohistochemical staining of splenic sections from immunized *Ikzf3*^{Homo} mice (**Supp 3h**). Consistent with the enhanced GC formation in mice with mutated *Ikzf3*, we observed increased plasma cell infiltration in the spleen (**Figure 2e, Supp 3i**). However, non-immunized mice with mutated *Ikzf3* had decreased levels of serum IgA levels (p≤0.02) and a trend of increased serum level expression of IL-5, suggesting defective immunoglobulin class switching in presence of the mutation (**Supp 3j-k**).²¹

Since activation of B cell receptor (BCR) signaling is known to lead to enhanced generation of follicular rather than MZ B cells²², we asked if *Ikzf3*-L162R alters BCR signal transduction. Indeed, immune stimulation of splenic B cells (with anti-IgM for 5 and 15 minutes) induced strong upregulation of phosphorylated SYK, AKT and ERK kinases in B cells from both *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice compared to those from wild-type mice, with a more pronounced activation in *Ikzf3*^{Homo} than in *Ikzf3*^{Het} mice (**Figure 2f; Supp 4a**). Moreover, more sustained calcium flux following BCR crosslinking was detected in *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} B cells compared to wildtype controls (p=0.05 and p=0.04, respectively, **Figure 2g-h**), consistent with enhanced responsiveness to anti-IgM.

***Ikzf3* mutation induces CLL-like disease in elderly mice**

To determine whether *Ikzf3* mutation directly drives CLL generation, we routinely monitored the peripheral blood of three cohorts of mice (*Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo}, n=30 each) for accumulation of B220⁺CD5⁺ CLL cells, starting from 6 months of age by flow cytometry. No circulating CLL cells were observed in any *Ikzf3*^{WT} mice up to 24 months of age (**Figure 3a**). In striking contrast, however, for 11 of 30 *Ikzf3*^{Het} mice (36%), we detected clonal B220⁺CD5⁺Igκ⁺ CLL-like cells comprising up to 10-50% of circulating cells between 18 and 24 month-of-age (**Figure 3a-b; Supp 5a**). Only 2 of 30 (6%) *Ikzf3*^{Homo} mice developed detectable circulating CLL-like disease and 1 (3%) had an infiltration of clonal CD5⁺ B cells limited to an axillary lymph node without circulating CLL-like cells, consistent with a small lymphocytic leukemia (SLL) (**Supp 5f-g**), although the majority of mice did not reach their endpoint.

Mice with CLL-like disease (positive for both CD5 and PAX5 markers) consistently displayed enlarged spleen (**Figure 3e**) with high infiltration of the spleen (30-80%) and peritoneal cavity, but only minimal marrow involvement, indicating a preferential homing of the *Ikzf3* mutant B cells to the splenic microenvironment, confirmed by CD5/PAX5 immunostaining in tissue sections by IHC (**Figure 3c-d**). Two of 30 (6%) *Ikzf3*^{Het} mice displayed an enlarged spleen without evidence of circulating disease; H&E staining of spleen sections from these mice revealed the cellular morphology of the infiltrated tumor cells to be consistent with diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) (**Supp 5 b-e**). *Ighv* sequence analysis of isolated B cell fractions from blood or spleen revealed that all CLL-like cells to clonally express fully unmutated *Ighv* genes (100% homology with germline), similar to human CLLs, whereas the DLBCL were *Ighv* somatically mutated (**Supplementary Table 1**).

We confirmed the ability of splenocytes or peritoneal cells derived from 5 CLL-*Ikzf3*^{Het} mice to engraft into both congenic immunocompetent (CD45.1) and immunodeficient (NSG) secondary hosts. CLL-like cells were detectable in the peripheral blood of NSG and CD45.1 recipient mice respectively 4 weeks and 20 weeks following transplant (**Supp 6a-e**).

***Ikzf3* mutation alters DNA binding and target selection in preleukemic mice**

To determine the molecular mechanisms altered by mut-*Ikzf3* that could lead to the generation of CLL, we performed genome-wide analyses of purified splenic B cells from preleukemic *Ikzf3*^{Homo} mice compared to the *Ikzf3*^{WT} mice, since we already identified clear phenotypic differences between these two groups (3-months old, n=3 per cohort). By RNA-sequencing, we identified a total of 402 significantly upregulated and 742 significantly downregulated genes in the *Ikzf3*^{Homo} compared to *Ikzf3*^{WT} mice (Figure 4a, Fold-change>2, FDR<0.05; **Supplementary Table 2**. Gene Ontology (GO) of these differentially expressed signatures revealed enrichment in processes involved in immune regulation (i.e. innate and adaptive immune system, cytokine production, calcium homeostasis) and cell migration (i.e. leukocyte migration, MAPK signaling, angiogenesis) (**Figure 4b, Supplementary Table 3**). Likewise, gene set enrichment analysis (GSEA) revealed *Ikzf3*^{Homo} B cells to have an expression signature typical of B cells residing the light zone of germinal centers (**Figure 4c**). In addition, the *Ikzf3*^{Homo} B cells displayed downregulation of genes involved in leukocyte migration, and depletion of signatures related BCR signaling inhibition in presence of BTK knockout²³. All together, these transcriptomic changes may explain *Ikzf3*^{Homo} increased

capacity to mount robust germinal center responses and respond to BCR stimulation, as observed through our functional studies of preleukemic cells (**Fig 2f-h**).

Given the localization of the hotspot mutation in the DNA binding domain, we asked whether this mutation altered the DNA binding specificity of *IKZF3*. To this end, we performed chromatin immunoprecipitation followed by deep sequencing (ChIP-seq) of IKZF3 protein in *Ikzf3*^{Homo} versus *Ikzf3*^{WT} splenic B cells (n=5 mice pooled per genotype). As shown in **Figure 4d**, we detected a strong recruitment of both wildtype and mutant IKZF3 to transcription start sites (TSS), consistent with the critical role of IKZF3 in transcriptional regulation. Altogether, we identified 3794 and 2795 high confidence IKZF3 peaks in perigenic regions from *Ikzf3*^{WT} and *Ikzf3*^{Homo} cells, respectively (>2-fold enrichment and FDR<0.001, **Methods, Supplementary Table 4**). Only 910 of 2795 (33%) peaks associated with *Ikzf3*^{Homo} cells were shared with the wildtype cells (**Figure 4e-left**), indicating altered DNA binding specificity in the presence of the mutation. Two dominant DNA binding motifs were found across the high confidence peaks identified for the *Ikzf3*^{WT} cells, including the canonical IKAROS family motif [AGGAAGTG], as well as an [ACAGGA] motif, which accounted for 54% and 38% of all peaks, respectively. Notably, although the peaks for the *Ikzf3*^{Homo} cells showed enrichment for these same two dominant motifs, the DNA sequences of these motifs had evidence of degeneracy (**Figure 4e-right**). These analyses thus suggested that *Ikzf3-L161R* alters IKZF3 DNA sequence recognition and target gene selection.

KEGG pathway analysis revealed that the ChIP-seq targets of both WT and mutant IKZF3 were most significantly enriched for BCR signaling genes (covering 50-60% of direct targets) (**Figure 4f; Supplementary Table 5**). Mut-IKZF3 targets were also enriched for several migration-related pathways (e.g. focal adhesion, leukocyte migration). To identify targets directly affected by mut-IKZF3, we integrated the ChIP-seq and RNA-seq data using Cistrome-GO²⁴, which ranks genes by considering both mut-IKZF3 binding strength to their promoter and the change in gene expression compared to the wildtype cells (**Methods**). Notably, by ranking significantly changed genes by Cistrome-GO, we found that the genes likely to be true direct targets of mut-IKZF3 (high Cistrome-GO rank) were more likely to be upregulated than expected by chance (**Figure 4g-h**). As shown in **Figure 4i**, 22 of the top 25 direct targets are upregulated (see **Supplementary Table 6** for full list). Visualization of the IKZF3 and activating histone mark H3K4me2 ChIP-seq data and RNA-seq data for the top

three direct targets affected by mut-IKZF3 is shown in **Figure 4j**. These three targets included *Nfkbid*, a putative regulator of NF-kappa-B signaling; *Tagap*, a Rho GTPase-activating protein; and *Jun*, an oncogenic transcription factor and a member of the BCR signaling pathway. In all three cases, mut-IKZF3 bound to nucleosome-free regions surrounding the TSS of target genes which are poorly recognized by WT-IKZF3, without changing the local nucleosome architecture. Together, these data suggest that *Ikzf3-L161R* functions as a change-of-function mutation that alters target selection and activates transcription.

We confirmed the overexpression of *Nfkbid*, *Tagap* and other highly relevant ranked targets in the mouse lines with mut-IKZF3 by quantitative real-time PCR (**Supp 7a**). Included among the top targets was also *Cxcr4*, which was recently shown to be regulated by *IKZF3* lung cancer²⁵. Given the importance of the CXCR4/SDF1 α axis in CLL for leukemic cell homing and interaction with the microenvironment, we tested *in vitro* chemotaxis of mouse B cell splenocytes using a transwell-based chemotaxis assay, and observed increased migration of *Ikzf3*^{Homo} cells toward SDF1 α (CXCL12), the cognate ligand for CXCR4 receptor, as compared to *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Het} ($P < 0.001$, **Supp 7b**). Altogether, these results suggest that the *Ikzf3-L161R* mutation alters IKZF3 DNA sequence recognition and subsequently function as a transcription activator for its new targets, with an impact on B cell functionality including BCR signaling and migration pathway enhancement.

***Ikzf3-L162R* activates BCR and NF- κ B signaling in CLL-like cells**

To determine the molecular events contributing to CLL development, we performed transcriptome analysis of FACS-purified CLL-like cells (n=5, 4 *Ikzf3*^{Het} and 1 *Ikzf3*^{Homo}, collected at median of 15 months of age) and non-CLL B cells from the same mice (mut-B cells, n=4, 3 *Ikzf3*^{Het} and 1 *Ikzf3*^{Homo}, Figure 5a), as well as normal B cells from age-matched WT animals (WT-B cells, n=3). PCA analysis revealed strikingly distinct gene expression profiles amongst CLL-like cells, while non-CLL cells with or without the mutation were relatively more similar (**Figure 5b**). Focusing on the most commonly deregulated events in the CLL-like cells, we identified 598 significantly upregulated genes and 267 downregulated genes compared to WT B cells (FC>2, FDR<0.05); these were assigned into 4 distinct clusters based on their expression levels in mut- and wild-type B cells (**Figure 5c**, **Supplementary Table 7**). Cluster I genes were significantly upregulated in the CLL-like cells compared to both WT and mut B cells, while Cluster II genes were upregulated in the B cells from mut-IKZF3 cells compared to WT B cells and the CLL-like cells. Cluster III and

IV genes were downregulated in CLL-like cells compared to WT B cells. Of note, 29 of 30 (96%) genes significantly activated by *Ikzf3-L161R* in young preleukemic animals (3-month-old) were also significantly upregulated in CLL-like cells (**Figure 5c**, black lines on right), and included *Nfkbid*, *Myc*, *Egr1*, *Ppp1r15a* and *IL10*, all found in Cluster I. Cluster I genes were highly enriched for key regulators of B cell regulation (i.e. lymphocyte activation, proliferation, and calcium-mediated signaling), as we observed in the young preleukemic mice (**Figure 5d**, **Supplementary Table 8**). Downregulated genes in CLL (Cluster III/IV) were enriched for lymphocyte differentiation, adaptive immune response and autophagy, which could also be highly relevant to CLL generation.

Notably, we observed a general upregulation of BCR signaling genes in CLL-like cells versus mut B cells from the same animals (FDR<0.001), supporting hyperactivation of BCR signaling as a cancer driver in our mouse model (**Figure 5e-f**, **Supp Table 8**). Consistent with this notion, we observed hyperactivation of BCR signaling in response to anti-IgM in CLL-like cells by western blot (**Figure 5g**). Since BCR signaling is known to activate downstream NF- κ B signaling, and since several regulators of NF- κ B signaling such as *Nfkb1* and *Nfkbie* were identified among the most upregulated BCR signaling genes, we performed a prediction of transcription factors regulating Cluster I genes. This analysis strikingly identified NFKB1 as the sole transcription factor putatively regulating over 23% of Cluster I genes (**Figure 5h**, p=0.002), but no such enrichment for Cluster II genes.

***IKZF3* mutation upregulates BCR signaling genes human CLLs**

To define if human CLL with mut-*IKZF3* have a distinct expression signature, we evaluated 10 human CLLs by RNAseq (mut-*IKZF3* [n=4], WT-*IKZF3* [n=6]). All patients were *IGHV* unmutated and had clonal *IKZF3* mutation (*IKZF3* mutant allele frequency >40% in PBMC) (**Supplementary Table 9**). Altogether, we observed 279 significantly upregulated and 317 downregulated genes in mut-CLLs versus WT CLLs (**Figure 6a**, FC>2 and FDR<0.05, **Supplementary Table 10**). KEGG analysis revealed that the upregulated genes were significantly enriched for pathways involved in glycolysis/gluconeogenesis, ribosome, HIF-1 signaling and the downregulated genes were enriched for multiple amino acid metabolic pathways (**Supplementary Table 11**). Of note, upregulation of ribosomal genes has also observed as the top upregulated pathway in our CLL mouse model, suggesting a functional relevancy.

Fully consistent with the murine data, mut-*IKZF3* drives aberrant overexpression of BCR signaling genes in human CLLs (**Figure 6b-c**).

To investigate the impact of *IKZF3* expression and mutation on global gene expression in human CLL, we examined the correlation between *IKZF3* expression and BCR signaling gene expression (by mean of 75 BCR signaling genes, see **methods**) in human CLL. Reanalyzing RNA-seq data of two independent CLL cohorts (DFCI cohort, n=138; ICGC cohort, n=275)^{26,27} our results revealed a significant positive correlation between *IKZF3* and BCR signaling genes (**Figure 6d-e**). These data implicated *IKZF3* as a master regulator of BCR signaling genes in human CLL, consistent with the murine cells. As deregulation of BCR signaling gene expression could also be a characteristic feature of human CLLs carrying either *IKZF3* mutation or overexpression, the influence of *IKZF3* on CLL generation could be widespread, supporting its role as a critical drug target for the development of novel therapies.

DISCUSSION

We report that the B cell-restricted expression of *Ikzf3* mutation, as a sole genetic event, generates clonal expansion of CD5⁺ mature B cells, to drive CLL at high penetrance. Mut-*Ikzf3* CLL mice display clinical pathologic features consistent with human disease, with relatively indolent growth and accumulation of clonal B cells in the blood, spleen, and peritoneal cavity, while infiltration in the bone marrow was unexpectedly low. Consistent with prior reports of the detection of this mutation in a small proportion of patients with GC-DLBCL⁹, we observed a few cases of *de novo* DLBCL in *Ikzf3*^{het} mice, in the absence of prior detection of circulating clonal CD5⁺ B cells, thus excluding Richter's transformation. Of note, early changes in B cell development and function were observed in young pre-leukemic mice harboring *Ikzf3* mutation, including proportional increases in follicular B cells and enhanced germinal center responses following immunization, all pointing to an impact of mutant-*Ikzf3* in modulating B cell responses and survival even before evident disease. Importantly, we detected association of mut-*Ikzf3* with hyperactivation of BCR signaling not only in the context of leukemia but in the pre-leukemic setting as well, thereby highlighting BCR deregulation as an early event promoting B cell transformation.

Mechanistically, ChIP-seq analysis revealed that the mutation changes IKZF3 DNA motif recognition, resulting in altered target selection, and upregulation of direct target gene expression, supporting its role as a transcriptional activator. Affected genes were enriched in BCR signaling and migration pathways, including, the regulator of NF- κ B signaling pathway *Nfkbid*, previously described as upregulated in the CLL E μ -TCL1 mouse model²⁸ and essential for B cell proliferation and maturation^{29,30}. We also observed upregulation of the oncogene *Myc*, and of the transcription factor *Irf4*, which has pro-tumorigenic functions in DLBCL, Hodgkin lymphoma and in myeloma³¹⁻³⁴. Notably, *Irf4* is essential for plasma cell development and immunoglobulin class switch recombination, functions that we observed to be altered in our preleukemic *Ikzf3* mutant mice³⁵. Another *Ikzf3*-MUT target was *Cxcr4*, the SDF-1 chemokine receptor, which plays a central role in regulating CLL-cells homing to tissue microenvironments.³⁶⁻³⁸ Interestingly, we also observed increased migratory capacity of the mutant B cells *in vitro* toward SDF-1 α , suggesting that dysregulation of the CXCR4/SDF1a support the development of CLL in our mouse model.

We recently reported another CLL murine model based on co-expression of two alterations commonly co-occurring in patient samples, mutation in the splicing factor *Sf3b1* and deletion in the DNA damage response regulator *Atm*¹⁷. In contrast to *Ikzf3*, *Sf3b1* mutation was associated to a reduced BCR signaling capacity and was alone insufficient to induce disease *in vivo*. Similar to *Ikzf3*, animals carrying deletion in (13q) (i.e. MDR)¹⁶, developed a similar spectrum of disease phenotypes, consistent with the relevance of deletion (13q) as an initiating event in CLL. The indolent nature of all these models, and the appearance of disease only in aging mice, confirms their faithfulness to human disease, thus representing more reliable platforms for the study of CLL pathogenesis, than the more aggressive, and more commonly used, Eu-TCL1 mouse.²⁰

When analyzing primary CLL samples carrying *IKZF3*-mutation, we confirmed dysregulation of the BCR and NF- κ B signaling pathway, similar to the murine model. Interestingly, re-analyzing transcriptomic data from 2 cohorts of human CLL (DFCI and ICGC)^{26,27}, we showed a positive correlation between *IKZF3* and BCR signaling genes expression, suggesting *IKZF3* as a key regulator of BCR signaling genes in human CLL. Interestingly, *IKZF3* expression has been reported to be upregulated in CLL cells compared to normal B cell or other B hematological malignancies³⁹⁻⁴¹. Moreover, a preliminary unpublished study has reported evidence of *IKZF3* mutation selection not only with FCR but also with ibrutinib, the mutation increasing or remaining stable in the cancer cell fraction of a few patients relapsing after ibrutinib treatment (ASH abstract 850, Inhye et al.) The development of chemo-free targeted therapies, such as BTK inhibitor ibrutinib or BH3-mimetic venetoclax, has changed the therapeutic landscape in CLL. Despite the efficiency of Ibrutinib in CLL patients with adverse prognosis, relapses occur, related to development of BTK or PLCG2 mutation resistances. However, other mechanisms might explain these relapses, as these mutations are not systematically identified in patient with refractory disease. Given the link we established between *IKZF3* mutation and activation of BCR signaling, further functional analysis is required to investigate the impact of this mutation on efficacy of ibrutinib, targeted BTK inhibitors.

These insights suggest that a stepwise accumulation of alterations that convergently impact probably a limited set of pathways is required to generate CLL. Future deep characterization of diverse genetically engineered mice that model CLL-associated putative drivers, and a

comparison of their effects will allow us to define the unique and common events needed to transform normal B cells to CLL. Defining these steps is expected to impact diagnosis, progression, prevention and therapy of CLL, and these insights may be extendable to other B cell malignancies as well.

METHODS

Primary Human Samples

All primary CLL samples were obtained from Avicenne Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France. Specimens were collected from patients from general practice conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and with the approval of the Institutional Review Boards of Avicenne Hospital and Dana-Farber Cancer Institute. Informed consent was obtained from all subjects. Their clinical characteristics are reported in Table S1. Tumor samples were collected at baseline, before initiation of any therapy. Fresh CLL cells were isolated from peripheral blood using the Ficoll method and flow cytometry analysis confirmed tumor purity >80% in all cases.

Mouse model

All animal protocols were approved by the Institutional Care and Use Committee of the Dana-Farber Cancer Institute (DFCI). Based on the homology between the human and the murine IKZF3 amino acid sequences and given the high conservation of the DNA binding domain across the two species, *Ikzf3* L161R floxed mice (*Ikzf3* fl/+) on C57BL/6 background were generated to model the human L162R mutated site, as previously described⁴² (Biocytogen, MA). To obtain B-cell-specific *Ikzf3*- L161R mutation expression, *Cd19*-Cre/Cre mice were crossed with the *Ikzf3* fl/+ mice. The offspring from this breeding gave wild-type mice *Cd19*-Cre/+*Ikzf3*+/+ (*Ikzf3*^{WT}) and heterozygous mutant mice *Cd19*-Cre/+*Ikzf3*fl/+ (*Ikzf3*^{Het}) simultaneously. We then bred the heterozygous mutant mice with *Ikzf3* fl/fl mice to obtain homozygous mutant mice *Cd19*-Cre/+*Ikzf3*fl/fl (*Ikzf3*^{Homo}).

Genotype was performed by PCR of genomic DNA from tail using a set of primers targeting the floxed allele (Forward A1-LoxP: 5'-CTTGACTCTGTGAGTCCGTTTTGC and Reverse A2-LoxP: 5'-CAGTGACACAGATCGCTTGGGAAC). This reaction amplifies a wild-type product of 217 bp and a second PCR product of 281 bp corresponding to the floxed allele. Activation of the floxed allele by the Cre recombinase was checked by PCR on genomic DNA from purified B cells and non-B cells fractions using a set of primers that amplifies the activated allele (Forward B2: 5'TGCTGCTCTCCAGACACAAGGC and Reverse mF11: 5'TCATGATGAGTCCCATGCCACGC Reverse). This reaction amplifies a wild-type product of 880 bp and a second PCR product of 907 bp corresponding to the activated allele.

The PCR products were run on a 2% gel with a 100 bp ladder as reference. Presence of the activated allele was detected only in the purified B cells fraction.

Pyrosequencing

Relative transcript expression of the mutant allele compared to the wild-type sequenced was performed by cDNA pyrosequencing, as previously described.¹⁷ Biotinylated amplicons generated from PCR of transcript surrounding *Irf3* L161R mutation were generated. Immobilized biotinylated single stranded DNA fragments were isolated per manufacturer's protocol (PyroMark Gold Q96, Qiagen, Valencia, CA) and sequencing undertaken using an automated pyrosequencing instrument (PSQ96; Qiagen, Valencia, CA), followed by quantitative analysis using Pyrosequencing software (Qiagen). Forward (5'ATCAGTGTGGGGCATCTTT) and reverse (5'Bio-TTTTCCCCTGTGTGCAGTTTAA) primers were used to amplify the region across the L161R mutation site from the cDNA; the probe sequence was 5'TACTCAGAAAGGTAACCTC.

Disease blood monitoring in mouse cohorts

Mice were monitored monthly from the age of 3 months until 24 months of age. 100 µl of blood was collected from mice into EDTA-containing tubes via submandibular. Erythrocyte lysis was carried out by incubating the blood in 1 ml of ACK buffer for 5 min and then washing with PBS supplemented with 2% FCS and 2 mM EDTA. The cells were then stained with a cocktail of antibodies against CD5-FITC, B220-Pacific Blue, CD11b-APC-Cy7, CD3-APC and Igκ-PE for 15 min at 4°C. Cells were then washed and analyzed using flow cytometry.

B cell purification

Mice were euthanized in a CO₂ chamber and the harvested spleens or femurs were mechanically dissociated to form a single cell suspension. Erythrocyte lysis was carried out using ACK buffer and B cells were immunomagnetically selected from the resulting cell suspension using the MACS B cell Isolation Kit for mouse (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Post-sort B cell purity was confirmed on a FACS Canto I using the flow cytometry staining procedures described above, and were at least 85% pure, but typically >90%.

Immunohistochemistry

All spleens were fixed in 10% buffered neutral formalin overnight (Fisher Scientific, Waltham, MA), followed by 70% ethanol until the tissues were processed. Spleens were then paraffin-embedded and sectioned into 20µm for IHC staining. Hematoxylin and Eosin staining, BCL6, IgM, B220, and CD5 immunostaining were performed on the section with standard procedure.

Immunofluorescence

Purified B cells from mouse spleens were cytopspun on glass slides at a density of 1×10^6 cells/ml in 200µl PBS+ 10% FCS, fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for 15min, wash 3 times in PBS+ 0.1% Tween-20, permeabilized 5 min in PBS+ 0.1% TritonX-100 and blocked 1h in PBS+0.1% Tween-20 supplemented with 5% FCS. Cells were incubated overnight at 4°C with the primary murine antibody anti-IKZF3 (clone: 8B2, Ebioscience). The following day, the slides were washed 3 times in PBS+ 0.1% Tween-20, incubated with the secondary antibody anti-mouse conjugated to Alexa488 for 1h at room temperature, washed 3 times and the nuclei were counterstained with DAPI. Coverslips were mounted onto glass slides in Vectashield (Vectorlabs, Clinisciences, Montrouge, France) and immunofluorescence was analyzed on a confocal microscope Leica. ImageJ software was used for foci quantification per nuclei. 100 nuclei were analyzed per condition.

B cell subpopulation analysis

The proportion of the cell subpopulations from the bone marrow, the spleen and the peritoneal cavity was analyzed by flow cytometry based on the expression of surface markers. Cells from the bone marrow or the spleen were extracted by mechanic dissociation, and erythrocytes lysis was carried out with ACK lysis buffer. Cells were washed in with PBS supplemented with 2% FCS and 2mM EDTA and incubated with antibodies cocktail for 15minutes at 4°C. Cell suspensions prepared from spleen were stained with the following antibodies (all purchased from BioLegend, San Diego, CA): antibodies anti-B220-BV421, CD93-BV650, anti-CD23-BV786, anti-CD21-BV510, anti-IgD-APC.Cy7 (ref. 405716) and anti-IgM-PE.Cy7 for marginal zone B cells, follicular B cells and transitional B cells quantification; marrow cell suspensions were stained with anti-CD43-PE, anti-IL-7R-BV711, anti-CD93-BV650, anti-B220-BV421, anti-CD11b-PerCP.C5.5, anti-TER-119-PerCP.C5.5, anti-CD3e PerCP.C5.5, anti-Ly6G/Ly6C PerCP.C5.5, anti-IgD-APC.Cy7 and anti-IgM-PE.Cy7 for pro-B cells, pre-B cells, immature, transitional and mature B cells quantification;

and peritoneal cavity cells with anti-CD5-FITC, anti-B220-PacificBlue and anti-CD11b-APC.Cy7 antibodies for B1a cells quantification.

Immunization

Mice of 8-12 weeks were immunized intraperitoneally with 10^9 sheep red blood cells (Immunoresearch) in 150 microliters PBS. Spleens were collected 10 days after immunization and analyzed by flow cytometry to quantify germinal center B-cells using a combination of anti-B220-BV421, anti-CD95-PE and anti-CD38-APC antibodies and plasma cells with anti-CD138-BV421, anti-TACI-PE, anti-B220-PerCP.Cy5.5 and anti-CD19-APC.Cy. Spleen sections were analyzed by immunohistochemistry and stained with anti-BCL6 antibody for germinal centers and with anti-CD138 for plasma cells detection.

Western blot

Cells were harvested, washed with PBS, and lysed for 30 minutes at 4°C with RIPA buffer (Boston Bioproducts, Boston, MA) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (1 tablet in 10 ml RIPA buffer, Roche, San Francisco, CA). Cell lysate was clarified by centrifugation at $10,000\times g$ for 5 minutes, and cell extracts were fractionated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P nitrocellulose membranes (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA). Membranes were stained with the following primary antibodies: mouse anti-IKZF3 (8B2, Ebioscience), rabbit anti-AKT antibody (40D4), anti-p-AKT (Ser473) antibody (D9E), anti-ERK1/2 antibody (137F5), anti-p-ERK1/2 antibody (Tyr202/204) (D13.14.4E), anti-p-SYK (Tyr 525/526), anti-SYK, anti- β -ACTIN and polyclonal anti-HSP90 (ref.4874S). Except IKZF3, all antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Horseradish peroxidase-coupled goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibodies were then added (Rockland Immunochemicals Inc, Limerick, PA). The bands were visualized by using the ECL chemiluminescence Western blotting detection system (GE Healthcare, Boston, MA).

BCR stimulation

For analysis of BCR signaling transduction, purified splenic B-cells (3×10^6) were stimulated in 1ml RPMI 1640 medium (Life Technologies, Woburn, MA) supplemented with 10% FCS, and 1% penicillin/streptomycin in the presence of 10 μ g/ml goat anti-mouse IgM (Southernbiotech, Birmingham, AL) for 5 or 15 min at 37°C. Cells were harvested, washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS), and lysed for 30 minutes on ice with RIPA

buffer (Boston Bioproducts, Boston, MA) supplemented with a protease inhibitor mix (1 tablet in 10 ml RIPA buffer, Roche, San Francisco, CA). Cell debris was removed by centrifugation at 12,000×g for 5 minutes, and cell extracts were fractionated by SDS-PAGE followed by western blot analysis.

Cell migration assay

For chemotaxis assays, 5×10^5 purified splenic B cells from each genotype were seeded on the upper chamber of a transwell (6.5-mm diameter, 5.0- μ m pore size, Corning). 200 ng/mL CXC chemokine ligand CXCL12(SDF-1 α) (ref.250-20A, PeproTech) were next added to the lower chamber. After 3 hours of incubation at 37°C, the cells migrated to the lower part of the chamber, were flow cytometer counted for 30 seconds. The migration index was calculated as (number of cells migrated toward CXCL12 – number of cells migrated spontaneously) \times 100/(total number of cells).

Intracellular calcium mobilization

Intracellular calcium flux was measured by use of the fluorogenic probe Fluo3AM (Invitrogen). 10^7 cells/mL in complete RPMI 1640 medium (Life Technologies, Woburn, MA) purified splenic B cells were incubated with 4 μ M Fluo3-AM and 0.02% (v/v) of Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich) for 30 minutes at 37°C. Cells were then washed and resuspended at 5×10^6 cells/mL in complete RPMI 1640 at room temperature. Cells were kept at 37°C for 5 minutes before the acquisition of background fluorescence for 30 seconds, followed by addition of 10 μ g/mL goat F(ab')₂ antihuman IgM (Southern Biotechnology) or 2 μ M Ionomycin and data acquisition for a further 5 minutes. Calcium flux readings were analyzed using the Kinetics platform in FlowJo software (TreeStar). Fluo3AM intensity values were normalized to the average signal intensity of the 30 s baseline.

Quantitative PCR

Total RNA was extracted from mouse splenic B-cells using the Qiagen RNA purification kit (Venlo, Limburg) following manufacture's instruction. 500ng of RNA was transcribed into cDNA using the SuperscriptII reverse transcription kit (Life Technologies). The expression of mRNAs was analyzed in splenic B cells from *Ikzf3* WT, heterozygous or homozygous mutant mice using the TaqMan Gene Expression Assays probes (ThermoFischer): *Nfkbid* (Mm00549082_m1), *Cxcr4* (Mm01996749_s1), *Myc* (Mm00487804_m1), *Irf4*

(Mm00516431_m1). Quantitative real-time PCR was performed on a 7500 Real-time PCR system (Life Technologies). Target gene expression was normalized to the mean Ct values of the housekeeping gene *Gapdh* (Mm99999915_g1).

BCR sequencing

Genomic DNA was isolated using the QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) either from PBMC or FACS sorted CLL-like (CD5+B220+) cells from the spleen of leukemic mice and 0.5-1 µg of genomic DNA per sample was used for sequencing. Sample data was generated using the immunoSEQ Assay (Adaptive Biotechnologies, Seattle, WA). The somatically rearranged mouse *IGH* CDR3 was amplified from genomic DNA using a two-step, amplification bias-controlled multiplex PCR approach^{43,44}. The first PCR consists of forward and reverse amplification primers specific for every V and J gene segment and amplifies the hypervariable complementarity-determining region 3 (CDR3) of the immune receptor locus. The second PCR adds a proprietary barcode sequence and Illumina adapter sequences. BCR repertoire analyses were performed using the immunoSEQ Analyzer 3.0 (Adaptive Biotechnologies). Sequences were subjected to analysis using IMG/Quest software to define all V, D and J genes as well as CDR3 sequences.

Mouse CLL transplantation and treatment

Transplantations were performed on 8–12 weeks old immunocompetent CD45.1 C57BL/6 mice (pre-conditioned with 400 rads split dose irradiation) or immunodeficient recipient NSG mice using viably cryopreserved splenocytes or peritoneal cells from donor CLL *Ikzf3* mutant heterozygous animals. Ten million total cells suspension/recipient were resuspended in 100 microliters PBS and injected intravenously into CD45.1 C57BL/6 or NSG. Disease burden in the peripheral blood, spleen and bone marrow were evaluated by flow cytometry and spleen and liver sections were examined by IHC at euthanasia.

RNA-sequencing

RNA-seq was performed on purified splenic B cells (1x10⁶) from 2-3 months and 15-18 months old *Ikzf3* wild-type, heterozygous and homozygous mutant mice as well as FACS sorted B220+CD5+ CLL cells from leukemic mice or from human primary CLL samples. Cells were washed in cold PBS and total RNA was extracted using Qiagen RNeasy kit. For cDNA libraries construction, total RNA was quantified using the Quant-iT™ RiboGreen®

RNA Assay Kit and normalized to 5 ng/μl. Following plating, 2 μL of ERCC controls (using a 1:1000 dilution) were spiked into each sample. An aliquot of 200ng for each sample was transferred into library preparation which uses an automated variant of the Illumina TruSeq™ Stranded mRNA Sample Preparation Kit. This method preserves strand orientation of the RNA transcript. It uses oligo dT beads to select mRNA from the total RNA sample, followed by heat fragmentation and cDNA synthesis from the RNA template. The resultant 400bp cDNA then goes through dual-indexed library preparation: ‘A’ base addition, adapter ligation using P7 adapters, and PCR enrichment using P5 adapters. After enrichment, the libraries were quantified using Quant-iT PicoGreen (1:200 dilution). After normalizing samples to 5 ng/μL, the set was pooled and quantified using the KAPA Library Quantification Kit for Illumina Sequencing Platforms. The entire process was in a 96-well format and all pipetting is done by either Agilent Bravo or Hamilton Starlet.

ChIP-sequencing

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed on splenic B cells (80×10^6) from 2-3 months old *Irf3* wild-type and homozygous mutant mice. Cells were washed in cold PBS, fixed in 1% formaldehyde at room temperature for 10 min and the fixation reaction was quenched with 0.125M glycine for 5 min at room temperature. The nuclei were resuspended and lysed in 500μl of shearing buffer containing 0.5% SDS, 10mM EDTA pH8, 50mM Tris-HCl pH8, 5mM sodium butyrate and protease inhibitor. The chromatin was sheared on the Covaris E220 sonifier, according to the following program: PIP70, 5% duty factor, 200 cycles per burst, 25min. The sheared chromatin was diluted in 1% Triton, 2Mm EDTA, 150 Mm NaCl, 20Mm Tris-HCl pH8 plus protease inhibitor. A small portion of the sheared chromatin was set aside as total input, reverse crosslinked with 1 μl of 10mg/ml RNAase for 30 min at 37°C and 5μl of 20mg/ml Proteinase K at 65°C overnight, purified using the Qiagen PCR purification Kit and DNA is quantify on Qubit 3.0 fluorimeter. For immunoprecipitation reaction, 25μl of Dynals magnetic beads were washed in blocking buffer (PBS plus 0.5% BSA) on a magnetic rack and incubated with 5 μg of anti-IKZF3 antibodies (Millipore, clone 9D10) or anti-H3K4me2 (Millipore, ref. 07-030) at 4°C end over end for 4 hours. Conjugated beads were incubated with 25μg of diluted sheared chromatin end over end overnight at 4°C. The following day, beads were washed twice with 1ml of cold RIPA buffer, 1 ml of cold RIPA 0.3M NaCl, and with 1 ml of cold LiCl buffer. The enriched fraction of chromatin was eluted and decrosslinked from the beads by incubating with elution buffer (1%

SDS, 0.1M NaHCO₃), 1 µl of 10mg/ml RNase for 30 min at 37°C and 5µl of 20mg/ml Proteinase K at 65°C overnight. The immunoprecipitated chromatin was cleaned up using the Qiagen PCR purification Kit. Input and ChIP Libraries were prepared with the Rubicon ThruPLEX FD kit (ref. R400429, Takara Bio USA) and sequenced on Illumina NextSeq instrument to generate 75bp single-end sequencing reads.

Data analysis

RNA-seq reads were aligned to the mouse reference genome mm10 using STAR (v2.4.0.1) and TPM (Transcripts Per Kilobase Million) value was used to measure gene expression. Differentially expressed genes were assessed using DESeq2 and pathway analysis is performed using Metascape (v3.0) and GSEA (v3.0). ChIP-seq reads were aligned to mm10 using Bowtie2 (v2.3.4.1) and peak detection was performed with MACS2 (v2.2.0); motif analysis was performed using RSAT motif; heatmaps and metagene plots were made using deepTools (v3.3.0). Peak annotation was performed using GREAT (v4.0.4)⁴⁵. Integrative analysis of RNA-seq and ChIP-seq data was performed using Cistrome-GO²⁴. Briefly, a differential expression (DE) rank R^{DE} is derived based on the FDR representing the significance of differential expression as a result of the *Ikzf3-L161R* mutation. Secondly, a regulatory potential (RP) rank R^{RP} is defined based on the weighted sum of mut-IKZF3 peak contributions around transcription start site (TSS). The two ranks were integrated by rank product ($R^{DE} \times R^{RP}$), and the genes at the top of the list tend to have robust mut-IKZF3 binding together with significant gene expression changes, thus are more likely to be true direct targets. The list of 75 BCR signaling genes were obtained from GSEA KEGG_B_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY.

Luminex assay

Multiplexed measurement of individual mouse immunoglobulin isotypes (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgE and IgM) from sera was performed using Luminex magnetic beads technology according to the manufacturer's protocol (Antibody Isotyping 7-Plex Mouse ProcartaPlex Panel, ref. EPX070-20815-901, ThermoFisher). Cytokines and chemokines quantification from sera was performed using 26-Plex Mouse ProcartaPlex kit (EXP260-26088-901, ThermoFisher) including : IFN-gamma; IL-12p70; IL-13; IL-1 beta; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; TNF-alpha; GM-CSF; IL-18; IL-10; IL-17A; IL-22; IL-23; IL-27; IL-9; GRO alpha; IP-10; MCP-1; MCP-3; MIP-1 alpha; MIP-1 beta; MIP-2; RANTES; Eotaxin.

Plasmid and cell line

IKZF3 c.485T>G open reading frame clone (ORF BRDN0001056521) was obtained from the human ORFEOME V8.1 LIBRARY collection and recombined by LR recombination into the Gateway destination vectors MSCV-N-Flag-HA-IRES-PURO (Addgene, plasmid # 41033). The corresponding vector containing the *IKZF3* wild-type ORF was obtained by PCR site-directed mutagenesis with a set of mutagenesis oligonucleotides encompassing the region of the gene containing the point mutation but matching with the wild-type sequence. The mutagenesis reaction was performed according to the manufacturer's instruction (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Aligent) using the following primers: Reverse mutagenic primer 5'-GCAGTTTAATGTGGCGGAGGAGGTTACCTTTCTGAG and Forward mutagenic primer: 5'-CTCAGAAAGGTAACCTCCtCCGCCACATTAAACTGC. The sequences of the plasmids were confirmed by Sanger sequencing.

The constructs were introduced into HEK293T cells through transfection using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Grand Island, NY) per manufacturer's recommendations. Briefly, HEK293T cells were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Woburn, MA) supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 10 µg/mL Streptomycin (Gibco, ThermoFisher). HEK293 cells were plated in 6-well plates 24 hours before transfection with wild type or mutant *IKZF3* ORF (5µg) constructs or the empty vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. Next, 48 hours after overexpression, cells were treated with Lenalidomide (Selleckchem) for 24h. Protein lysates were prepared and subsequently analyzed by Western Blot analysis with a murine anti-FLAG antibody (Sigma Aldrich, ref. F3165).

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6. For comparison of 3 groups, p-values were calculated with a one-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison test after confirming homogeneity of standard deviation. When the standard deviations were significantly different, p-values were calculated for 2 groups at a time using a Mann-Whitney comparison test with a Bonferroni correction (nominal p-value adjusted by multiplying by the number of groups compared). Kaplan-Meier survival curves were analyzed using a log rank-test.

DATA AVAILABILITY

Accession Codes

The accession number for the raw and processed ChIP-seq and RNA-seq data reported in this paper is GEO: GSE143711.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was in part supported by NCI 1R01 CA21673-01 (L.W. and C.J.W.), NCI 1R01 CA155010-01A1 (C.J.W.), NCI 1U10 CA180861-01 (C.J.W.), NHLBI 1R01 HL103532-01 (C.J.W.), NHLBI 1R01 HL116452-01 (C.J.W.), the Lymphoma Research Foundation (C.J.W.), a Leukemia Lymphoma Translational Research Program Award (C.J.W.); NIH R01 DK087992 (M.D.F.); NIH P01 CA81534 (T.J.K.), NIH Cancer Center Core Grant 5P30 [CA006516](#) (D.N.); NIH R35 GM122524 (R.R.); NHLBI ZIA HL002346-13 (A.W.); US Public Health Service grants R01 CA63113 (J.A.D.), R01 CA173023 (J.A.D.), P01 CA203655 (J.A.D.); the Leukemia and Lymphoma Society fellowship (E.T.H.) and National Science Foundation Graduate Research Fellowship DGE1144152 (J.F.).

DECLARATION OF INTERESTS

C.J.W. is a co-founder, equity holder and scientific advisor to Neon Therapeutics, Inc. and receives research funding from Pharmacyclics. C.J.W., D.N. has been a consultant for H3 Biomedicine and received research funding from Celgene. All other authors do not have any relevant conflict of interest.

FIGURE LEGEND

Figure 1: Conditional expression of *Ikzf3-L162R* mutation in a mouse model

(a) Schematic representation of human and murine *IKZF3* gene with the exons, the corresponding zinc finger domains (Zf) and the position of the homologous mutation. (b) Knock-in strategy to remove the fragment containing exon 5 to 8 followed by a STOP codon between the two loxP sequences with the Cre recombinase and to subsequently activate the point mutation. (c) Schema of the strategy used for generating conditional expression of *Ikzf3-L161R* in a B-cell specific fashion through crossing with CD19-Cre mice. Presence of the activated *Ikzf3-L161R* allele was restricted in B-cell DNA as detected by DNA PCR (d) Mutant and wild-type alleles were detected from mouse B splenocyte RNA pyrosequencing. Left, expected pyrosequencing profiles and observed pyrograms for *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} purified splenic B cells. Right, *Ikzf3* mutant transcript ratio relative to the wild-type transcript in *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice (6 mice per group) showing correlation between genotype and allelic ratio. (e) Western blot analysis of IKZF3 protein levels in *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo}. β -ACTIN was probed as a loading control. (f) Right, immunofluorescence staining of IKZF3 WT in *Ikzf3*^{WT} B cells and of IKZF3 L161R in *Ikzf3*^{Homo} B cells. B cells were purified from spleens and prepared on cytospin slides before staining. Nuclei were counterstained with DAPI. Left, nuclear dot density in *Ikzf3*^{WT} and *Ikzf3*^{Homo} B cells. The nuclear dots density was quantified using ImageJ software. 100 cells have been analyzed from 10 different fields (n=3 mice per group).

Figure 2: *Ikzf3* mutant mice have an abnormal splenic B cell development and function

(a) Top, representative FACS plot analysis of marginal zone B cells (MZ) and follicular B cells (FO) gated on B220+CD93- cells from the total splenocytes suspension. Bottom, representative immunohistochemical staining of spleen sections from *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice (3 months of age). Red dash lines indicate marginal zone stained with anti-IgM antibody. (b) The percentages of B cells per spleens and different B-cell populations in the spleens of *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice. FO: follicular B-cells, MZ: marginal zone B-cells. Data represent Mean \pm SEM of indicated number of biological replicates. Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (c)

Representative FACS plot analysis of germinal center B cells (GC) gated on B220+ cells from the total splenocytes suspension 10 days after immunization with sheep red blood cells (SRBC) or with the vehicle. **(d)** The percentage of germinal centers B cells CD95+CD38- per spleen identified by flow analysis in *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice 10 days after immunization with SRBC or with the vehicle. Data represent Mean±SEM of 6 biological replicates. Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test **(e)** Representative immunohistochemical staining of spleen sections from immunized *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice (3 months of age). Plasma cells are stained with anti-CD138 antibody; Scal bars, black: 500µm, white: 50µm **(f)** top left, a schematic shows a simplified overview of the BCR signaling pathway. Right, Representative Western Blot analysis of phospho-SYK, phospho-AKT, and phospho-AKT and the corresponding total proteins in splenic B cells from *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice 5 min following BCR stimulation with anti-IgM (10µg/mL). HSP90 was probed as a loading control. Bottom, quantification of the Western-Blot results at 5 min after BCR stimulation. Data represent Mean±SEM of three independent experiments. Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test **(g)** Facs analysis of calcium flux following anti-IgM stimulation (top) and with ionomycin (bottom) of splenic B cells from *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice. Data were acquired for 300s. **(h)** Air under the curve of the calcium flux in B cells stimulated with anti-IgM. Data represent Mean±SEM of 3 biological replicates. Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Figure 3: Conditional expression of *Ikzf3*-L162R mutation is sufficient to generate murine CLL-like disease

(a) Top, Kinetic of detection of B220+CD5+ cells in peripheral blood. Bottom, number of cases of CLL, diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and small lymphocytic lymphoma (SLL) in each group **(b)** Flow cytometry analysis of B220+ CD5+ cells within peripheral blood (PB), spleen (SP) and bone marrow (BM) of *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het}-CLL and *Ikzf3*^{Homo}-CLL mice. **(c)** HE staining and immunohistochemical staining of CD5+PAX+ cells in the spleen and the bone marrow tissues of *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het}-CLL and *Ikzf3*^{Homo}-CLL mice. Representative spleens are shown for each group of mice. Scale bars, black: 500µm, white: 50µm **(d)** Percentage of CLL cells in bone marrow (BM), spleen (SP) and peritoneum cavity (PC) of

CLL mice (e) Left, size of the spleens of leukemic and non-leukemic mice. Right, representative pictures of spleens of *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het}-CLL and *Ikzf3*^{Homo}-CLL mice.

Figure 4 : *Ikzf3* mutation alters DNA binding and target selection

(a) Heatmap shows normalized expression of significantly changed genes between *Ikzf3*^{Homo} and *Ikzf3*^{WT} B cells (n = 3 per group). (b) Network enrichment analysis of the differentially expressed genes using Metascape. Functional categories are represented by different colors, and a circle node denotes an enriched term (see **Supplementary Table 3**). (c) Gene set enrichment analysis of several gene signatures differentially expressed between *Ikzf3*^{Homo} and *Ikzf3*^{WT} B cells. (d) Heatmap of IKZF3 ChIP-seq signals around all genes in the genome. (e) Venn diagram shows the overlap of IKZF3 peaks between *Ikzf3*^{Homo} and *Ikzf3*^{WT} B cells. The DNA sequence motifs of the peaks, as well as the number of peaks containing the motif are also shown. (f) Top KEGG pathways significantly enriched for genes with WT- or mut-IKZF3 peaks are shown. (g) Significantly changed genes are ranked by Cistrome-GO ranks, with upregulated genes in red and downregulated genes in blue. (h) The cumulative distribution of up or downregulated genes based on Cistrome-GO ranks in (g). Genes were equally divided into 19 bins and the top ranking genes are to the left (Bin 1). (i) Scatterplots of log₂ fold changes versus logFDR of all differentially expressed genes. Red dots are the top ranking genes by Cistrome-GO. (j) IGV tracks of IKZF3 and H3K4me2 ChIP-seq, as well as RNA-seq coverages at the top three target genes in *Ikzf3*^{WT} and *Ikzf3*^{Homo} B cells. Red box indicates the position of the new binding site of mut-IKZF3.

Figure 5 : *Ikzf3* mutation activates BCR signaling in CLL-like cells

(a) Representative data show flow cytometry sorting of non-CLL B cells (B220+ CD5-) and CLL-like cells (B220+ CD5+) from splenocytes for RNA-seq analysis. (b) PCA analysis of gene expression profiles from different group of cells. (c) Heatmap shows normalized expression of significantly changed genes between CLL-like cells and *Ikzf3*^{WT} B cells (n=3-5 per group). Genes were divided into four groups based on K-means cluster. Black lines indicate significantly upregulated genes in *Ikzf3*^{Homo} versus *Ikzf3*^{WT} B cells from 3 months old mice. (d) Functional categories significantly enriched for genes in different clusters are shown. (e) GSEA analysis of changes in expression of BCR signaling genes between CLL-like cells and non-CLL cells from the same mice. (f) Scatterplots of log₂ fold changes versus logFDR of all BCR signaling genes. (g) Western Blot analysis of BCR signaling activity in

different groups, as described in Figure 2f. **(h)** Scatterplots of transcription factors predicted to regulate cluster I genes (% of cluster I genes regulated by certain transcription factor and the logP-value of enrichment) are shown. Line indicates p-value of 0.05.

Figure 6. Human CLLs with mut-*IKZF3* also show extensive upregulation of BCR signaling genes

(a) Heatmap shows normalized expression of significantly changed genes between *IKZF3* WT (n=6) and mut (n=4) CLL cells. **(b)** GSEA analysis of changes in expression of BCR signaling genes between *IKZF3* WT and mut cells. **(c)** Scatterplots of log₂ fold changes versus logFDR of all BCR signaling genes. **(d)** Drug treatment. **(e)** Correlation between *IKZF3* expression and BCR signaling gene expression in 107 CLL cases (DFCI cohort) and an independent cohort containing 274 cases (ICGC). **(f)** Mean expression (TPM) of 75 BCR signaling genes in cases with high or low *IKZF3* expression, which was defined by median expression.

Figure 1: Conditional expression of *Ikzf3-L162R* mutation in a mouse model

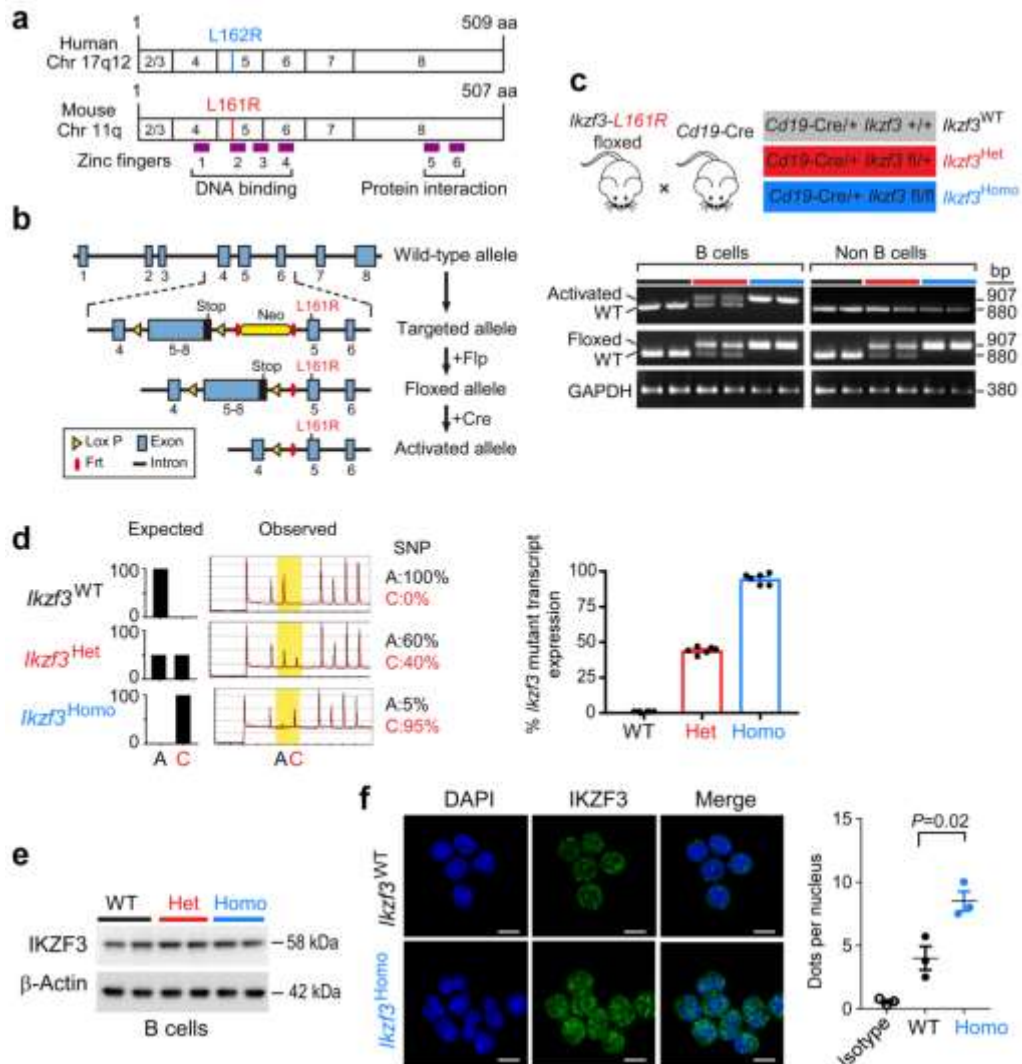


Figure 2: *Ikzf3* mutant mice have an abnormal splenic B cell development and function

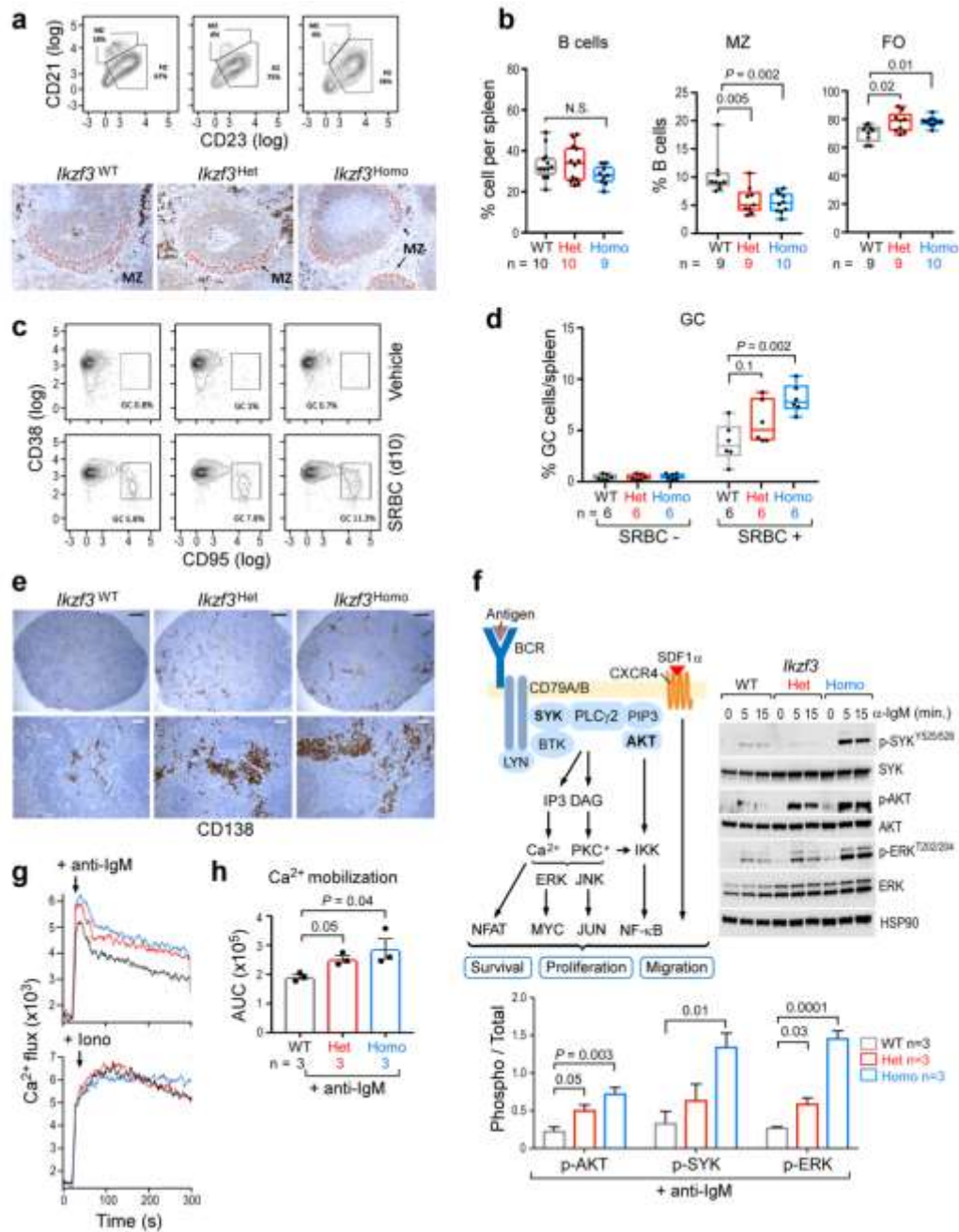


Figure 3: Conditional expression of *Ikzf3*-L162R mutation is sufficient to generate murine CLL-like disease

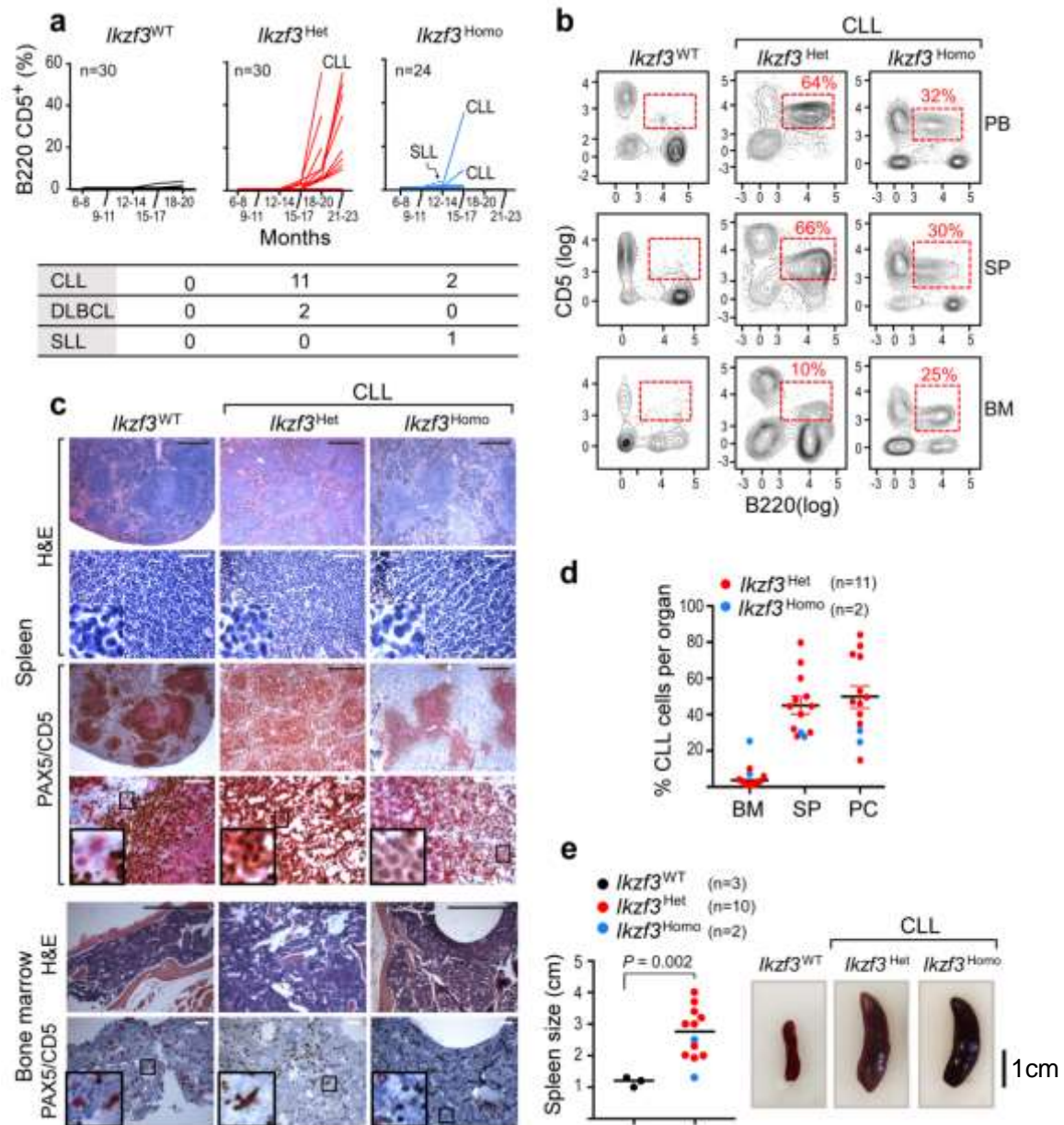


Figure 4 : *Ikzf3* mutation alters DNA binding and target selection

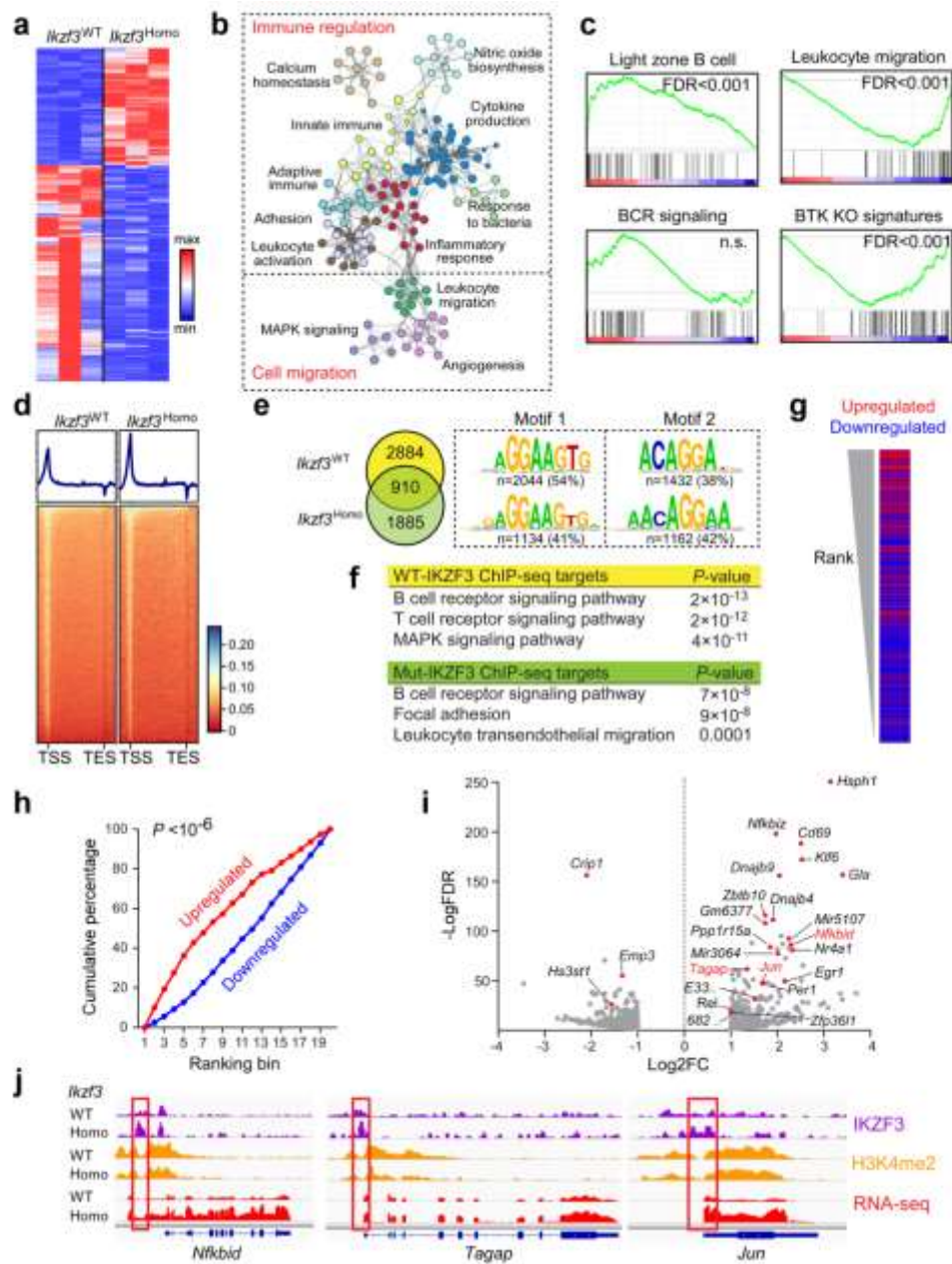


Figure 5 : *Ikzf3* mutation activates BCR signaling in CLL-like cells

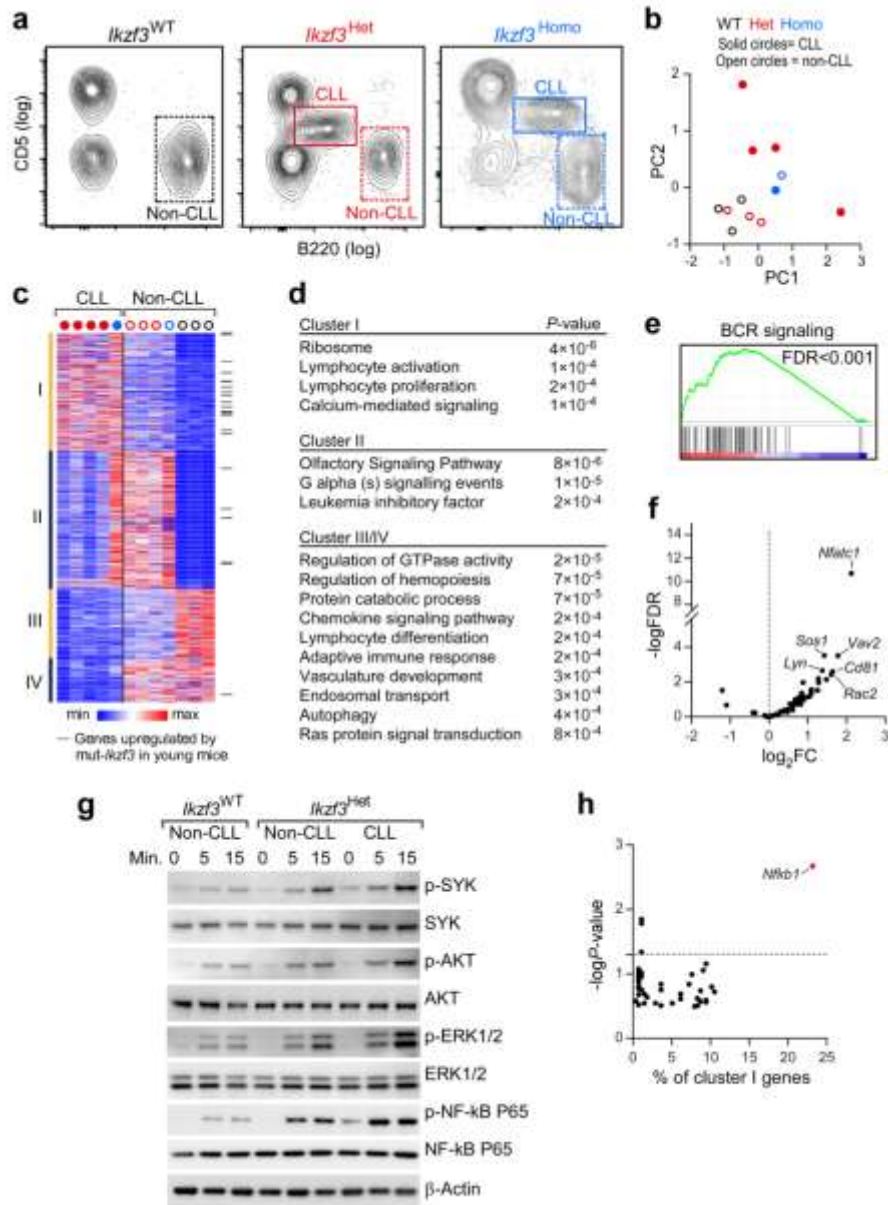


Figure 6. Human CLLs with mut-*IKZF3* also show extensive upregulation of BCR signaling genes

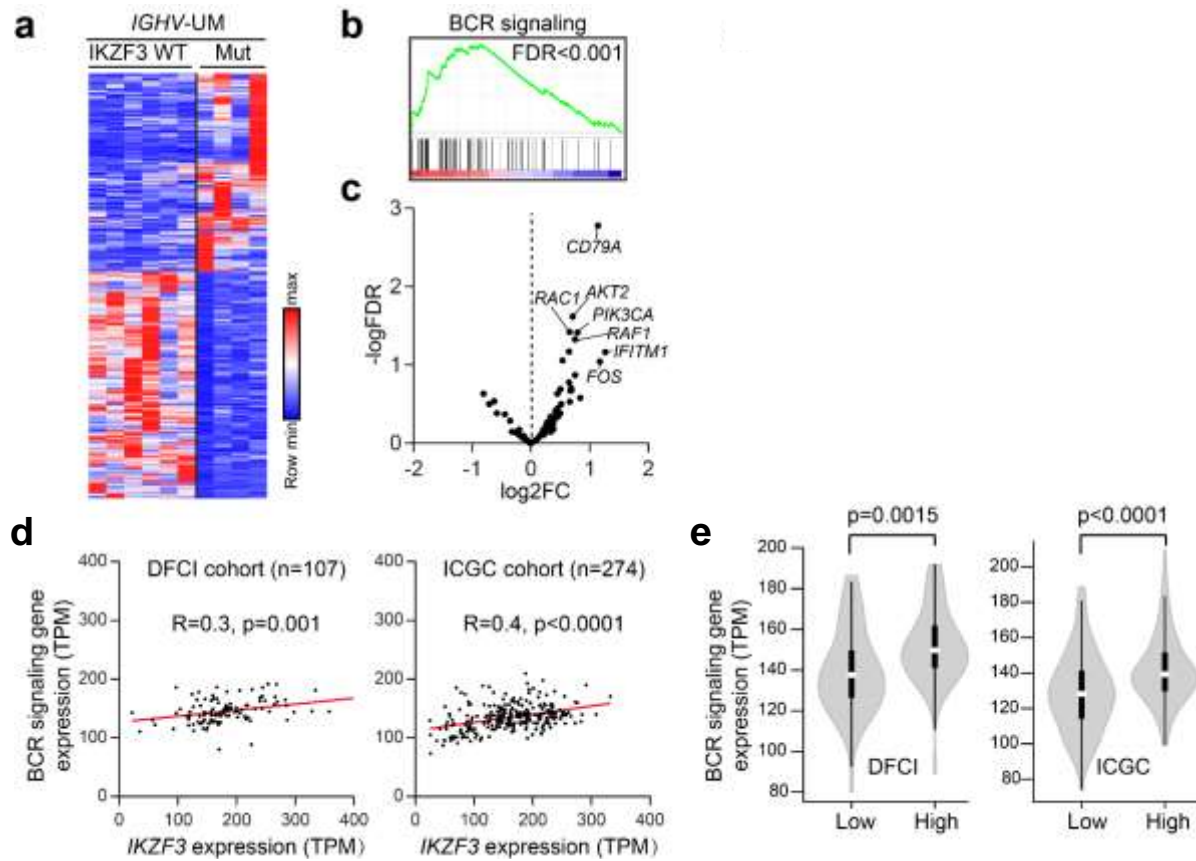


TABLE OF CONTENTS FOR SUPPLEMENTAL FILES AND TABLES

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1: Generation of *IKZF3-L161R* conditional knock-in mice. (a) Conservation of the human L162R residue of *IKZF3* across species

Supplementary Figure 2: Mouse B cell development. (a) Schematic representation of the B cell development. The relevant cell surface markers expressed on developing B cells in the bone marrow, the peritoneum and the spleen are shown **(b)** Gating strategy for quantification of the B cell subsets in bone marrow, spleen and peritoneum cavity

Supplementary Figure 3: Quantification of the B cell subsets in young mice. (a) Absolute number of splenocyte per spleen **(b)** Proportion of T1 and T2 cells per spleen **(c)** Proportion of B cells in bone marrow (BM) **(d)** proportion of pro B cells, Pre-B cells, Immature B cells (Imm B) and transitional B cells in bone marrow (BM) **(e)** Proportion of B cells in peritoneum cavity (PC) **(f)** Percentage of B1-a cells in peritoneum cavity **(g)** Percentage of B cells per spleen in immunized mice with sheep red blood cells after 10 days **(h)** Representative immunohistochemical staining of spleen sections from immunized *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice (3 months of age). Germinal centers are stained with anti-BCL6 antibody (brown). **(i)** Absolute number of plasma cells per spleen from immunized mice with sheep red blood cells for 10 days **(j)** IgA quantification from the sera. For all figures, analysis was done in *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice (3 months old mice). **(k)** Il-5 quantification in the sera of *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice. Data represent Mean±SEM of the indicated biological replicates. Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Supplementary Figure 4: BCR signalling and migration pathway are altered in *Ikzf3* mutant B cells. (a) Quantification of Western Blot analysis of phospho-SYK, phospho-AKT, and phospho-AKT normalized to the corresponding total proteins in splenic B cells from *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice 15 min following BCR stimulation with anti-IgM (10µg/mL). Data represent Mean±SEM of three independent experiments. Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test

Supplementary Figure 5: *Ikzf3* L161R mice develop CLL-like disease and DLBCL. (a) Left, flow cytometry analysis of B220+ CD5+ cells within the spleen (SP) and the peritoneum (PC) of *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het}-CLL and *Ikzf3*^{Homo}-CLL mice. Right, HE staining and immunohistochemical staining of CD5+PAX+ cells in the liver tissues of *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het}-CLL and *Ikzf3*^{Homo}-CLL mice. Scale bars, 500µm (b) Flow cytometry analysis of the peripheral blood (PB), the spleen (SP), the bone marrow (BM) and peritoneum (PC) in *Ikzf3*^{Het} mice with DLBCL (c) HE staining and immunohistochemical staining of CD5+PAX+ cells in the spleen and liver tissues of *Ikzf3*^{Het} mice with DLBCL. Scale bars, black: 500µm, yellow: 10µm (d) Picture of the spleen and liver of *Ikzf3*^{Het} mice with DLBCL (e) Spleen size quantification (f) Flow cytometry analysis of a lymph node of a *Ikzf3*^{Het} mice with small lymphocytic leukemia (g) Picture of the spleen and axillar lymph node of a *Ikzf3*^{Het} mice with small lymphocytic leukemia

Supplementary Figure 6: *Ikzf3* mutant CLL cells are transplantable. (a) Flow cytometry analysis of the peripheral blood, the spleen, the bone marrow and the peritoneum of NSG mice 6 weeks post transplant with mut-*Ikzf3* CLL cells (b) Representative picture of the infiltrated organs of NSG mice (c) Flow cytometry analysis of the peripheral blood, the spleen, the bone marrow and the peritoneum of CD45.1 mice 6 weeks post transplant with mut-*Ikzf3* CLL cells (b) Representative picture of the infiltrated organs of CD45.1 mice (e) Kaplan Meir analysis of the survival curve of the NSG and CD45.1 mice after transplant with mut-*Ikzf3* CLL cells

Supplementary Figure 7: Mutant IKZF3 is a transcriptional activator (a) qPCR analysis of the top direct IKZF3-mutant targets in splenic B cells from *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice. Data represent Mean±SEM of 3 biological replicates. Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. (b) Index of migration of splenic B cells from *Ikzf3*^{WT}, *Ikzf3*^{Het} and *Ikzf3*^{Homo} mice plated in Transwell plates for 3h with SDF-1. Data represent Mean±SEM of 6 biological replicates. Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Supplementary Excel Tables Overview

Supplementary Table 1 | Sequence analysis of the dominant productive *Ighv* rearrangement of CLL/DLBCL mice obtained by NGS sequencing.

Supplementary Table 2 | Differentially expressed genes between *Ikzf3*^{Homo} and *Ikzf3*^{WT} B cells from 3 months old mice.

Supplementary Table 3 | Functional categories enriched for differentially expressed genes between *Ikzf3*^{Homo} and *Ikzf3*^{WT} B cells from 3 months old mice by metascape.

Supplementary Table 4 | ChIP-seq peaks of WT- and Mut-IKZF3.

Supplementary Table 5 | KEGG pathways enriched for ChIP-seq targets of WT and Mut-IKZF3.

Supplementary Table 6 | Cistrome-GO analysis of differentially expressed genes between *Ikzf3*^{Homo} and *Ikzf3*^{WT} B cells from 3 months old mice.

Supplementary Table 7 | Differentially expressed genes between CLL vs. WT B cells (mouse).

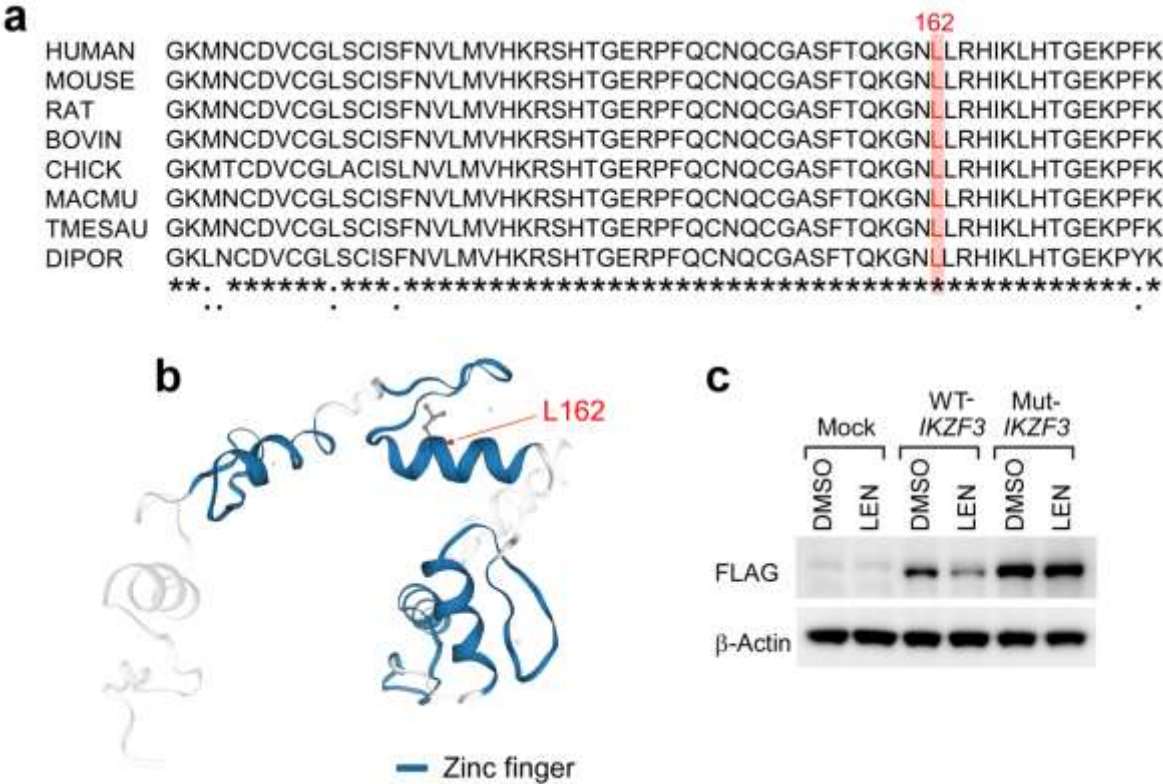
Supplementary Table 8 | Functional categories associated with Cluster I-IV genes by metascape in CLL cells (mouse).

Supplementary Table 9 | Characteristics of *IKZF3* mutant and wild-type CLL patients that underwent RNA-sequencing analysis.

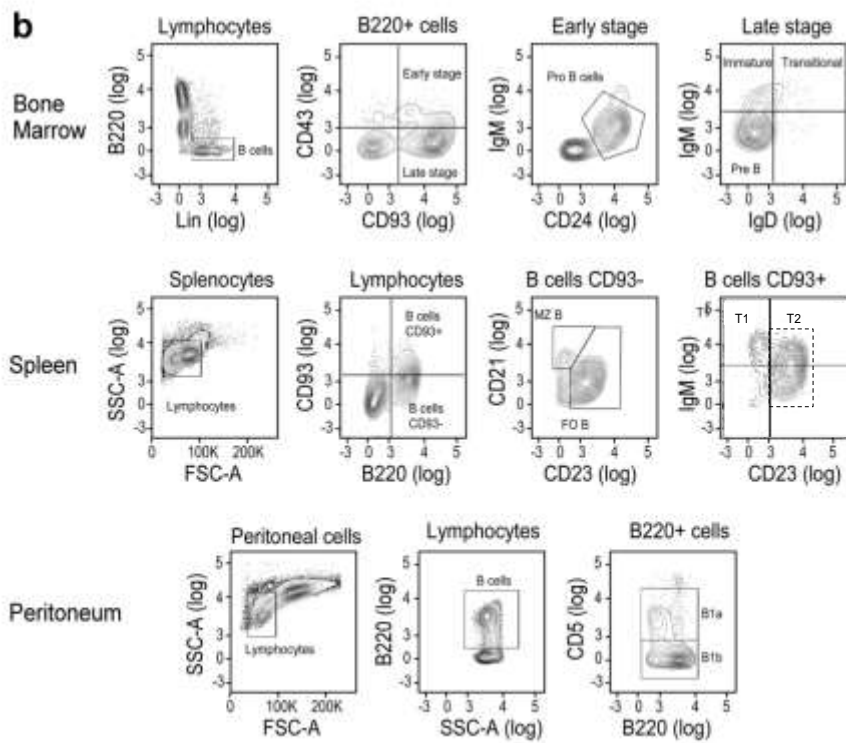
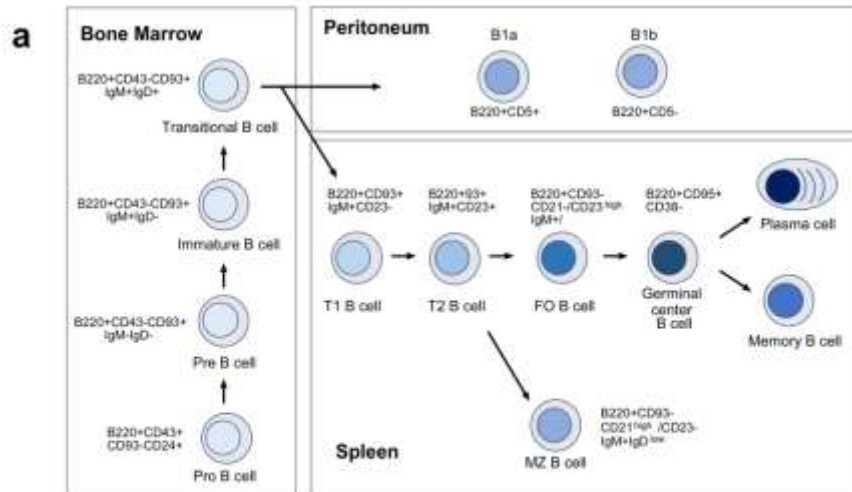
Supplementary Table 10 | Differentially expressed genes between *IKZF3* mut vs. WT CLLs (human).

Supplementary Table 11 | Functional categories enriched for differentially expressed genes between *IKZF3* mut vs. WT CLL patients by metascape.

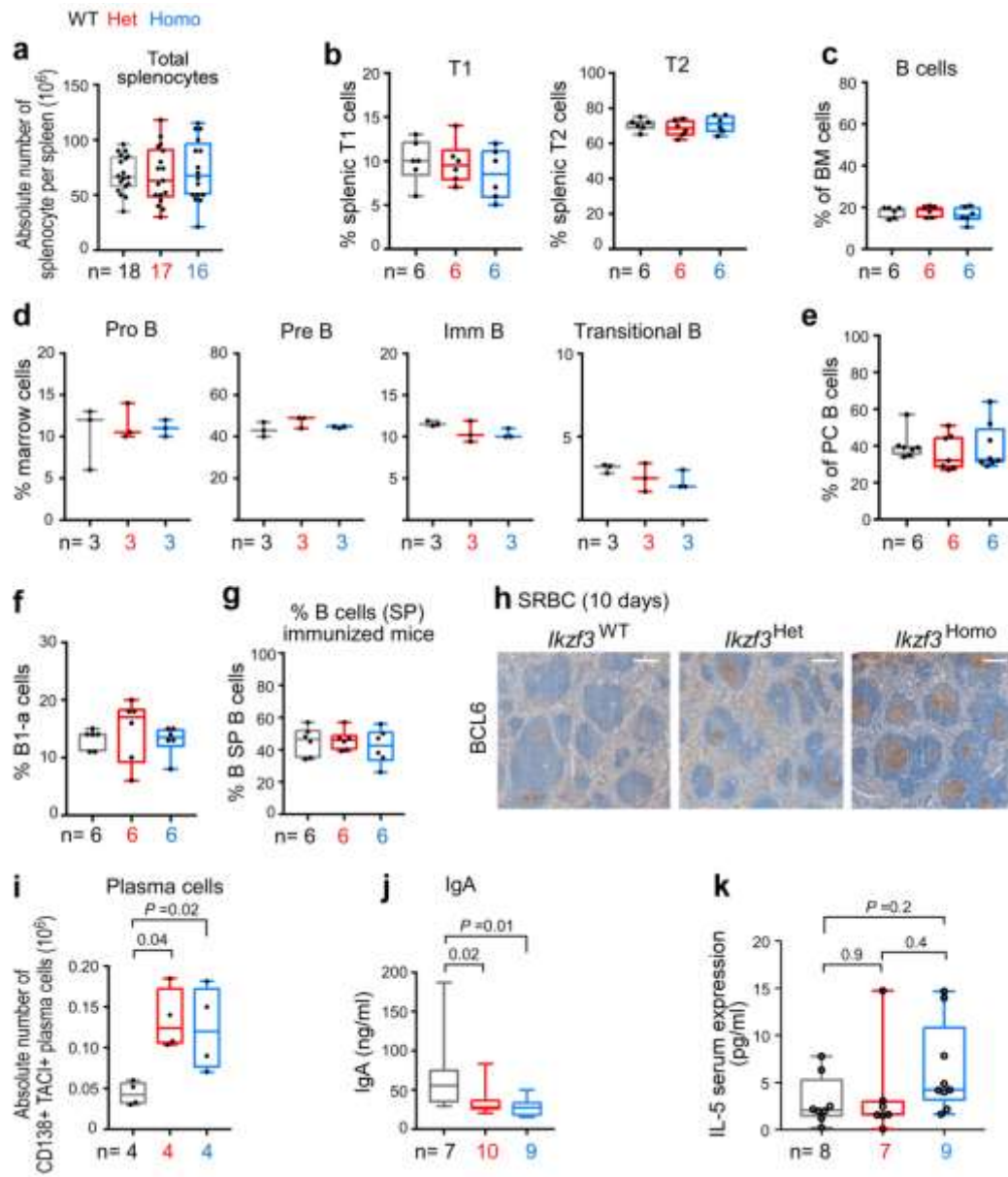
Supplementary Figure 1: Generation of *IKZF3-L161R* conditional knock-in mice.



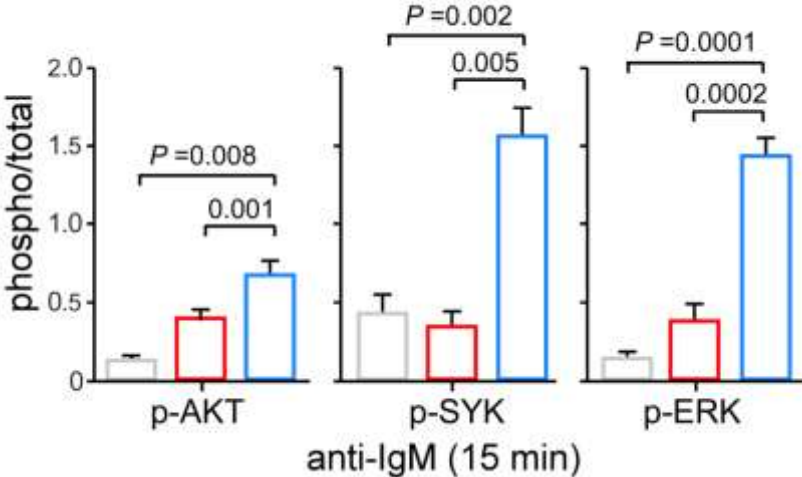
Supplementary Figure 2: Mouse B cell development.



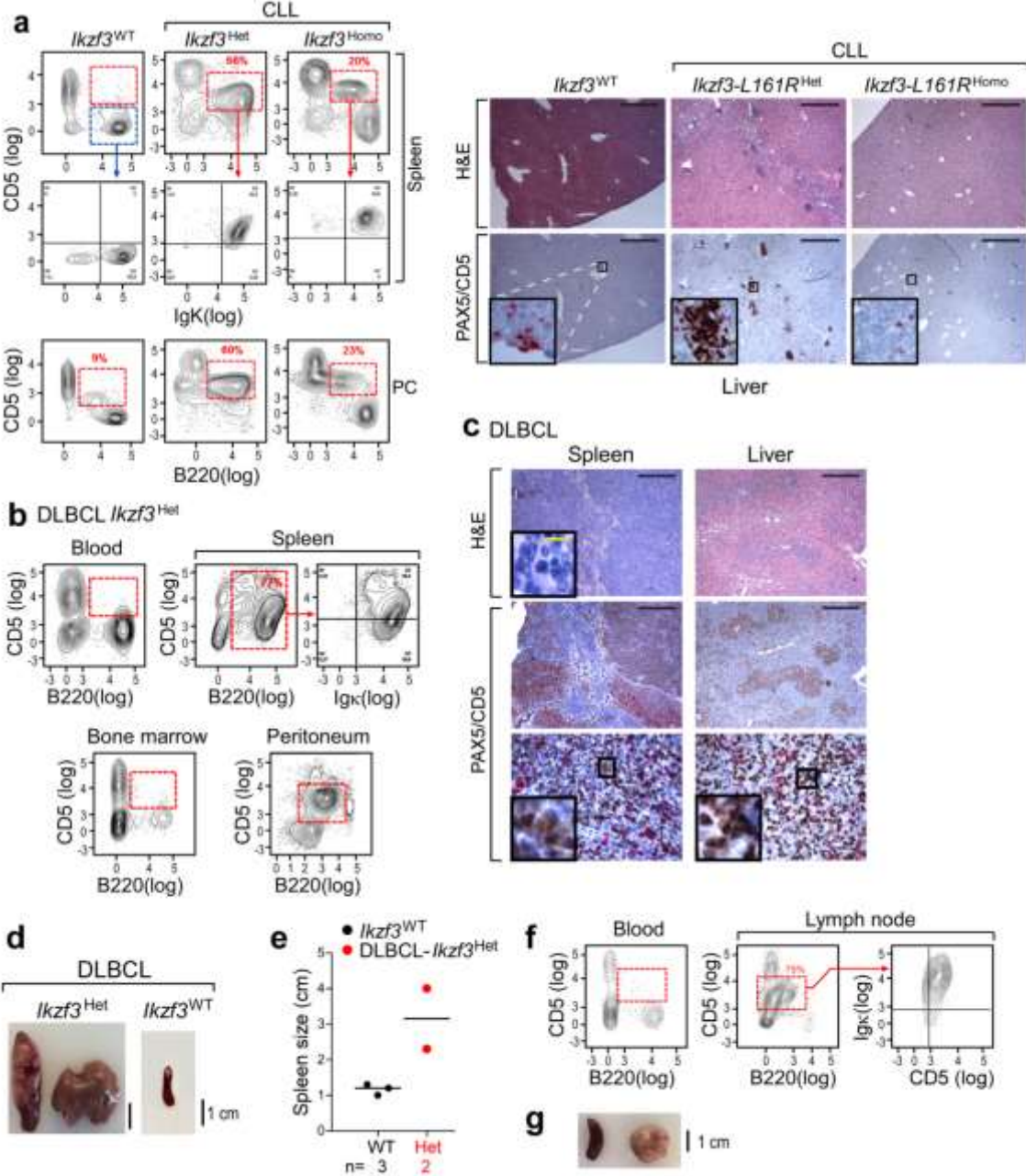
Supplementary Figure 3: Quantification of the B cell subsets in young mice.



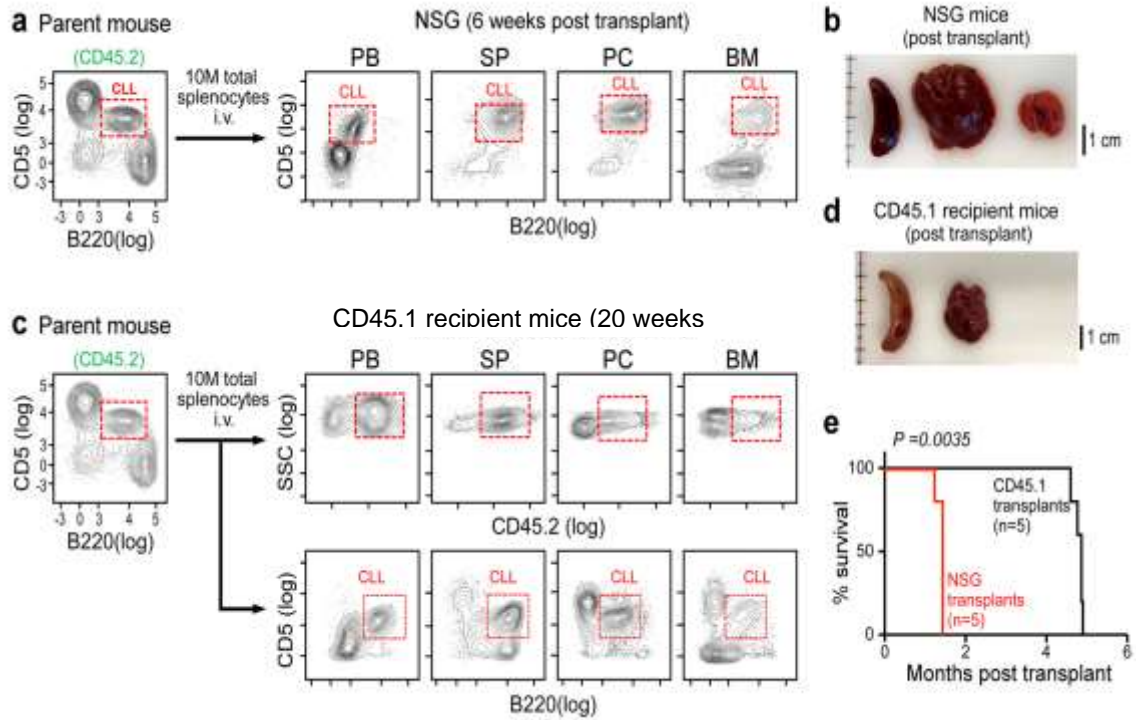
Supplementary Figure 4: BCR signalling and migration pathway are altered in *Ikzf3* mutant B cells.



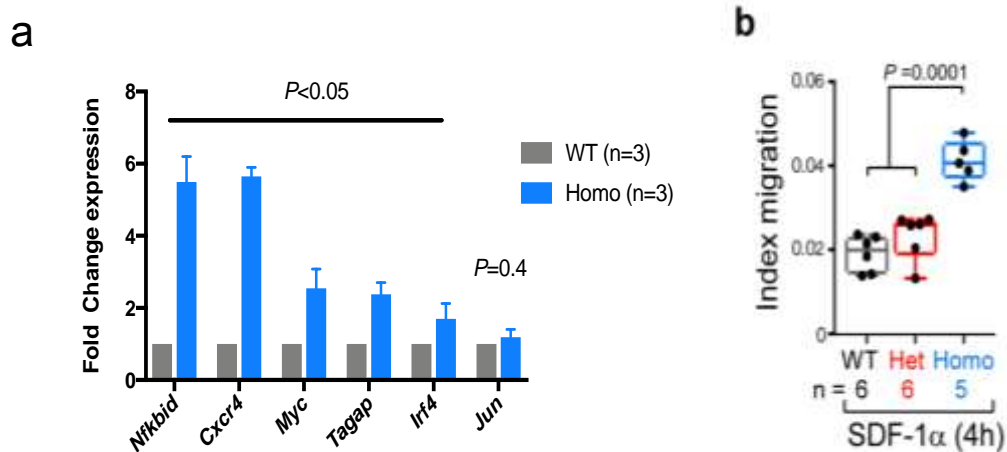
Supplementary Figure 5: *Ikzf3* L161R mice develop CLL-like disease and DLBCL.



Supplementary Figure 6 : Ikaros mutant CLL cells are transplantable.



Supplementary Figure 7 : Mutant IKZF3 is a transcriptional activator



REFERENCES

1. Hallek, M. *et al.* Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* **22**, 439-47 (1996).
2. Hallek, M. *et al.* Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **93**, 1732-7 (1999).
3. Ibrahim, S. *et al.* CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 181-6 (2001).
4. Del Poeta, G. *et al.* Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 2633-9 (2001).
5. Oscier, D.G. *et al.* Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* **100**, 1177-84 (2002).
6. Landau, D.A. *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **526**, 525-30 (2015).
7. Puente, X.S. *et al.* Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **526**, 519-24 (2015).
8. Morgan, B. *et al.* Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J* **16**, 2004-13 (1997).
9. Morin, R.D. *et al.* Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* **476**, 298-303 (2011).
10. Bea, S. *et al.* Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18250-5 (2013).
11. Roos-Weil, D. *et al.* A Recurrent Activating Missense Mutation in Waldenstrom Macroglobulinemia Affects the DNA Binding of the ETS Transcription Factor SPI1 and Enhances Proliferation. *Cancer Discov* **9**, 796-811 (2019).
12. Wang, J.H. *et al.* Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity* **9**, 543-53 (1998).
13. Hu, Y. *et al.* Superenhancer reprogramming drives a B-cell-epithelial transition and high-risk leukemia. *Genes Dev* **30**, 1971-90 (2016).
14. Georgopoulos, K. *et al.* The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* **79**, 143-56 (1994).
15. Molnar, A. & Georgopoulos, K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **14**, 8292-303 (1994).
16. 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).
17. Yin, S. *et al.* A Murine Model of Chronic Lymphocytic Leukemia Based on B Cell-Restricted Expression of Sf3b1 Mutation and Atm Deletion. *Cancer Cell* **35**, 283-296 e5 (2019).
18. Yoshimi, A. *et al.* Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature* **574**, 273-277 (2019).
19. Taylor, J. *et al.* Altered Nuclear Export Signal Recognition as a Driver of Oncogenesis. *Cancer Discov* **9**, 1452-1467 (2019).
20. Bichi, R. *et al.* Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6955-60 (2002).

21. Chaudhuri, J. & Alt, F.W. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* **4**, 541-52 (2004).
22. Cariappa, A. *et al.* The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* **14**, 603-15 (2001).
23. Cancro, M.P. *et al.* xid mice reveal the interplay of homeostasis and Bruton's tyrosine kinase-mediated selection at multiple stages of B cell development. *Int Immunol* **13**, 1501-14 (2001).
24. Li, S. *et al.* Cistrome-GO: a web server for functional enrichment analysis of transcription factor ChIP-seq peaks. *Nucleic Acids Res* **47**, W206-W211 (2019).
25. Li, X. *et al.* Aiolos promotes anchorage independence by silencing p66Shc transcription in cancer cells. *Cancer Cell* **25**, 575-89 (2014).
26. 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).
27. Ferreira, P.G. *et al.* Transcriptome characterization by RNA sequencing identifies a major molecular and clinical subdivision in chronic lymphocytic leukemia. *Genome Res* **24**, 212-26 (2014).
28. Zanasi, N. *et al.* A Sleeping Beauty screen reveals NF- κ B activation in CLL mouse model. *Blood* **121**, 4355-8 (2013).
29. Touma, M. *et al.* Impaired B cell development and function in the absence of IkappaBNS. *J Immunol* **187**, 3942-52 (2011).
30. Meijers, R.W.J. *et al.* Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia cells to B-cell receptor stimulation is associated with low expression of regulatory molecules of the nuclear factor-kappaB pathway. *Haematologica* **105**, 182-192 (2020).
31. Alizadeh, A.A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-11 (2000).
32. Salaverria, I. *et al.* Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood* **118**, 139-47 (2011).
33. Aldinucci, D. *et al.* IRF4 is modulated by CD40L and by apoptotic and anti-proliferative signals in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* **148**, 115-8 (2010).
34. Shaffer, A.L. *et al.* IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* **454**, 226-31 (2008).
35. Klein, U. *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* **7**, 773-82 (2006).
36. Mohle, R., Failenschmid, C., Bautz, F. & Kanz, L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* **13**, 1954-9 (1999).
37. Chen, S.S. *et al.* BTK inhibition results in impaired CXCR4 chemokine receptor surface expression, signaling and function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **30**, 833-43 (2016).
38. Vaisitti, T. *et al.* CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **24**, 958-69 (2010).
39. Duhamel, M., Arrouss, I., Merle-Beral, H. & Rebollo, A. The Aiolos transcription factor is up-regulated in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **111**, 3225-8 (2008).
40. Billot, K. *et al.* Dereglulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic modifications. *Blood* **117**, 1917-27 (2011).
41. Nuckel, H. *et al.* The IKZF3 (Aiolos) transcription factor is highly upregulated and inversely correlated with clinical progression in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **144**, 268-70 (2009).

42. Obeng, E.A. *et al.* Physiologic Expression of Sf3b1(K700E) Causes Impaired Erythropoiesis, Aberrant Splicing, and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation. *Cancer Cell* **30**, 404-17 (2016).
43. Robins, H.S. *et al.* Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood* **114**, 4099-107 (2009).
44. Carlson, C.S. *et al.* Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. *Nat Commun* **4**, 2680 (2013).
45. McLean, C.Y. *et al.* GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* **28**, 495-501 (2010).

Discussion

Les études fonctionnelles pour comprendre le rôle des mutations identifiées dans la LLC ne sont pas faciles à mettre en œuvre car les lignées cellulaires sont peu nombreuses et l'étude d'une mutation spécifique dans ces modèles est complexe en raison de l'accumulation importante d'autres altérations génétiques. D'autre part, lorsque les mutations sont peu fréquentes dans la population, les études à partir de cellules primaires sont limitées en raison de difficultés d'accès au matériel biologique. Et, lorsque le matériel est disponible, l'hétérogénéité génétique entre les patients rend l'interprétation des études fonctionnelles complexe. C'est le cas de la mutation *IKZF3*-L162R qui est présente chez seulement 3% des patients atteints de LLC et qui est toujours retrouvée associée à d'autres mutations.

Dans cette étude, nous avons généré un modèle murin d'expression conditionnelle de la mutation dans le lignage B ce qui présente l'avantage de pouvoir étudier la fonction de la mutation dans des conditions physiologiques et dans un modèle cellulaire isogénique (la mutation étant présente dans les cellules B sans autres anomalies génétiques associées). L'autre avantage de ce modèle est l'accès aisé aux cellules B mutantes pour réaliser des études fonctionnelles en ayant une contrepartie physiologique B *Ikzf3* non muté à titre de comparaison. Cependant, le modèle murin constitue la principale limite à l'étude car tous les mécanismes biologiques ne sont pas superposables chez l'Homme et la souris. Toutefois, les protéines de la famille IKAROS ont été largement étudiées dans des modèles murins en raison de la très forte conservation des protéines chez les mammifères. Par ailleurs, le développement B et le déroulement de la réponse immunitaire B est globalement similaire entre l'Homme et la souris. Le rôle d'AIOLOS avait initialement été mis en évidence dans un modèle de souris déficient en AIOLOS (-/-) qui a été très utile pour comprendre l'implication d'AIOLOS dans le développement B²¹⁶. Dans cette étude, les souris déficientes en AIOLOS montraient une déplétion en cellules B matures dans le sang et la rate et une accumulation de précurseurs B dans la moelle osseuse. Les cellules B AIOLOS^{-/-} étaient également dans un état hyperactivé et montraient un taux de prolifération plus important *in vitro*. Le rôle suppresseur de tumeur d'AIOLOS avait été suggéré dans cette étude car les souris AIOLOS^{-/-} développaient des lymphomes B. L'utilisation d'un modèle murin pour étudier AIOLOS est également possible car sur le plan structurel, les protéines humaines et murines présentent une homologie supérieure à 90%, avec une conservation très importante du domaine de liaison à

l'ADN dans lequel se trouve la mutation. Par conséquent, malgré la limite du modèle murin, il semble acceptable d'étudier la mutation *IKZF3*-162R chez la souris.

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois le rôle oncogénique de la mutation *Ikzf3* dans le développement de la LLC. Des souris mutantes ont développé entre 15 et 21 mois une lymphoprolifération B220+CD5+ clonale avec une pénétrance d'environ 35% et des caractéristiques génétiques et cliniques proches de la maladie humaine. Par conséquent, cela en fait un modèle de LLC génétiquement fidèle comme il en existe peu actuellement. En effet, dans notre modèle, le développement de la maladie est basé sur une anomalie génétique identifiée chez l'homme, ce qui n'est pas le cas de beaucoup d'autres modèles murins de LLC, tel que le modèle E μ -TCL1 qui repose sur la surexpression du transgène humain *TCL1* et induit le développement de proliférations « *LLC-like* » agressives²⁵¹. D'autre part, chez les souris *Ikzf3* mutantes, la maladie se développe chez des souris âgées et montre auparavant une évolution indolente, de façon similaire à la LLC chez l'homme. Même si les adénopathies sont inconstantes, l'infiltration splénique est systématique. Toutefois, la faible infiltration médullaire observée est inhabituelle. Dans le modèle E μ -TCL1, à l'inverse, la maladie est détectable très tôt dès 9 mois et entraîne une forme très agressive de LLC ce qui n'est pas le cas de la maladie humaine. Enfin, les souris *Ikzf3* mutantes reproduisent le spectre des lymphoproliférations retrouvées chez l'homme puisque quelques souris ont également développé des lymphomes de haut grade. La mutation *IKZF3*-L162R a également été identifiée chez des patients atteints de lymphomes B à grandes cellules et de lymphomes à cellules du manteau, ce qui suggère un mécanisme commun de lymphomagenèse. Dans ces deux pathologies, la voie du BCR est dérégulée et joue un rôle critique dans la physiopathologie, tout comme dans la LLC. Dans la première partie de notre étude, nous avons montré un lien entre la mutation et la surexpression des gènes de la voie du BCR.

Un tel modèle de LLC offre la possibilité de réaliser des études pour comprendre les mécanismes d'évolution clonale de la maladie. Grâce à l'expression de la mutation dans l'ensemble du lignage B, il est possible de comparer des cellules de LLC et des cellules B toutes deux porteuses de la mutation et issues de la même souris, ce qui n'est jamais le cas chez l'homme puisque la mutation n'est présente que dans la fraction tumorale. Les cellules B mutantes constituent un modèle de cellules pré-leucémiques et permettent de comprendre les mécanismes génétiques dérégulés avant le développement de la maladie.

Dans notre travail, grâce aux études transcriptomiques et de ChIP-seq réalisées à partir de cellules B de souris jeunes (non leucémiques) avec ou sans mutation d'*Ikzf3*, nous avons été en mesure de montrer que la mutation induit des changements subtils dans la reconnaissance du motif ce qui entraîne de nouveaux sites de liaison au niveau de promoteurs pour modifier son programme transcriptionnel et activer l'expression de gènes cibles spécifiques tels que *Nfkbid*, *Tagap* ou *Jun*. La mutation induit notamment des perturbations dans l'expression de gènes codant pour la voie de signalisation du BCR, une voie qui joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la LLC, ce qui constitue potentiellement une modification préalable nécessaire au développement de la maladie. Les études fonctionnelles *in vitro* ont confirmé que les cellules B mutantes ont une meilleure réponse à la stimulation du BCR.

Chez des souris âgées leucémiques, la comparaison du transcriptome entre les cellules de LLC et les cellules B issues du même animal permet de comprendre l'évolution du programme d'expression génique entre le stade pré-leucémique et le stade tumoral. Nous avons montré que les cellules de LLC avaient un programme d'expression spécifique distinct des cellules B *Ikzf3* muté, et qu'elles surexprimaient des gènes de la voie du BCR et de la voie NF- κ B. Ceci montre qu'il existe une évolution du programme génique avec l'âge et une intensification de l'expression de gènes déjà surexprimés au stade pré-leucémique (*Myc*, *Il10*, *Egr1*, *Nfkbid*) qui jouent probablement un rôle majeur dans le développement de la maladie.

On peut émettre l'hypothèse que ce changement d'expression des gènes est lié à l'acquisition d'anomalies génétiques supplémentaires dont la combinaison synergique avec la mutation d'*Ikzf3* aboutit au développement de la maladie. Plusieurs arguments renforcent cette hypothèse. La LLC est une maladie très hétérogène sur le plan génétique et certaines mutations sont fréquemment associées. Dans l'étude *whole exome sequencing* menée par l'équipe de Catherine Wu¹⁸², tous les patients porteurs de la mutation *IKZF3*-L162R avaient au moins une autre anomalie génétique associée, sans qu'une association préférentielle n'ait néanmoins été retrouvée. D'autre part, une étude récente a montré que l'expression restreinte de la mutation *Sf3b1*-K700E ou de la délétion du gène *Atm* dans le lignage B chez des souris n'entraînaient pas de prolifération clonale de type LLC²⁰⁵. Ces deux anomalies génétiques sont fréquemment associées entre elles dans la LLC chez l'Homme. En revanche, lorsque ces souris étaient croisées pour générer des souris double-mutantes *Sf3b1*-K700E x *Atm*^{-/-}, une

prolifération B CD5+ clonale était alors détectable chez quelques souris, ce qui suggère que la combinaison de ces deux évènements est productive et nécessaire pour induire une lymphoprolifération. Enfin, le séquençage NGS réalisé à différents stades de la maladie chez un même patient a permis de reconstruire la phylogénie de la maladie et d'identifier des lésions génétiques fondatrices, correspondant aux mutations clonales (telles que la trisomie 12 ou la délétion 13q) présentes précocément et initiant le cancer, et des mutations secondaires acquises secondairement, sous-clonales. Dans notre modèle murin, même si des évènements secondaires ont été acquis au cours de l'évolution, la mutation d'*Ikzf3* reste le dénominateur commun à toutes les LLC ce qui suggère une acquisition précoce de la mutation et un rôle prédominant de la mutation dans l'initiation de la maladie. Dans notre modèle murin, pour étudier l'évolution clonale et voir si des anomalies génétiques supplémentaires ont été acquises, l'ADN de cellules tumorales et de cellules B triées a été extrait pour être séquençé par *whole genome sequencing*. Le séquençage est actuellement en cours.

Ce modèle murin sera particulièrement utile pour tester *in vivo* l'efficacité des thérapies utilisées dans la LLC ou celle de nouveaux traitements en cours d'étude. Grâce à la facilité de greffe des cellules tumorales, il est possible de générer en quelques semaines de nouvelles souris leucémiques qui seront traitées avec des drogues pour évaluer la décroissance du clone tumoral ou la résistance au traitement. Il sera particulièrement intéressant d'évaluer l'efficacité de l'Ibrutinib, inhibiteur de BTK et de la voie de signalisation du BCR, sur les cellules leucémiques *Ikzf3* mutées. En effet, notre étude a montré que la mutation était associée à une activation plus importante la voie du BCR, ce qui soulève la question de l'efficacité de l'Ibrutinib en présence de la mutation d'*Ikzf3*. La suite de notre travail consistera donc à étudier l'effet de diverses thérapeutiques dans notre modèle murin, et à vérifier si ces données sont transposables chez les patients porteurs de la mutation.

Manuscrit n°2: *TP53* mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes

Introduction et principaux résultats

L'évolution de la LLC est très hétérogène aussi bien sur le plan de l'évolution clinique que de la réponse au traitement. Cette hétérogénéité est liée en partie à la complexité génétique caractéristique de la LLC, incluant notamment les anomalies du gène *TP53*. De nombreuses études cliniques ont été menées depuis l'identification des anomalies de *TP53* dans la LLC et s'accordent toutes à dire que ces altérations sont associées à un pronostic péjoratif et qu'elles prédisent la résistance aux traitements à base de fludarabine, ce qui fait de cette anomalie l'un des plus forts marqueurs pronostics et prédictifs guidant la décision thérapeutique^{175,191,260,261}.

Ces anomalies comprennent la délétion du locus *TP53* sur le chromosome 17 (17p13.1) détectable par technique de FISH, et les mutations du gènes *TP53* détectables par séquençage, incluant des mutations faux-sens, des insertions-délétions, des mutations non-sens et des mutations au niveau de sites d'épissage. Les mutations géniques sont regroupées principalement au niveau du domaine de liaison à l'ADN au niveau des exons 4 à 8 mais des mutations sont également possibles dans les domaines d'oligo-dimérisation et le domaine C-terminal²⁶². Les patients porteurs d'anomalies de *TP53* peuvent avoir soit une mutation isolée du gène *TP53*, soit une délétion isolée du chromosome 17p [del(17p)], soit l'association des deux¹⁹².

Ces anomalies sont présentes soit à l'état clonal (altération présente dans la majorité des cellules tumorales, soit à l'état sous-clonal lorsque seul quelques clones sont mutés). D'autres part, elles sont dynamiques évoluent au cours du temps, certains clones subissant une expansion sous l'influence de certains facteurs. Pour rappel, les échantillons tumoraux de LLC sont génétiquement hétérogènes et contiennent des populations clonales et sous-clonales définies par les mutations qu'elles portent. Au sein de la tumeur, ces populations co-existent en équilibre ou peuvent subir une évolution, avec certains sous-clones émergeant pour devenir dominants. Alors que la plupart des patients non traités conservent globalement un équilibre clonal stable, une intervention thérapeutique peut modifier l'architecture en faveur d'un ou

plusieurs sous-clones résistants et induire une évolution clonale. Ce phénomène d'évolution clonale est une caractéristique clé de la progression et de la rechute des cancers, les tumeurs évoluant vraisemblablement par compétition et interaction entre clones génétiquement divers. Dans la LLC, les anomalies de *TP53* obéissent à ces règles. L'évolution des clones mutés est favorisée par les chimiothérapies à base d'analogues des purines, comme en témoigne la fréquence de ces anomalies d'environ 10% chez les patients non traités, fréquence qui augmente à 40-50% chez les patients ayant reçu un traitement à base de fludarabine^{175,191,263}.

Le développement récent du séquençage à haut-débit NGS (*Next Generation Sequencing*) a bouleversé le domaine de la génétique moléculaire en permettant la détection de mutations avec une sensibilité très supérieure à celle du séquençage traditionnel de type Sanger. Lorsque cette étude a été initiée au laboratoire d'hématologie de l'Hôpital Avicenne, le séquençage du gène *TP53* venait d'être mis en place par NGS sur la plateforme de séquençage PGM Ion Torrent, permettant ainsi la détection de mutations de l'ordre de 1% alors que le seuil de détection est de 15% pour le Sanger. La détection de sous-clones minoritaires *TP53* mutés est pourtant pertinente car leur présence a la même signification pronostique et thérapeutique que les clones majoritaires²⁶⁴.

A côté de ces anomalies, la présence d'un caryotype complexe (présence d'au moins 3 anomalies chromosomiques) établi à partir de techniques de cytogénétique conventionnelle sur lymphocytes de LLC stimulés a récemment été associée à une évolution de la maladie plus péjorative. Des études ont également montré une association forte entre la présence d'un caryotype complexe et les anomalies de *TP53*.

Dans cette étude longitudinale, nous avons étudié l'évolution des anomalies de *TP53* dans une cohorte rétrospective de 31 patients à haut risque d'évolution (réfractaires au traitement ou en rechute, R/R). Pour ces patients nous disposons de prélèvements d'ADN congelés pré- et post-traitement pour lesquels nous avons pu re-séquencer le gène *TP53* par technique de séquençage NGS et Sanger. Les échantillons ont été analysés en parallèle dans un laboratoire allemand référent (Université de Ulm, Pr Stilgenbauer) utilisant une plateforme de séquençage reposant sur une technologie différente (Séquenceur Illumina Miseq) afin de valider les résultats. Nous avons également recueilli les données de cytogénétiques

disponibles réalisées avant et après traitement pour connaître le statut de la del(17p) et les données du caryotype

L'objectif de cette étude étaient donc 1) d'étudier l'évolution clonale des anomalies de *TP53* incluant les mutations et les délétions de *TP53*, définie comme l'apparition d'une mutation/délétion de *TP53* ou l'apparition de mutations additionnelles de *TP53* sur des prélèvements séquentiels, 2) de comparer la chronologie d'apparition d'un caryotype complexe par rapport aux anomalies de *TP53* et 3) d'étudier l'apport d'une technologie de séquençage NGS sensible dans la détection de ces anomalies par rapport au séquençage traditionnel Sanger.

Dans la première partie du travail, nous avons montré qu'environ 30% (10 /31) de ces patients à haut risque d'évolution (R/R) étaient porteurs d'une anomalie de *TP53* au diagnostic. Tous les patients présentant un del(17p) avaient systématiquement une mutation de l'autre allèle (7 patients) et 3 patients avaient une mutation isolée du gène. Concernant les données du caryotype, la moitié des patients avec anomalies de *TP53* avait un caryotype complexe au diagnostic, alors que seulement 15% des patients sans anomalies de *TP53* avaient un caryotype complexe.

Au moment de la progression, 45% des patients présentaient une évolution clonale des mutations/délétions de *TP53* ou du caryotype et cette évolution était plus importante chez les patients qui avaient une anomalie de *TP53* initialement. L'acquisition d'un caryotype complexe était également plus importante chez les patients qui avaient une anomalie de *TP53* au diagnostic. Seul un patient sans anomalie de *TP53* n'a pas acquis d'anomalies au cours de l'évolution de sa maladie en dehors d'un caryotype complexe. Par ailleurs, l'étude longitudinale a permis de montrer que dans la majorité des cas, l'acquisition d'une anomalie de *TP53* précédait l'apparition d'un caryotype complexe.

L'évolution clonale était également plus importante chez les patients porteurs d'une anomalie de *TP53* traités par analogue de purines (70% d'entre eux ont évolué) alors qu'elle n'était que de 30% chez les patients sans anomalies de *TP53*. Lorsqu'un sous-clone muté était détectable au diagnostic, dans presque la majorité des cas il était retrouvé à la rechute et avait augmenté en taille.

Concernant les aspects techniques de cette étude, toutes les mutations détectées en Sanger ont été confirmées en NGS. Cependant, la technologie NGS a permis de détecter des mutations chez 3 patients qui n'avaient pas été détectée en Sanger. Les VAF (*variant allele frequency*) de ces 3 mutations allaient de 3,5 à 20%, ce qui montre que le séquençage NGS est capable d'identifier des sous-clones non détectés en Sanger. La comparaison entre les deux plateformes de séquençage PGM et Illumina était également très bonne en dehors d'une anomalie non détectée en PGM (due au *design* des amorces qui ne couvraient pas un site de *splicing*) et une anomalie n'était pas retrouvée en Illumina (délétion de 5pb filtrée par l'algorithme du logiciel d'annotation).

Short Report

TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes

Gregory Lazarian^{1,2,3}, Eugen Tausch⁶, Virginie Eclache^{1,3}, Amel Sebaa³, Vincent Bianchi³, Remi Letestu^{1,2,3}, Jean-Francois Collon³, Valerie Lefebvre³, Laura Gardano^{1,2}, Nadine Varin-Blank^{1,2}, Thierry Soussi^{5,6}, Stephen Stilgenbauer⁴, Florence Cymbalista^{1,2,3} and Fanny Baran-Marszak^{1,2,3}

¹U978 Institut National De La Santé Et De La Recherche Médicale, Bobigny, France

²Labex Inflamex, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France

³Hôpital Avicenne, Assistance Publique—Hôpitaux De Paris, Bobigny, Service D'Hématologie Biologique, France

⁴Department of Internal Medicine III, Ulm University, Ulm, Germany

⁵Department of Oncology-Pathology, Karolinska Institutet, Cancer Center Karolinska (CCK) RB:04, Stockholm SE-171 76, Sweden; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, F-75009, France

⁶INSERM, U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France and Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

TP53 abnormalities lead to resistance to purine analogues and are found in over 40% of patients with refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL). At diagnosis, no more than 5% of patients carry the 17p deletion, most cases harbour mutations within the other TP53 allele. The incidence of a TP53 mutation as the only alteration is approximately 5%, but this depends on the sensitivity of the technique. Recently, having a complex karyotype has been considered a strong adverse prognostic factor. However, there are no longitudinal studies simultaneously examining the presence of the 17p deletion, TP53 mutations and karyotype abnormalities. We conducted a retrospective longitudinal study of 31 relapsed/refractory CLL patients. Two to six blood samples per patient were analyzed, with a median follow-up of 8 years. In this report, we assessed the sequence of events of TP53 clonal evolution and correlated the presence of TP53 abnormalities to genetic instability during progression and treatment. Next-generation sequencing allowed the early detection of TP53 mutated clones and was able to be performed on a routine basis, demonstrating an excellent correlation between the Illumina and Ion Torrent technologies. We concluded that TP53 mutations are early events and precede clonal evolution to complex karyotypes. We strongly recommend the early and iterated detection of TP53 mutations in progressive cases.

TP53 mutations and 17p deletion are associated with a poor prognosis in CLL.^{1–4} TP53 alterations are observed in approximately 10% of treatment-naïve CLL patients, but in up to

40–50% of fludarabine-refractory CLL patients.⁵ TP53 mutations are detected in over 80% of cases with 17p deletions,^{1,4} but TP53 mutations are also observed in a significant proportion of CLL with no 17p deletion with similar adverse outcomes.¹ Small subclones with TP53 mutations, detected only by sensitive techniques, are associated with the same adverse prognosis as large clones.⁶ As new targeted therapies are changing the treatment landscape,⁷ it becomes increasingly important to detect TP53 abnormalities in a sensitive manner. However, use of next-generation sequencing (NGS) in clinical practice is not yet established.⁸

Moreover, complex karyotypes (≥ 3 abnormalities) have recently been noted as having a major prognostic impact,^{1,9} but the sequential occurrence of TP53 abnormalities and complex karyotypes has not been addressed in a longitudinal study so far.

In this report, we assessed the sequence of events of clonal evolution through a longitudinal study and correlated the presence of TP53 abnormalities to genetic instability during progression and treatment.

Key words: CLL, TP53, clonal evolution

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

F.C. and F.B.M. are co-senior authors.

Authors have no conflict of interest to declare.

DOI: 10.1002/ijc.30222

History: Received 21 Apr 2016; Accepted 25 May 2016; Online 7 June 2016

Correspondence to: Fanny Baran-Marszak, Service d'hématologie biologique, Hôpital Avicenne, 125 route de Stalingrad, 93000 Bobigny, France, Tel: 33 (0)1 48 95 56 46, Fax: 33 (0)1 48 95 56 48, E-mail: fanny.baran-marszak@aphp.fr or Florence Cymbalista, Service d'hématologie biologique, Hôpital Avicenne, 125 route de Stalingrad, 93000 Bobigny, France, Tel: 33 (0)1 48 95 56 46, Fax: 33 (0)1 48 95 56 48, E-mail: florence.cymbalista@aphp.fr

What's new?

For patients with chronic lymphocytic leukemia, possessing multiple chromosomal abnormalities means bad news. Could there be a way to predict genomic instability before it happens? These authors investigated whether mutations in *TP53* might pre-empt the onset of chromosomal abnormalities. They conducted a longitudinal study, in which they followed 31 CLL patients over a period of several years. It turned out that mutations in *TP53* occur early and precede the genomic instability that generates chromosomal abnormalities and hinders recovery. Thus, searching for *TP53* mutations could identify those patients likely to develop additional chromosomal defects and poor outcomes.

Material and Methods

We conducted a longitudinal retrospective study in a high-risk cohort of 31 relapsed/refractory patients (Supporting Information Table 1). Two to six blood samples per patient (Median 3) were analyzed, with a median follow-up of 8 years (2.3–22.5 years).

For conventional cytogenetic analysis and fluorescence *in situ* hybridization, blood samples were incubated in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum at 37°C for 48 to 96 h and stimulated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) or CpG-oligonucleotides and interleukin 2. Cells were prepared using routine cytogenetic techniques. Chromosomes were identified by R-banding. Cytogenetic abnormalities were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature.

FISH was performed using *TP53* probe associated with alpha-satellite from chromosome 17 as control (Cytocell, Cambridge). Metaphases and at least 200 interphase nuclei were analyzed. The cutoff level for the diagnosis of del(17p) was 10.2%.^{10,11} Cell images were acquired with microscope Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss, GmbH, Jena) and analyzed by CytoVision image analysis system ISIS (Metasystems). An abnormality was considered clonal when at least two metaphases had the same aberration in case of a structural abnormality or an extra chromosome. For classification as a monosomy, the monosomy had to be present in at least three metaphases.

TP53 mutations were screened on DNA using Sanger (Exons 4–9) (3500 Dx Series Genetic Analyzer ThermoFisher, Saint Aubin, France)¹² and NGS of the entire coding region of *TP53* (Ion AmpliSeq™ *TP53* Panel ThermoFisher). The results were validated on two different platforms: Ion PGM system (ThermoFisher) and Miseq (Illumina GmbH Munich, Germany). The results were validated when >90% amplicons showed at least 100 reads, 100% target base coverage were over 20x and a minimum of 11 reads supported the variant. *TP53* variants were analyzed using the IARC (www-p53.iarc.fr) and the UMD *TP53* mutation databases (p53.free.fr). Each *TP53* variant was validated by *TP53_MUT_ASSESSOR*, a multikriteria algorithm specifically developed for the analysis of *TP53* mutation and based on the 2015 issue of the UMD *TP53* database containing 60,000 *TP53* mutations.¹³

Results and Discussion

Among the relapsed/refractory cohort, *TP53* was found to be mutated in 16/31 patients. A total of 29 mutations were

detected in Exons 4 to 9; they were not clustered in any known hotspot (Supporting Information Table 2). These mutations were validated as being pathogenic using the *TP53_MUT_Assessor* algorithm; 27 had been previously described in other tumors and were known to correspond to impaired transcriptional activity. The two novel variants (deletions of 8 and 22 nucleotides) were likely pathogenic, as they impaired P53 protein expression.

NGS technology detected small *TP53* mutated clones that were not evidenced by Sanger sequencing (Supporting Information Table 3). All mutations identified using Sanger methodology, were confirmed using NGS Ion Torrent and analyzed according to the European Research Initiative on CLL (ERIC) recommendations.⁸ Illumina and Ion PGM NGS sequencing generated highly similar results with notably an identical percentage of variant allele frequency (VAF). Only one deletion, of 24 bp covering a splice site, was missed by PGM due to the design of the primers which overlapped the deleted bases both in forward and reverse strands. Moreover, a subclonal deletion of 5 bp, only detected using Ion Torrent, and a 8 bp subclonal deletion, only detected using Sanger technology, were discarded by PGM and Illumina variant calling algorithms because of the low quality score of the alignment between two homopolymers.

At the time of diagnosis, *TP53* mutations were detected in 10/31 (32%) patients. Three of these mutations were detected by NGS technology only as allele frequency ranged from 3.5 to 20%.

Deletion of 17p was systematically investigated by FISH and was present in 7/31 (23%) patients. All the patients with 17p deletions carried a mutation on the other allele. This is in concordance with the publication by Landau *et al.*¹⁴ suggesting that *TP53* is an exception among tumor suppressor genes which are essentially haplo-insufficient to begin with. As described by Landau *et al.*¹⁴ we have no evidence that del(17p) alone could be detrimental as we did not detect any in our series. Three additional cases harbored only mutations; two of which had more than one mutation. Eight patients harbored a complex karyotype at diagnosis, for five patients it was associated with *TP53* abnormalities.

During progression, a clonal evolution with either *TP53* alterations or the development of a complex karyotype was observed in 14/31 (45%) patients. Among patients who had *TP53* abnormalities at diagnosis, the acquisition of further *TP53* subclonal alterations was very frequent, that is, 5/10 (3 novel *TP53* mutations, one

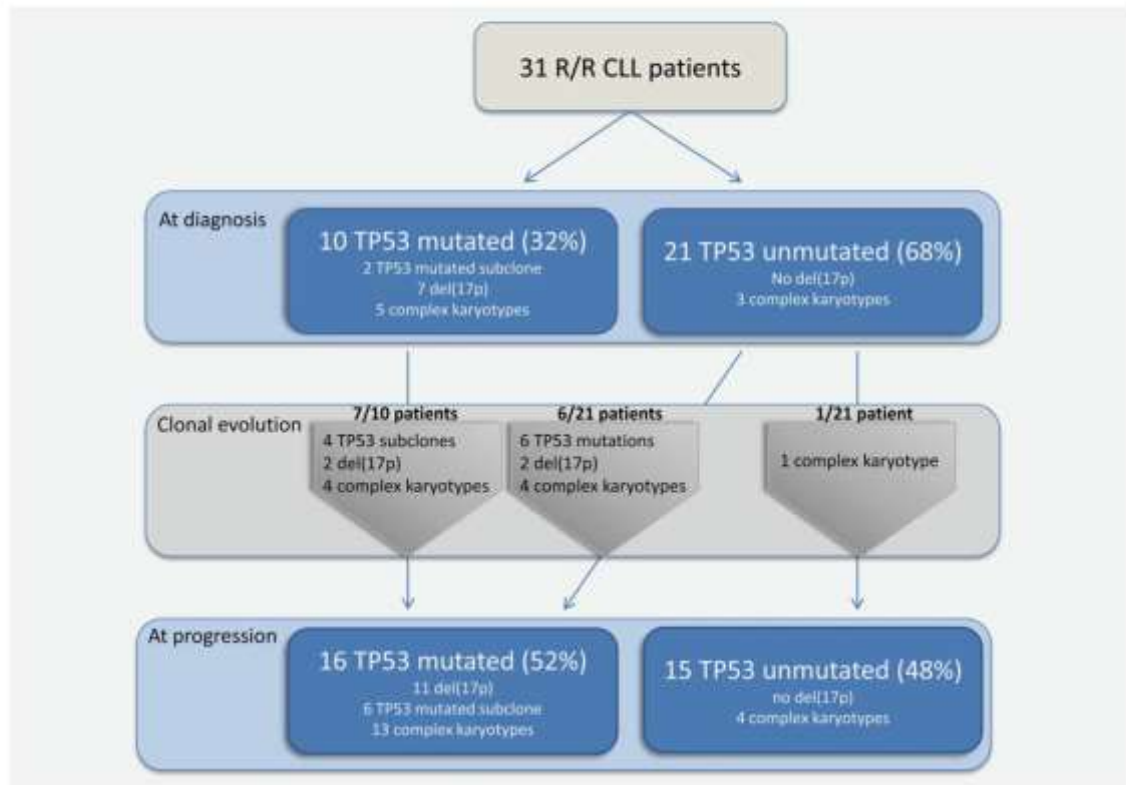


Figure 1. *TP53* abnormalities and karyotype evolution of the relapse/refractory (R/R) CLL patients. This chart shows the evolution of *TP53* abnormalities (mutation and 17p deletion) and complex karyotypes (≥ 3 abnormalities) from diagnosis to progression in our relapse/refractory cohort. Clonal evolutions include either additional *TP53* sub-clonal mutations or 17p deletion and the evolution of the karyotype to a complex karyotype. [Color Figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

17p deletion, and one with both a *TP53* mutated subclone and 17p deletion), in agreement with what previously described.¹⁵ A complex karyotype emerged in four cases. In 6/21 (28%) patients without *TP53* alterations at diagnosis, a *TP53* alteration was found during progression; two of these patients also acquired a 17p deletion, and four acquired a complex karyotype. Of note, only one patient with no *TP53* mutation acquired a complex karyotype (Fig. 1).

In this high-risk cohort, unfavorable prognostic factors such as unmutated IGHV, mutations of *SF3B1* and *NOTCH1*, or the presence of an 11q deletion (Supporting Information Table 1) had a similar incidence whether *TP53* abnormalities were present or not. Conversely, the incidence of complex karyotypes was strikingly different in both groups. During progression, eight patients carrying *TP53* mutations acquired a complex karyotype, as compared to only one in the group without *TP53* alterations ($p = 0.011$). Interestingly, in 5/8 cases, the longitudinal analysis indicated that the acquisition of *TP53* mutations clearly preceded karyotype evolution (Fig. 2). Altogether, a complex karyotype was observed in 13/16 patients with *TP53* mutations, whereas it was present in 4/15

patients without *TP53* mutations ($p = 0.0038$). This observation highlights the genetic instability related to the presence of a *TP53* mutation, and its likely role in the development of a complex karyotype.¹⁶

It is widely accepted that chemotherapy plays a key role in driving the selection of clones carrying *TP53* mutations.¹⁷ In our cohort, after treatment, 6/21 patients with no *TP53* alteration at diagnosis acquired one and 7/10 patients with *TP53* mutations from diagnosis acquired at least one additional subclone. This significant association between *TP53* abnormalities and clonal progression after chemotherapy ($p = 0.045$) is in line with the impact of purine analogues. However, three patients acquired a *TP53* mutation before any treatment (UPN 4, 6 and 11, Fig. 2). This suggests that *TP53* mutations detected after therapy are selected rather than directly induced by therapeutic agents, which is in agreement with the scenario proposed by Malcikova *et al.*¹⁷ Moreover, UPN 4 carrying both a del(17p) and *TP53* mutation at diagnosis remained stable and untreated over a period of 13 years. It is noteworthy that this patient had mutated IGHV genes. This is in agreement with Delgado *et al.*¹⁸ showing

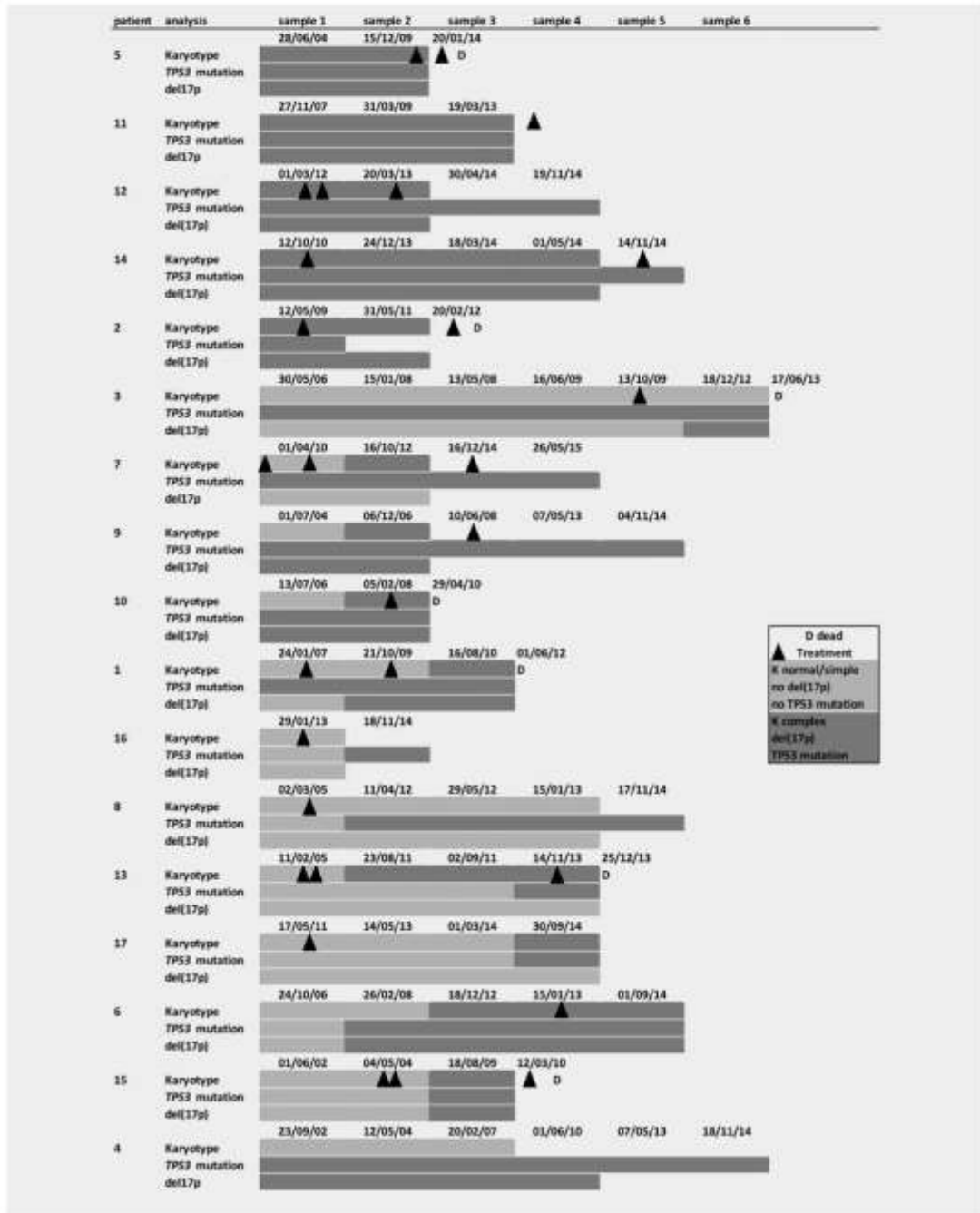


Figure 2. Longitudinal analysis of TP53 mutations, 17p deletions and karyotypes. Follow-up of the 16 patients with TP53 mutations was conducted at any time in their disease. Two to six blood samples per patient (Median 3) were analyzed, with a median follow-up of 8 years (2.3–22). Dark grey bars indicate the presence of TP53 mutations, 17p deletion, or a complex karyotype. Light grey bars represent the absence of TP53 mutations, the absence of 17p deletion, or a normal or simple karyotype. Triangles represent lines of treatment and D represents the date of death. Patient 4, who remains untreated and is not included in this R/R cohort, was added to the chart as an example of the acquisition of subclonal mutations independent of any treatment.

that absence of IGHV mutations is a key predictor of poor outcome of CLL patients with TP53 disruption.

Each patient received 1 to 3 treatment lines. Both, time to first treatment (TFT) and overall survival were identical for the group with or without TP53 abnormalities (mean TFT 4.4 and 3.9 years, respectively). Sixteen patients received fludarabine as a first-line treatment. In three cases with isolated TP53 mutations at diagnosis, the TP53 mutated clone expanded at relapse (Patients 1, 3, 7). In four other patients, TP53 alterations were only detectable after fludarabine treatment (Patient 8, 13, 15, 17). Eight patients known to have mutated TP53 before treatment received Campath-Dexamethasone; in five of them tested at relapse, the TP53 mutation clone had expanded. Four patients with TP53 mutations received ibrutinib as a second or third treatment (Patients 7, 12, 14, 16). After one year on ibrutinib, the percentage of VAF in the residual lymphocytosis was stable. These patients are now in clinical remission reflecting the efficacy of ibrutinib on the mutated clones. However, the persistence of the mutated clones shows the failure of eradicating the disease.

References

- Dicker F, Herholz H, Schnittger S, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009;23:117–24.
- Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011;29:2223–8.
- Rossi D, Cerri M, Dianzani U, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del(17p13): implications for overall survival and chemorefractiveness. *Clin Cancer Res* 2009;15:995–1004.
- Zenz T, Krober A, Scherer K, 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* 2008;112:3322–9.
- Zenz T, Habe S, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009;114:2589–97.
- Rossi D, Khatibian H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014;123:2139–47.
- Woyach JA, Johnson AL. Targeted therapies in CLL: mechanisms of resistance and strategies for management. *Blood* 2015;126:471–7.
- Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26:1458–61.
- Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, Ferrajoli A, Svingo F, Smith SC, Burger JA, Estrov Z, Jain N, Kantarjian HM, Keating MJ. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer* 2015;121:3612–21.
- El-Tawel M, Barin C, Cymbalista F, et al. Detection of chromosomal abnormalities associated with chronic lymphocytic leukemia: what is the best method? *Cancer Genet Cytogenet* 2009;195:37–42.
- Rigóin GM, del Giudice I, Formigaro L, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer* 2015;54:818–26.
- Sebaa A, Ades L, Baran-Marzack F, et al. Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:1086–92.
- Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat* 2014;35:672–88.
- Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015;526:525–30.
- Nadeu F, Delgado J, Royo C, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1 and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016;127:3122–30.
- Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, et al. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet* 2013;45:1127–33.
- Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015;29:877–85.
- Delgado J, Salaverria I, Baumann T, et al. Genomic complexity and IGHV mutational status are key predictors of outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 disruption. *Haematologica* 2014;99:e231–4.

Supplemental Table 1: Characteristics of the whole CLL cohort

Characteristics	All (n=31)		No TP53 abnormalities (n=15)		With TP53 abnormalities (n=16)	
	n	%	n	%	n	%
Age at diagnosis						
Median	59		59		59	
Range	33-76		41-76		33-75	
Sex ratio	2		1,5		4,3	
Treatment line (median)	2		3		2	
Median follow up (years)	8,1 [2,3-22,5]		7,9 [4,8-22,5]		8,2 [2,3-22]	
Dead	17	55	10	66	7	43*
IGHV mutation						
Unmutated (?98%)	24	77	12	80	12	75*
Stereotyped VH CDR3	6/29	20	3	20	3/14	21*
VH3-21	3	9	3	20	0	0*
CD38 positive	18/29	62	10	67	8/14	57*
Cytogenetics						
del (17p)	11	35	0	0	11/16	69
+12	7/26	27	4	26	3/11	27*
del (11q)	4/26	15	2	13	2/11	18*
del (13q)	15/26	57	7/14	50	8/11	72*
Complex karyotype	17	55	4	26	13	81 (P 0.011)
Mutations						
TP53	16	51	0	0	16	100
NOTCH1	8	25	4	26	4	25*
SF3B1	5	16	1	6	4	25*

Abbreviations: IGHV immunoglobulin heavy-chain variable gene; CDR3 complementary determining region; * p value non significant (>0.05) between cases with and without TP53 abnormalities (Fisher's exact test).

Supplemental Table 2 : TP53 mutant characteristics

cDNA variant (a)	Patient	Protein_variant (b)	frequency	Comment Frequency (d)	Comment Activity (e)	Comment Isoforms (f)	Comment Splicing (g)	Comment_Final
c.743 G>A	12	p.R248Q	1972	This mutation is very frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Pathogenic
c.742C>T	16	p.R248W	1514	This mutation is very frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Pathogenic
c.488A>G	4	p.Y163C	372	This mutation is very frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Pathogenic
c.701A>G	5	p.Y234C	307	This mutation is frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic
c.584T>C	17	p.H195T	255	This mutation is frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic
c.473G>A	15	p.R158H	246	This mutation is frequent	No activity	This mutation targets 9 out of the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic
c.832C>T	8	p.P278S	210	This mutation is frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic
c.838A>G	1	p.R280G	104	This mutation is frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic
c.838A>G	9	p.R280G	104	This mutation is frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic
c.814G>T	4	p.V272L	101	This mutation is frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic
c.763 A>T	10	I255F	81	This mutation is frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic
c.427G>A	11	p.V143M	81	This mutation is frequent	No activity	This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic
c.673-2A>G	5	p.?	59	This mutation is not frequent	Splicing defect: no data on TP53 activity	The consequence of splice mutations on TP53 isoforms expression is unknown	This mutation impairs TP53 splicing	Pathogenic
c.672+1G>T	8	p.?	40	This mutation is not frequent	Splicing defect: no data on TP53 activity	The consequence of splice mutations on TP53 isoforms expression is unknown	This mutation impairs TP53 splicing	Pathogenic
c.920-2A>G	11	p.?	38	This mutation is not frequent	Splicing defect: no data on TP53 activity	The consequence of splice mutations on TP53 isoforms expression is unknown	Splice site mutation	Pathogenic
c.329G>C	3	p.R110P	37	This mutation is not frequent	No activity	This mutation targets 6 out of the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic

Supplemental Table 2 : TP53 mutant characteristics (suite)

Variant	Frequency	Splicing defect: no data on TP53 activity	This mutation is not frequent	Splicing defect: no data on TP53 activity	Splicing defect: no data on TP53 activity	TP53 activity	Mutations on TP53 isoforms	Splice site mutation	Pathogenic
c.673>2A>T	7	p.?	34	This mutation is not frequent	Splicing defect: no data on TP53 activity	TP53 activity	Mutations on TP53 isoforms: The consequence of splice mutations on TP53 isoforms expression is unknown	Splice site mutation	Pathogenic
c.782+1G>A	8	p.?	34	This mutation is not frequent	Splicing defect: no data on TP53 activity	TP53 activity	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets 9 out of the 12 TP53 isoforms	This mutation impairs TP53 splicing	Pathogenic
c.406 C>G	1	p.Q136E	30	This mutation is not frequent	No activity	No activity	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets 6 out of the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Variation of unknown significance
c.154C>T	8	p.Q52*	29	This mutation is not frequent	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets 6 out of the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Pathogenic
c.392A>T	7	p.N131I	25	This mutation is not frequent	No activity	No activity	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets 6 out of the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Variation of unknown significance
c.151 G>T	2	p.E51*	24	This mutation is not frequent	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Pathogenic
c.703A>G	13	N235D	24	This mutation is not frequent	Partial activity	Partial activity	Mutations on TP53 isoforms: The consequence of splice mutations on TP53 isoforms expression is unknown	No splicing defect predicted.	Variation of unknown significance
c.673>2A>C	15	p.?	14	This mutation is rare	Splicing defect: no data on TP53 activity	TP53 activity	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets the 12 TP53 isoforms	Splice site mutation	Pathogenic
c.661delI	14	p.E221S/Is*26	5	This mutation is rare	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Pathogenic
c.626_627 delI	8	p.R209K/Is*38	3	This mutation is rare	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Pathogenic
c.392_396delI	11	p.K132V/Is*15	1	This mutation is rare	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets 6 out of the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Pathogenic
c.368_375+16delI24	6	p.?	0	New mutation	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets the 12 TP53 isoforms	This mutation is localized across an intron exon	Likely pathogenic
c.253_260 delI	8	p.P85S/Is*61	0	New mutations	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	The activity of truncated p53 is assumed to be nil	Mutations on TP53 isoforms: This mutation targets 6 out of the 12 TP53 isoforms	No splicing defect predicted.	Likely pathogenic

a Nomenclature using NM_005465.

b Nomenclature using NP_000537.3

c Number of occurrences of the mutant in the database (among 60,000 mutations)

d Specific information related to the frequency of the mutation in the database

e Specific information related to the residual activity of this TP53 mutant in the database based on the overall transcriptional activity (TA) on 8 different promoters as measured by Kato et al. For each mutant, the median of the 8 promoter-specific activity

No activity: median <=20

Partial activity: median >20 and <=75

Fully active: median >75 and <=140

Hyper active: median >140

No data: this mutant has not been tested

f Number of TP53 isoforms targeted by the mutation

g Indicates whether or not the mutation could impair TP53 splicing.

Supplemental Table 3: Longitudinal study of TP53 mutations by Sanger sequencing, NGS Ion Torrent and Illumina technologies

patient	sample	SANGER		NGS Ion Torrent			NGS Illumina			
		cDNA variant	Protein variant	VAF%	cDNA variant	Protein variant	VAF%	cDNA variant	Protein variant	
1	24/01/2007	c.406 C>G	p.Q136E					45	c.406C>G	p.Q136E
1	21/10/2009	c.406C>G	p.Q136E	38	c.406C>G	p.Q136E				
				4	c.838A>G	p.R280*				
1	16/08/2010	c.406 C>G	p.Q136E					30	c.406C>G	p.Q136E
2	14/09/2009	c.151 G>T	p.E51*					75	c.151 G>T	p.E51*
2	31/05/2011	Negative								
3	30/05/2006	Negative		11	c.329G>C	p.R110P		14	c.329G>C	p.R110P
3	13/10/2009	Negative						1	c.329G>C	p.R110P
3	18/12/2012	c.329G>C	p.R110P					56	c.329G>C	p.R110P
4	17/07/2002	c.488A>G	p.Y163C	7,2	c.814G>T	p.V272L				
				20,8	c.488A>G	p.Y163C				
4	18/11/2004			29	c.488A>G	p.Y163C				
				8	c.814G>T	p.V272L				
4	20/02/2007	c.488A>G	p.Y163C					34	c.488A>G	p.Y163C
4	07/05/2013	c.488A>G	p.Y163C					10	c.814G>T	p.V272L
								24	c.488A>G	p.Y163C
4	18/11/2014	c.488A>G	p.Y163C	12,7	c.814G>T	p.V272L		7	c.814G>T	p.V272L
		c.814G>T	p.V272L	54	c.488A>G	p.Y163C				
5	28/06/2004	Negative						3,5	c.673-2A>G	p?
5	15/12/2009	c.673-2A>G	p.?	20	c.673-2A>G	p?		26	c.673-2A>G	p?
				5	c.701A>G	p.Y234C		9	c.701A>G	p.Y234C
6	24/10/2006	Negative								
6	26/02/2008	Negative						1	c.368_375+16del24	p.?
6	15/01/2013	c.368_375+16del24	p.?					70	c.368_375+16del24	p.?
6	30/09/2014	c.368_375+16del24	p.?							
7	19/04/2010	Negative		20	c.392A>T	p.N131I				
7	16/10/2012	c.392A>T	p.N131I	20	c.392A>T	p.N131I		25	c.392A>T	p.N131I
				19	c.673-2A>T	p?		19	c.673-2A>T	p?
7	16/12/2014	c.392A>T	p.N131I							
		c.673-2A>T	p.?							
8	02/03/2005	Negative						Negative		
8	29/05/2012	c.626_627 del2	p.?					8	c.672+1G>T	p.?
		c.253_260 del8								
8	15/01/2013	c.626_627 del2	p.?	27	c.626_627del2	p.?		28	c.626_627del2	
		c.253_260 del8		9	c.672+1G>T	p.?		8	c.672+1G>T	
				3,7	c.832C>T	p.P278S				
8	17/11/2014	c.626_627del2		18,3	c.626_627del2					
		c.782+1G>A		21,7	c.782+1G>A					
				7	c.154C>T					
				0,6	c.672+1G>T					
9	01/07/2004	c.838A>G	p.R280G					28	c.838A>G	p.R280G
9	10/06/2008	c.838A>G	p.R280G							
9	05/11/2013	Negative		5	c.838A>G	p.R280G				
9	04/11/2014	c.838A>G	p.R280G	14,7	c.838A>G	p.R280G				
10	13/07/2006	c.763 A>T	p.I255F	49	c.763 A>T	p.I255F				
10	05/02/2008	c.763 A>T	p.I255F					79	c.763 A>T	p.I255F
11	27/11/2007	c.920-2A>G	p.?	26	c.920-2A>G			Negative		
				5	c.427G>A					
11	31/03/2009	c.920-2A>G	p.?					36	c.920-2A>G	p.?
11	19/03/2013	c.920-2A>G	p.?	36	c.920-2A>G	p.?		36	c.920-2A>G	p.?
		c.392_396del5		5	c.427G>A	p.?				
				11	c.392_396del5	p.?				
12	20/03/2013	c.743 G>A	p.R248Q					71	c.743 G>A	p.R248Q
12	30/04/2014	c.743 G>A	p.R248Q	72	c.743 G>A	p.R248Q				
12	19/11/2014	c.743 G>A	p.R248Q	86	c.743 G>A	p.R248Q				
13	02/09/2011	Negative						Negative		
13	14/11/2013	c.703A>G	p.N235D	37,9	c.703A>G	p.N235D				
14	12/10/2010	c.661del1	p.E221fs*	89,4	c.661del1			88	c.661del1	p.E221fs*
14	18/03/2014	c.661del1	p.E221fs*	96,2	c.661del1					
14	14/11/2014	c.661del1	p.E221fs*	70	c.661del1					
15	04/05/2004	Negative								
15	18/08/2009	c.473G>A	p.R158H	15,7	c.473G>A	p.R1E58H				
				6,7	c.673-2A>C	p.?				
16	29/01/2013	Negative								
16	18/11/2014	c.742C>T	p.R248W	37,1	c.742C>T	p.R248W				
17	14/05/2013	Negative								
17	30/09/2014	Negative		4,9	c.584T>C	p.I195T				

Discussion

L'intérêt de travailler sur une cohorte rétrospective est de pouvoir caractériser l'évolution clonale à différents moments de la maladie sur les échantillons séquentiels, chez des patients qui ont tous rechuté ou ont été réfractaires au traitement. Dans cette étude, nous avons montré que la présence d'anomalies de *TP53* était un facteur important d'évolution clonale et d'apparition d'un caryotype complexe chez les patients à haut-risque d'évolution.

L'incidence d'un caryotype complexe est élevée chez les patients présentant une anomalie de *TP53* et grâce à l'analyse longitudinale, nous avons montré que l'acquisition d'une anomalie de *TP53* précédait l'apparition du caryotype complexe. Ceci traduit l'instabilité génétique conférée par une voie de *TP53* non fonctionnelle qui altère les mécanismes de réparation de l'ADN et favorise l'acquisition d'anomalies chromosomiques.

Nous avons observé que le traitement sélectionne les clones mutés minoritaires, détectés avant la mise sous chimiothérapie grâce au séquençage sensible de type NGS.

Il faut également noter qu'en l'absence de tout traitement, une proportion non négligeable de patients qui n'avait pas d'anomalies de *TP53* au diagnostic en ont acquis une durant l'évolution de leur maladie. Ceci montre que ces anomalies apparaissent avec l'évolution naturelle de la maladie d'une part, et qu'elle favorise l'évolution clonale d'autre part. Un certain nombre de patients présentait plusieurs clones mutés, confirmant la complexité de l'architecture clonale de la LLC et l'implication de p53 dans ces processus.

La détection des anomalies de *TP53* est donc indispensable avant traitement puisque leur présence contre-indique l'utilisation de chimiothérapie à base d'analogues des purines et permet d'adapter la prise en charge thérapeutique, ce d'autant plus qu'il existe actuellement des traitements efficaces qui contournent la voie de *TP53* en ciblant directement la voie du BCR (Ibrutinib) ou les protéines anti-apoptotiques (Venetoclax).

7. Discussion générale et perspectives

L'objectif général de mon travail de thèse était d'étudier l'impact des anomalies génétiques dans le développement et l'évolution de la LLC. Dans la première partie du travail nous avons mis en évidence le rôle fonctionnel de la mutation d'*IKZF3*, mutation touchant 3% des patients atteints de LLC mais dont le rôle dans l'émergence de la maladie s'est révélé très important. Dans la deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés à d'autres anomalies génétiques cette fois fréquentes, touchant le gène *TP53*, qui contribuent au phénotype agressif de la maladie en favorisant sa progression et la résistance au traitement et permettent de mettre en évidence l'hétérogénéité clonale de la LLC.

La mutation d'*IKZF3* induit une prolifération de type LLC dans un modèle murin

Nous nous sommes intéressés à la mutation d'*IKZF3* p.L162R pour plusieurs raisons. *IKZF3* code pour un facteur de transcription important pour le développement B et la mutation cible un *hotspot* dans le domaine de liaison à l'ADN de la protéine. Le retentissement fonctionnel de cette mutation n'a jamais été étudié. Grâce à un modèle murin exprimant cette mutation dans le lignage B seulement, nous avons démontré son important potentiel oncogénique puisqu'elle est capable d'initier une lymphoprolifération B clonale avec des caractéristiques comparables à la LLC. Nos résultats ont montré que chez la souris, la mutation faux-sens d'*Ikaros* située au niveau du domaine de liaison à l'ADN modifie la sélection de ses gènes cibles en entraînant une modification subtile du motif reconnue par la protéine mutante. L'enrichissement d'*Ikaros* mutant au niveau de régions promotrices de nouveaux gènes cibles modifie le programme transcriptionnel avec un effet majoritairement activateur transcriptionnel de gènes appartenant à la voie du BCR et impliqués dans la migration notamment. Ceci se traduit fonctionnellement par une meilleure réponse à la stimulation du BCR et une capacité de migration augmentée. Par conséquent, la mutation au niveau de ce facteur de transcription joue un rôle essentiel dans la survie cellulaire et pourrait favoriser les mécanismes oncogéniques.

Le lien entre les mutations des protéines de la famille IKAROS et le développement d'hémopathies est bien connu pour *IKZF1*, le chef de file de cette famille de facteurs de transcription. *IKZF1* joue un rôle dans l'hématopoïèse et possède une structure homologue à celle d'*IKZF3*, avec un domaine de liaison à l'ADN constitué de 4 doigts de zinc et un

domaine d'interaction protéique pour la liaison aux remodeleurs de la chromatine^{214,265}. Le gène *IKZF1* est fréquemment ciblé par des mutations/délétions dans les leucémies aigues lymphoblastiques B (LAL B) de l'enfant (15-20%) et dans plus de 75% des cas des LAL B de l'adulte associées à un réarrangement BCR-ABL²⁶⁶⁻²⁶⁸. Ces mutations sont soit des mutations nulles monoalléliques entraînant une haploinsuffisance, soit de larges délétions englobant le domaine de liaison à l'ADN responsable d'une perte d'interaction à l'ADN avec un effet dominant négatif (la protéine conserve sa capacité à se lier aux autres protéines IKAROS), soit des mutations bialléliques induisant l'absence totale d'expression de la protéine²⁶⁸⁻²⁷⁰.

Dans notre modèle murin, les études du développement B réalisées n'ont pas mis en évidence d'anomalies de maturation dans la moelle osseuse ni le développement de LAL B, mais plutôt un impact sur le compartiment B mature. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'expression d'*Ikzf3* dans ce modèle repose sur l'activité du promoteur du CD19 qui augmente graduellement au cours de la différenciation. De ce fait, même si *Ikzf3* mutant est exprimé dès le stade pré-B, le niveau d'expression de la protéine mutante reste faible dans la moelle osseuse.

Il faut noter également que des études ont rapporté des niveaux d'expression élevés d'*IKZF3* dans les cellules de LLC par rapport à des cellules B normales ou d'autres hémopathies, ce qui suggère un rôle important de ce facteur de transcription dans la physiopathologie de la maladie²⁷¹⁻²⁷³. Les auteurs ont suggéré que cette surexpression était liée à une dérégulation épigénétique du promoteur d'*IKZF3* qui était plus accessible à des activateurs transcriptionnels tels que NF- κ B. La conséquence de cette surexpression serait une activation de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2, favorisant ainsi la survie cellulaire. Dans notre travail, en réanalysant des données transcriptomiques de deux grandes cohortes de patients LLC, nous avons également montré que l'augmentation du niveau d'expression d'*IKZF3* était corrélée à l'expression des gènes appartenant à la voie du BCR. Ainsi, la dérégulation des gènes de la signalisation du BCR pourrait être une caractéristique de la cellule de LLC, liée soit à l'hyperexpression d'*IKZF3*, soit à sa mutation ponctuelle. A noter que la mutation d'*IKZF3* identifiée dans la LLC est également présente dans d'autres lymphomes B où la signalisation du BCR est dérégulée et joue un rôle majeur dans la survie cellulaire, ce qui suggère un mécanisme similaire d'hyperexpression en rapport avec la mutation.

Dans notre modèle murin, la mutation d'*Ikzf3* est capable à elle seule d'induire le développement d'une LLC ou d'un lymphome de haut grade ce qui nous amène à nous poser la question du rôle fondateur de la mutation dans le développement de la maladie et de la cellule à l'origine de la prolifération. Dans la LLC, il est admis que les mutations fréquemment retrouvées à l'état clonal, telles que les mutations de *MYD88*, la trisomie 12 ou la délétion 13q, surviennent précocement et jouent un rôle dans l'initiation de la maladie^{182,226}. Les mutations sous-clonales sont acquises plus tard et jouent un rôle dans la progression. Dans notre étude, le modèle murin est généré de telle sorte que la mutation d'*Ikzf3* est obligatoirement clonale car l'ensemble de la lignée B possède l'allèle muté à l'état hétérozygote ou homozygote. Dans la première étude qui a identifié la mutation d'*IKZF3* chez 11 patients, la moitié des patients avait une mutation retrouvée avec une VAF élevée, suggérant que la mutation est clonale dans la majorité des cas¹⁸².

Nous observons par ailleurs que, malgré l'expression de la mutation restreinte au lignage B, toutes les souris n'ont pas développé de lymphoproliférations ce qui suggère que la mutation joue vraisemblablement un rôle favorisant mais que d'autres facteurs doivent intervenir pour induire la maladie, tels que des facteurs épigénétiques, une stimulation antigénique sélectionnant un clone, ou des facteurs microenvironnementaux. Le vieillissement est également un facteur important à prendre en compte car il est associé à l'acquisition d'anomalies génétiques additionnelles et une évolution clonale pouvant contribuer au développement de la LLC, maladie du sujet âgé. Plusieurs études ont montré que le taux de mutations clonales et sous-clonales chez des patients atteints de LLC « âgés » était plus élevée par rapport à celle de patients diagnostiqués à un plus jeune âge^{226,274}, à l'origine d'une hétérogénéité génétique plus importante en vieillissant. L'analyse des types de mutation (transitions/transversions) dans la LLC montre qu'il existe une augmentation des transitions C>T aux sites CpG, caractéristique liée au vieillissement, et une signature mutationnelle en rapport avec l'activité de l'AID (activation-induced cytidine deaminase), une enzyme intervenant dans le processus d'hypermutation somatique dans les centres germinatifs, responsable d'un effet *off-target*. Dans notre modèle murin, le développement de la LLC à un âge avancé à partir d'un clone muté préexistant pourrait donc être lié à l'acquisition d'évènements génétiques additionnels coopérant avec *Ikzf3* pour induire la lymphoprolifération. Un séquençage du génome entier est en cours pour tester cette hypothèse.

Pour élucider la contribution d'anomalies génétiques additionnelles dans le développement de la maladie ou un éventuel effet synergique, une stratégie possible est de modéliser ces associations chez la souris. Dans la LLC, la coopération entre deux évènements fréquemment associés, la délétion d'*Atm* et la mutation de *Sf3b1* K700E, a été mise en évidence dans un modèle murin double mutant dans lequel l'association des deux évènements génétiques est nécessaire pour le développement de la LLC. En se basant sur les données de séquençage de patients, on peut donc envisager de croiser les souris *Ikzf3* mutantes avec d'autres modèles murins porteurs de mutations récurrentes dans la maladie afin de voir si l'association des évènements diminue la latence de la maladie ou conduit à un phénotype plus agressif. Une autre stratégie actuelle consiste à manipuler génétiquement des cellules fœtales progénitrices LSK ($\text{Lin}^{-/\text{low}}$ Sca-1^+ c-Kit^+) de souris *Ikzf3* mutantes par édition génomique de type CRIPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) pour introduire des mutations/délétions dans des gènes fréquemment mutés dans la LLC. Ces cellules progénitrices porteuses de la mutation peuvent être ensuite greffées chez des souris receveuses afin de reproduire une hématopoïèse clonale et voir si le clone est capable d'induire une prolifération clonale. Des stratégies similaires ont été réalisées dans des modèles murins de leucémies aiguës myéloblastiques^{275,276}. L'avantage de ce type de stratégie est que seul un clone B est muté ce qui permet de se placer dans des conditions plus physiologiques où le clone évolue au sein d'un environnement cellulaire comportant des cellules B normales. L'autre avantage de cette technique est la possibilité de combiner un nombre élevé de mutations dans un même clone. Pour réaliser ce type d'étude, il sera nécessaire de prendre en compte les données génétiques d'un grand nombre de patients *IKZF3* mutés pour définir des associations de mutations pertinentes à modéliser.

Cependant, dans tous ces modèles, la LLC repose sur un évènement oncogénique acquis précocement dans la moelle osseuse. Or la cellule de LLC a longtemps été considérée comme dérivant de lymphocytes B matures. Les études transcriptomiques ont montré une signature génique de cellules B post-centre germinatif CD5+, tandis que les LLC *IGHV* non mutées dériverait d'un sous-groupe de cellules B CD5+ pré-centre germinatif²⁷⁷. Récemment, des études épigénétiques ont montré que le méthylome des cellules de LLC *IGHV* non muté est proche des cellules B naïves alors que celui des cellules de LLC *IGHV* muté est similaire à celui de cellules B stimulées par l'antigène^{239,240}. De plus, l'état de différenciation des cellules

B de LLC semble être associé à l'acquisition préférentielle de certaines anomalies génétiques, les cellules de LLC *IGHV* muté étant associées à un spectre limité de mutations incluant les mutations de *MYD88*, *CD79A/B* et *TLR2* alors que les cellules avec *IGHV* non mutés sont associées à un spectre large de lésions génétiques¹⁸².

L'origine « mature » de la LLC a pourtant récemment été remise en question par des études apportant des arguments en faveur de la présence de lésions génétiques et épigénétiques précoces dans des cellules souches hématopoïétiques médullaires associées au développement de la LLC. Kikushige et.al ont montré que la xéno greffe de progéniteurs hématopoïétiques de patients atteints de LLC dans des souris conduisait au développement d'une prolifération oligoclonale B CD5+, ce qui suggère que la capacité de générer une expansion clonale B s'acquiert précocement au niveau d'un précurseur hématopoïétique²⁷⁸. Dans une autre étude, le séquençage à haut débit de cellules souches hématopoïétiques médullaires triées de patients atteints de LLC a mis en évidence la présence de mutations dans des progéniteurs multipotents²⁷⁹. Ces mutations affectent des gènes fréquemment mutés dans la LLC tels que *SF3B1*, *NOTCH1*, *BRAF*, *NFKBIE* et *EGR2*. La présence de ces mutations, en particulier *BRAF* et *EGR2*, perturberait la différenciation B en dérégulant la signalisation du pré-BCR.

Ces études suggèrent donc un développement précoce de la leucémogénèse au niveau de progéniteurs pathologiques porteurs de mutations perturbant la lymphopoïèse B. Il est très probable que l'intervention d'autres facteurs soit nécessaire pour le déclenchement de la leucémogénèse, telle une stimulation antigénique chronique ultérieure qui serait responsable de la prolifération d'un clone de lymphocytes B matures.

Les mutations de *TP53* favorisent l'évolution clonale et la résistance au traitement

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons montré dans une étude longitudinale de prélèvements de patients que les anomalies de *TP53* étaient associées à l'évolution clonale et favorisaient l'instabilité génétique. Elles confèrent un avantage de survie lorsque les cellules sont soumises à une pression de sélection liée à un traitement par la fludarabine, traitement de référence de la maladie. Les sous-clones même minoritaires détectés avant la mise sous traitement s'expandent à la rechute, entraînant la résistance au traitement. La présence

d'anomalies de *TP53* est un élément de pronostic défavorable indépendamment de la taille du clone muté.

Notre étude révèle aussi qu'en plus de l'évolution clonale favorisée par la mutation, il existe une hétérogénéité des anomalies de *TP53* au sein d'un même patient car plusieurs variants peuvent être associés. La diversification clonale semble augmenter au cours de l'évolution de la maladie et après traitement. Ce phénomène reflète l'addiction de la tumeur pour *TP53* au cours de son évolution et l'importance d'altérer la voie de réparation des dommages à l'ADN pour favoriser la progression.

Contrairement aux mutations d'*IKZF3* qui ciblent spécifiquement un *hotspot*, les mutations de *TP53* sont dispersées dans le domaine de liaison à l'ADN avec des mutations faux sens, non-sens, de sites de *splicing* ou des décalages de lecture. On peut se demander quel est l'impact fonctionnel de chacune de ces mutations et s'il existe un profil mutationnel spécifique dans la LLC. La protéine p53 est un facteur de transcription qui agit sous forme de tétramère et en fonction du type d'anomalie génique, l'impact fonctionnel de la protéine sera différent²⁸⁰. Les délétions 17p, les mutations avec un décalage du cadre de lecture et les mutations stop aboutissent à la perte d'expression de p53 et donc à la perte de l'activité suppresseur de tumeur. En revanche, les mutations faux-sens entraînent la substitution d'un acide aminé par un autre et lorsqu'elles sont situées dans le domaine de fixation à l'ADN (exons 4 à 9) ces mutations inhibent la fixation du tétramère p53 à l'ADN et donc l'activité transcriptionnelle de la protéine. Certaines de ces mutations, en modifiant la conformation de la protéine, vont favoriser des interactions avec d'autres facteurs de transcriptions tels que ETS1/2, E2F1, NF- κ B, YAP ou le récepteur de la vitamine D et entraîner l'acquisition de nouvelles fonctions favorisant la prolifération tumorale, la mobilité cellulaire, l'invasion, le cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose²⁸¹⁻²⁸⁵. Le mutant p53 pourrait également favoriser l'accessibilité à la chromatine et entraîner l'expression des gènes contenus dans des régions distinctes du génome. Compte tenu de la diversité des mutations possibles, induisant potentiellement un nombre élevé de protéines avec des conformations variées, sélectionnant des facteurs de transcriptions divers, ceci pourrait entraîner la transactivation d'un spectre très large de gènes, avec des conséquences phénotypiques variées^{286,287}. Par exemple, dans certains cancers, les mutants R175H, Y220C et R248W interagissent avec les protéines p63 et p73 pour favoriser la mobilité cellulaire, l'invasion et les métastases^{288,289}. Cependant, une étude récente suggère

plutôt un effet perte de fonction des mutations faux sens²⁹⁰. Dans cette étude, des lignées exprimant les mutants de *TP53* les plus fréquents dans les leucémies aigues myéloblastiques ont été générées par CRISPR/CAS-9. Alors que les analyses de ChIP-seq montrent une perte d'enrichissements des différents mutants de *TP53* dans les régions promotrices, la signature transcriptionnelle des cellules exprimant les différents variants est similaire à celle de cellules *TP53*^{null}. Dans la LLC, chez des patients *TP53* polymutés, le gain de fonction ou la perte de fonction pourrait donc avoir des conséquences très variées sur l'évolution des clones, favoriser des compétitions clonales et impacter l'évolution de la maladie.

D'autre part, chez les patients pour lesquels on détecte plusieurs variants de *TP53*, on peut se demander si les mutations sont présentes dans des clones indépendants ou bien s'il s'agit de mutations multiples ciblant un même allèle. La taille des fragments séquencés en NGS est trop courte pour prédire la répartition des mutations dans le cas de multiclonalité. Comme cela a été proposé dans une étude sur les leucémies aigues myéloblastiques, un séquençage de type SMRT (*long range small molecule real time sequencing*) permettrait de déterminer la distribution allélique des mutations en séquençant un fragment long couvrant la séquence entière du gène *TP53* en une lecture unique²⁹¹. Ceci permettrait de comprendre la distribution allélique de chaque mutation et de démontrer la multiclonalité chez un même patient. Ce phénomène de multiclonalité indiquerait une pression de sélection importante dans certaines tumeurs conduisant à l'inactivation de *TP53* pour favoriser la progression tumorale.

Pour comprendre la distribution des mutations de *TP53* et pour mieux caractériser les associations multiclones et leur impact clinique, nous avons généré une importante base de données des variants de *TP53* dans la LLC grâce à une collaboration avec un groupe français d'étude de la LLC (groupe collaboratif FILO) et recueilli à ce jour plus de 500 variants de *TP53* chez 340 patients. L'analyse de cette base de données est actuellement en cours.

Implications cliniques et thérapeutiques

D'un point de vue plus clinique, une question fondamentale dans le domaine de la génétique est de savoir si le nombre croissant de mutations découverts a une pertinence clinique et peut améliorer la précision du pronostic, ou identifier des facteurs de résistance au traitement. Au-delà de la compréhension des mécanismes physiopathologiques, l'intérêt du profilage

génétiq ue des tumeurs est de développer une médecine personnalisée, pour offrir la meilleure prise en charge clinique aux patients. L'étude réalisée dans cette thèse montre bien que la détection des mutations de *TP53* est nécessaire avant de débuter un traitement par chimiothérapie puisque les sous-clones mutés sont sélectionnés et évoluent sous traitement. La détection des mutations de *TP53* avant toute ligne de traitement est nécessaire pour proposer une alternative thérapeutique à la chimiothérapie. La recherche de ces mutations fait partie des recommandations dans la prise en charge des patients.

Les données clinico-biologiques en rapport avec la mutation d'*IKZF3* ne sont pas encore disponibles, car peu de patients ont été identifiés à ce jour. Nous avons récemment identifié de nouveaux patients porteurs de la mutation *IKZF3* au sein d'un protocole clinique ainsi que dans le laboratoire d'hématologie de l'Hôpital Avicenne et nous avons initié un recueil de données cliniques pour voir comment ces patients ont évolué. Il sera intéressant de voir si la mutation impacte le pronostic ou la résistance au traitement. Compte tenu de la dérégulation de la voie du BCR associée à la mutation d'*IKZF3* que nous avons mis en évidence dans notre étude, on peut se demander quel est l'impact des inhibiteurs de BTK sur les clones mutés. Une étude préliminaire présentée au congrès de l'*American Society of hematology* (ASH) en décembre 2019 a montré que chez quelques patients porteurs de la mutation d'*IKZF3*, celle-ci restait clonale après traitement par Ibrutinib, ce qui suggère que le traitement n'a pas fait disparaître le clone et que la mutation pourrait apporter un avantage de survie.

L'autre intérêt majeur de la compréhension de la physiopathologie des tumeurs, est la possibilité d'identifier des cibles thérapeutiques. Compte tenu de l'importance de la mutation d'*IKZF3* que nous observons ici, on peut se demander s'il est possible de cibler spécifiquement le facteur de transcription *IKZF3* mutant. Dans le myélome multiple, une prolifération tumorale plasmocytaire, les protéines *IKZF1* et *IKZF3* jouent un rôle majeur dans la survie des cellules tumorales et la prolifération en induisant l'expression d'*IRF4* qui a son tour active *MYC*. Les molécules de la classe des IMiDs, dont le lenalidomide, entraînent la dégradation sélective d'*IKZF1/3* par le protéasome en formant un complexe avec l'E3 ligase CRBN-CRL4 et les protéines *IKAROS* qui sont ubiquitylées. Il en résulte une interruption de l'axe *IKZF1/3-IRF4-MYC* et une diminution de la prolifération plasmocytaire^{224,292}. Le lenalidomide est particulièrement efficace dans le myélome et fait partie des traitements de première ligne dans la maladie. Quelques études cliniques ont étudié

l'effet du lenalidomide en traitement d'entretien dans la LLC chez des patients à haut risque mais son utilisation reste limitée. Le mécanisme d'action du lenalidomide n'est pas totalement élucidé dans la LLC et impliquerait un effet immunomodulateur en ciblant les signaux de survie délivrés par le microenvironnement. En effet, IKZF1 et IKZF3 répriment l'expression de l'IL-2 dans les cellules T. En ciblant les protéines IKAROS dans les lymphocytes T, le lenalidomide restaure la production d'IL-2²⁹³. Cependant, l'effet cytotoxique direct du lenalidomide sur les cellules de LLC n'a pas été montré. D'autre part, il semblerait que la mutation d'IKZF3 L162R induise une résistance à la dégradation ciblée induite par le lenalidomide²²⁴.

Récemment, dans un modèle murin de xenogreffe dérivée de tumeur de patients atteints de lymphome du manteau, Dobrolovsky et al ont rapporté l'efficacité d'une molécule chimérique de types PROTACs (*proteolysis targeting chimeras*), le DD-03-17, formé d'une « linker » et d'un « degrader », capable de se lier à BTK, IKZF3 et IKZF1 et d'induire leur dégradation spécifique par le protéasome²⁹⁴. La molécule, également efficace sur la forme mutée de BTK, à un effet antiprolifératif et diminue le volume de la tumeur. Il serait donc intéressant de tester l'effet de cette molécule *in vitro* ou dans les modèles murins de LLC pour voir l'impact sur la cytotoxicité cellulaire, même en présence de la mutation d'IKZF3.

Concernant TP53, l'importance de la voie de réparation des dommages de l'ADN et la fonction suppresseur de tumeur ont suscité le développement de diverses stratégies visant à réactiver la protéine p53 pour ralentir la progression tumorale ou cibler directement les tumeurs. Une approche thérapeutique consiste à corriger la conformation de la protéine mutante avec la molécule PRIMA-1, pour restaurer la liaison à l'ADN et la fonction suppresseur de tumeur.^{295,296} Néanmoins, seule une fraction des protéines mutantes est corrigée et la molécule semble affecter d'autres protéines²⁹⁷. PRIMA-1 a montré un effet pro-apoptotique et anti-prolifératif dans des lignées cellulaires ou des cellules primaires issues de cancers hématologiques²⁹⁸⁻³⁰⁰. Elle a été la première molécule ciblant p53 mutant évaluée dans un essai clinique chez l'homme dans le traitement du cancer de la prostate³⁰¹. Dans la LLC, l'effet de PRIMA-1 a été testé *in vitro* sur des cellules de patients avec une délétion de TP53 et a montré un effet cytotoxique³⁰². Néanmoins, le statut mutationnel du gène TP53 n'a pas été évalué. Il serait donc intéressant de voir si la molécule est active sur tous les mutants de TP53.

Conclusion

La LLC n'est pas définie par une anomalie génétique commune à tous les patients, de multiples mutations ont été identifiées comme initiatrices ou secondaires, acquises au cours de l'évolution de la maladie. Le travail de cette thèse a consisté à améliorer notre compréhension du rôle des mutations somatiques récurrentes dans la pathogénèse de la LLC et leurs implications dans l'évolution de la maladie et la résistance au traitement.

Nous nous sommes focalisés sur la mutation du gène *IKZF3*, dont le rôle n'est pas connu et que nous avons analysé dans un modèle murin. Notre hypothèse était que cette mutation pouvait avoir un rôle « *driver* » dans la LLC, compte tenu de sa récurrence. Notre travail a permis de montrer le rôle « *driver* » de la mutation et de générer un modèle murin de LLC qui a révélé la fonction oncogénique d'*IKZF3* L162R. Ce modèle va permettre de comprendre les événements qui conduisent à la leucémogénèse et d'identifier les cibles thérapeutiques clés potentielles.

A l'inverse, les mutations de *TP53* contribuent à l'agressivité de la maladie et à la résistance aux analogues des purines. Ce sont des mutations acquises au cours de l'histoire naturelle de la maladie et identifiées à l'état sous-clonal. Notre hypothèse était que ces mutations sont présentes dans des sous-clones minoritaires et sont sélectionnées par le traitement. Nous avons étudié l'évolution clonale des mutations de *TP53* à travers une étude longitudinale pour comprendre comment elles favorisent le phénotype agressif de la maladie et la résistance au traitement. Nous avons montré non seulement que les anomalies de *TP53* évoluent sous traitement mais qu'elles favorisent aussi l'évolution clonale de la maladie.

Bibliographie

- 1 Kurosaki T. Functional dissection of BCR signaling pathways. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 276–281.
- 2 Pleiman CM, D'Ambrosio D, Cambier JC. The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol Today* 1994; **15**: 393–399.
- 3 Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: S41-52.
- 4 Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014; **5**: 520.
- 5 Lefranc M-P. [Antibody databases: IMGT, a French platform of world-wide interest]. *Med Sci (Paris)* 2009; **25**: 1020–1023.
- 6 Alt FW. Exclusive immunoglobulin genes. *Nature* 1984; **312**: 502–503.
- 7 Fugmann SD, Villey IJ, Ptaszek LM, Schatz DG. Identification of two catalytic residues in RAG1 that define a single active site within the RAG1/RAG2 protein complex. *Mol Cell* 2000; **5**: 97–107.
- 8 Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 495–527.
- 9 Weigert M, Perry R, Kelley D, Hunkapiller T, Schilling J, Hood L. The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature* 1980; **283**: 497–499.
- 10 Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 55–79.
- 11 Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; **91**: 661–672.
- 12 Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol* 2010; **28**: 21–55.
- 13 Maeda T, Merghoub T, Hobbs RM, Dong L, Maeda M, Zakrzewski J *et al*. Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science* 2007; **316**: 860–866.
- 14 Bertolino E, Reddy K, Medina KL, Parganas E, Ihle J, Singh H. Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat Immunol* 2005; **6**: 836–843.
- 15 Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004008> (accessed 13 Dec2019).

- 16 Tsubata T, Reth M. The products of pre-B cell-specific genes (λ 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* 1990; **172**: 973–976.
- 17 Georgopoulos K, Moore DD, Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 1992; **258**: 808–812.
- 18 Ng SY-M, Yoshida T, Zhang J, Georgopoulos K. Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells. *Immunity* 2009; **30**: 493–507.
- 19 Egawa T, Kawabata K, Kawamoto H, Amada K, Okamoto R, Fujii N *et al.* The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* 2001; **15**: 323–334.
- 20 Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993; **261**: 600–603.
- 21 Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2305–2309.
- 22 Ma S, Pathak S, Mandal M, Trinh L, Clark MR, Lu R. Ikaros and Aiolos inhibit pre-B-cell proliferation by directly suppressing c-Myc expression. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 4149–4158.
- 23 Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E *et al.* Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *The EMBO Journal* 1997; **16**: 2004–2013.
- 24 Ferreirós-Vidal I, Carroll T, Taylor B, Terry A, Liang Z, Bruno L *et al.* Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation. *Blood* 2013; **121**: 1769–1782.
- 25 Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 15–27.
- 26 Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007; **27**: 190–202.
- 27 MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 117–139.
- 28 Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev* 2004; **18**: 1–11.
- 29 Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; **73**: 3628–3632.
- 30 Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Pillars Article: Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced

- Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell*. 2000. 102: 553-563.
J Immunol 2018; **201**: 2530–2540.
- 31 Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 573–583.
 - 32 Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 251–262.
 - 33 Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM. T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**: 349–354.
 - 34 Yamamoto T, Yamanashi Y, Toyoshima K. Association of Src-family kinase Lyn with B-cell antigen receptor. *Immunol Rev* 1993; **132**: 187–206.
 - 35 Rolli V, Gallwitz M, Wossning T, Flemming A, Schamel WWA, Zürn C *et al*. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell* 2002; **10**: 1057–1069.
 - 36 Fearon DT, Carroll MC. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 393–422.
 - 37 Cheng PC, Dykstra ML, Mitchell RN, Pierce SK. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med* 1999; **190**: 1549–1560.
 - 38 Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992; **256**: 105–107.
 - 39 Liu C, Miller H, Hui KL, Grooman B, Bolland S, Upadhyaya A *et al*. A balance of Bruton's tyrosine kinase and SHIP activation regulates B cell receptor cluster formation by controlling actin remodeling. *J Immunol* 2011; **187**: 230–239.
 - 40 Engels N, Wollscheid B, Wienands J. Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 2126–2134.
 - 41 Kabak S, Skaggs BJ, Gold MR, Affolter M, West KL, Foster MS *et al*. The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 2524–2535.
 - 42 Fu C, Turck CW, Kurosaki T, Chan AC. BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* 1998; **9**: 93–103.
 - 43 Takata M, Sabe H, Hata A, Inazu T, Homma Y, Nukada T *et al*. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J* 1994; **13**: 1341–1349.
 - 44 Hashimoto S, Iwamatsu A, Ishiai M, Okawa K, Yamadori T, Matsushita M *et al*. Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK--functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood* 1999; **94**: 2357–2364.

- 45 Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol* 2004; **41**: 599–613.
- 46 Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S *et al.* STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 2005; **169**: 435–445.
- 47 Chantry D, Vojtek A, Kashishian A, Holtzman DA, Wood C, Gray PW *et al.* p110delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19236–19241.
- 48 Maus M, Medgyesi D, Kövesdi D, Csuka D, Koncz G, Sármay G. Grb2 associated binder 2 couples B-cell receptor to cell survival. *Cell Signal* 2009; **21**: 220–227.
- 49 Pleiman CM, Hertz WM, Cambier JC. Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* 1994; **263**: 1609–1612.
- 50 Gold MR, Ingham RJ, McLeod SJ, Christian SL, Scheid MP, Duronio V *et al.* Targets of B-cell antigen receptor signaling: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway and the Rap1 GTPase. *Immunol Rev* 2000; **176**: 47–68.
- 51 Park H, Wahl MI, Afar DE, Turck CW, Rawlings DJ, Tam C *et al.* Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity* 1996; **4**: 515–525.
- 52 Petro JB, Rahman SM, Ballard DW, Khan WN. Bruton's tyrosine kinase is required for activation of I κ B kinase and nuclear factor κ B in response to B cell receptor engagement. *J Exp Med* 2000; **191**: 1745–1754.
- 53 Niiro H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 945–956.
- 54 Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 1997; **386**: 855–858.
- 55 Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 707–747.
- 56 Stadanlick JE, Kaileh M, Karnell FG, Scholz JL, Miller JP, Quinn WJ *et al.* Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF- κ B substrate for prosurvival B_LyS signaling. *Nat Immunol* 2008; **9**: 1379–1387.
- 57 Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; **298**: 1911–1912.
- 58 Hashimoto A, Okada H, Jiang A, Kurosaki M, Greenberg S, Clark EA *et al.* Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C- γ 2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH₂-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *J Exp Med* 1998; **188**: 1287–1295.

- 59 Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D *et al.* Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 1998; **17**: 313–325.
- 60 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 225–260.
- 61 Sommer K, Guo B, Pomerantz JL, Bandaranayake AD, Moreno-García ME, Ovechkina YL *et al.* Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity* 2005; **23**: 561–574.
- 62 Vivier E, Daëron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 1997; **18**: 286–291.
- 63 Pritchard NR, Smith KGC. B cell inhibitory receptors and autoimmunity. *Immunology* 2003; **108**: 263–273.
- 64 Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 253–300.
- 65 Nitschke L, Tsubata T. Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. *Trends Immunol* 2004; **25**: 543–550.
- 66 Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, Zhang B, Paik JH, DePinho RA *et al.* PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* 2009; **139**: 573–586.
- 67 Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB *et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010; **463**: 88–92.
- 68 Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW *et al.* Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008; **319**: 1676–1679.
- 69 Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001; **194**: 1861–1874.
- 70 Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; **127**: 2375–2390.
- 71 Le Guyader-Peyrou S, Belot A, Maynadié M, Binder-Foucard F, Remontet L, Troussard X *et al.* Cancer incidence in France over the 1980-2012 period: Hematological malignancies. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2016; **64**: 103–112.
- 72 Howlader N, Noone A, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse S *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. National Cancer Institute http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/ (accessed 3 Sep2013).
- 73 Does GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E, Bluhm EC *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 2007; **139**: 809–819.

- 74 *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim*. Institut de veille sanitaire: Saint-Maurice, 2013.
- 75 Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009; **94**: 647–653.
- 76 Goldin LR, Pfeiffer RM, 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* 2004; **104**: 1850–1854.
- 77 Kristinsson SY, Björkholm M, Goldin LR, McMaster ML, Turesson I, Landgren O. Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden. *Blood* 2008; **112**: 3052–3056.
- 78 Goldin LR, Pfeiffer RM, 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* 2004; **104**: 1850–1854.
- 79 Kristinsson SY, Björkholm M, Goldin LR, McMaster ML, Turesson I, Landgren O. Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden. *Blood* 2008; **112**: 3052–3056.
- 80 Andritsos L, Khoury H. Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2002; **3**: 225–231.
- 81 Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA *et al*. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997; **108**: 378–382.
- 82 Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; **51**: 364–369.
- 83 Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH *et al*. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; **8**: 1640–1645.
- 84 Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; **46**: 219–234.
- 85 Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J *et al*. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; **48**: 198–206.
- 86 Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; : 279–284.

- 87 Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; **352**: 804–815.
- 88 Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008; **371**: 1017–1029.
- 89 Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Viñolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; **62**: 567–575.
- 90 Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; **60**: 2712–2716.
- 91 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H *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* 2008; **111**: 5446–5456.
- 92 Fasola G, Fanin R, Gherlinzoni F, Galieni P, Taruscio D, Frezza G *et al.* Serum LDH concentration in non-Hodgkin's lymphomas. Relationship to histologic type, tumor mass, and presentation features. *Acta Haematol* 1984; **72**: 231–238.
- 93 Endrizzi L, Fiorentino MV, Salvagno L, Segati R, Pappagallo GL, Fosser V. Serum lactate dehydrogenase (LDH) as a prognostic index for non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982; **18**: 945–949.
- 94 Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S *et al.* Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996; **22**: 439–447.
- 95 Källander CF, Simonsson B, Gronowitz JS, Nilsson K. Serum deoxythymidine kinase correlates with peripheral lymphocyte thymidine uptake in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1987; **38**: 331–337.
- 96 Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D *et al.* Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **93**: 1732–1737.
- 97 Heintel D, Schwarzinger I, Chizzali-Bonfadin C, Thalhammer R, Schwarzmeier J, Fritzer-Szekeres M *et al.* Association of CD38 antigen expression with other prognostic parameters in early stages of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2001; **42**: 1315–1321.
- 98 Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P *et al.* V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **100**: 1410–1416.
- 99 Hamblin TJ, Davis ZA, Oscier DG. Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated chronic lymphocytic

- leukaemia - long-term follow up of patients with different percentages of mutations. *Br J Haematol* 2008; **140**: 320–323.
- 100 Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1840–1847.
- 101 Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1848–1854.
- 102 Thorsélius M, Kröber A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Bühler A *et al.* Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood* 2006; **107**: 2889–2894.
- 103 Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Söderberg O, Karlsson K *et al.* Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 2003; **101**: 4952–4957.
- 104 Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, Murray F, Laurell A, Willander K *et al.* Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; **104**: 2879–2885.
- 105 Rosén A, Murray F, Evaldsson C, Rosenquist R. Antigens in chronic lymphocytic leukemia--implications for cell origin and leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 400–409.
- 106 Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan X-J *et al.* Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012; **119**: 4467–4475.
- 107 Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T *et al.* Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007; **109**: 259–270.
- 108 Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; **194**: 1639–1647.
- 109 Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG *et al.* ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004; **351**: 893–901.
- 110 Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW *et al.* ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004; **363**: 105–111.

- 111 Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1764–1775.
- 112 Dürig J, Nüchel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J *et al.* ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003; **17**: 2426–2434.
- 113 Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG *et al.* Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med* 2013; **210**: 2273–2288.
- 114 Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L *et al.* Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 4415–4422.
- 115 Rossi D, Rasi S, Spina V, Fangazio M, Monti S, Greco M *et al.* Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2012; **158**: 426–429.
- 116 O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, Giles FJ, Freireich EJ, Cortes J *et al.* Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 2165–2170.
- 117 Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A *et al.* Ofatumumab As Single-Agent CD20 Immunotherapy in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 1749–1755.
- 118 Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, Hipp S, Duyster J, Peschel C *et al.* Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* 2002; **100**: 3741–3748.
- 119 Woyach JA, Bojnik E, Ruppert AS, Stefanovski MR, Goettl VM, Smucker KA *et al.* Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2014; **123**: 1207–1213.
- 120 Woyach JA, Furman RR, Liu T-M, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS *et al.* Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 2014; **370**: 2286–2294.
- 121 Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF *et al.* Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2016; **374**: 311–322.
- 122 Anderson MA, Deng J, Seymour JF, Tam C, Kim SY, Fein J *et al.* The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood* 2016; **127**: 3215–3224.
- 123 Blombery P, Anderson MA, Gong J-N, Thijssen R, Birkinshaw RW, Thompson ER *et al.* Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to

- Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discov* 2019; **9**: 342–353.
- 124 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 2018; **131**: 2745–2760.
 - 125 Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P *et al.* Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* 2016; **127**: 208–215.
 - 126 Cory S, Huang DCS, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; **22**: 8590–8607.
 - 127 Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 2005; **114**: 441–449.
 - 128 Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; **82**: 1820–1828.
 - 129 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15524–15529.
 - 130 Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010; **17**: 28–40.
 - 131 Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; **115**: 755–764.
 - 132 Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; **20**: 399–413.
 - 133 Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan X-J *et al.* B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; **99**: 4087–4093.
 - 134 Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol* 2013; **34**: 592–601.
 - 135 Iacovelli S, Hug E, Bennardo S, Duehren-von Minden M, Gobessi S, Rinaldi A *et al.* Two types of BCR interactions are positively selected during leukemia development in the E μ -TCL1 transgenic mouse model of CLL. *Blood* 2015; **125**: 1578–1588.
 - 136 Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; **101**: 1087–1093.

- 137 Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A *et al.* Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **100**: 4609–4614.
- 138 Allsup DJ, Kamiguti AS, Lin K, Sherrington PD, Matrai Z, Slupsky JR *et al.* B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2005; **65**: 7328–7337.
- 139 Le Roy C, Deglesne P-A, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; **120**: 356–365.
- 140 Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V *et al.* Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* 2008; **112**: 188–195.
- 141 Apollonio B, Scielzo C, Bertilaccio MTS, Ten Hacken E, Scarfò L, Ranghetti P *et al.* Targeting B-cell anergy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **121**: 3879–3888, S1-8.
- 142 Chu CC, Catera R, Zhang L, Didier S, Agagnina BM, Damle RN *et al.* Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. *Blood* 2010; **115**: 3907–3915.
- 143 Binder M, Léchenne B, Ummanni R, Scharf C, Balabanov S, Trusch M *et al.* Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells. *PLoS ONE* 2010; **5**: e15992.
- 144 Kostareli E, Gounari M, Janus A, Murray F, Brochet X, Giudicelli V *et al.* Antigen receptor stereotypy across B-cell lymphoproliferations: the case of IGHV4-59/IGKV3-20 receptors with rheumatoid factor activity. *Leukemia* 2012; **26**: 1127–1131.
- 145 Bröker BM, Klajman A, Youinou P, Jouquan J, Worman CP, Murphy J *et al.* Chronic lymphocytic leukemic (CLL) cells secrete multispecific autoantibodies. *J Autoimmun* 1988; **1**: 469–481.
- 146 Stoeber ZM, Wakai M, Tse DB, Vinciguerra VP, Allen SL, Budman DR *et al.* Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1989; **169**: 255–268.
- 147 Hoogeboom R, Wormhoudt TA, Schipperus MR, Langerak AW, Dunn-Walters DK, Guikema JEJ *et al.* A novel chronic lymphocytic leukemia subset expressing mutated IGHV3-7-encoded rheumatoid factor B-cell receptors that are functionally proficient. *Leukemia* 2013; **27**: 738–740.
- 148 Hoogeboom R, van Kessel KPM, Hochstenbach F, Wormhoudt TA, Reinten RJA, Wagner K *et al.* A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J Exp Med* 2013; **210**: 59–70.

- 149 Binder M, Müller F, Frick M, Wehr C, Simon F, Leistler B *et al.* CLL B-cell receptors can recognize themselves: alternative epitopes and structural clues for autostimulatory mechanisms in CLL. *Blood* 2013; **121**: 239–241.
- 150 Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol* 2013; **34**: 592–601.
- 151 Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of ‘nurselike’ cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **99**: 1030–1037.
- 152 Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Gräff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; **110**: 3316–3325.
- 153 The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20940416> (accessed 29 Oct2019).
- 154 Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell’Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000; **96**: 2655–2663.
- 155 Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, Bonello L, Horenstein AL, Tamagnone L *et al.* CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005; **105**: 3042–3050.
- 156 Jia L, Clear A, Liu F-T, Matthews J, Uddin N, McCarthy A *et al.* Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; **123**: 1709–1719.
- 157 Ruan J, Hyjek E, Kermani P, Christos PJ, Hooper AT, Coleman M *et al.* Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin’s lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 5622–5631.
- 158 Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP *et al.* Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 2009; **114**: 4441–4450.
- 159 Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998; **91**: 2387–2396.
- 160 Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; **106**: 995–1004.
- 161 Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgün G, Le Dieu R, Blum W *et al.* Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 2008; **118**: 2427–2437.

- 162 Ramsay AG, Evans R, Kiaii S, Svensson L, Hogg N, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1-directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with lenalidomide. *Blood* 2013; **121**: 2704–2714.
- 163 Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S *et al.* T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013; **121**: 1612–1621.
- 164 Riches JC, Gribben JG. Hanging tough: CMV-specific CD8+ T cells in CLL. *Blood* 2014; **123**: 608–609.
- 165 Lazarian G, Guièze R, Wu CJ. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 984–993.
- 166 Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–1916.
- 167 Ouillette P, Collins R, Shakhan S, Li J, Li C, Shedden K *et al.* The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 6778–6790.
- 168 pubmeddev, al DH *et al.* 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9116297> (accessed 12 Dec2019).
- 169 Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Göransson H, Jansson M, Cahill N *et al.* Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia* 2010; **24**: 211–215.
- 170 Roos-Weil D, Nguyen-Khac F, Chevret S, Touzeau C, Roux C, Lejeune J *et al.* Mutational and cytogenetic analyses of 188 CLL patients with trisomy 12: A retrospective study from the French Innovative Leukemia Organization (FILO) working group. *Genes Chromosomes Cancer* 2018; **57**: 533–540.
- 171 Kienle DL, Korz C, Hosch B, Benner A, Mertens D, Habermann A *et al.* Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 3780–3792.
- 172 Porpaczy E, Bilban M, Heinze G, Gruber M, Vanura K, Schwarzinger I *et al.* Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12. *Eur J Clin Invest* 2009; **39**: 568–575.
- 173 Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–1916.

- 174 Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Döhner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 748–753.
- 175 Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A *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* 2008; **112**: 3322–3329.
- 176 Lazarian G, Tausch E, Eclache V, Sebaa A, Bianchi V, Letestu R *et al.* TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes. *Int J Cancer* 2016; **139**: 1759–1763.
- 177 Brown JR, Hanna M, Tesar B, Werner L, Pochet N, Asara JM *et al.* Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 3791–3802.
- 178 Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kreutz C, Martens UM *et al.* Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 2007; **109**: 1202–1210.
- 179 Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A *et al.* Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 2005; **106**: 3214–3222.
- 180 Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Bühler A, Zenz T *et al.* High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* 2012; **120**: 4783–4794.
- 181 Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, Bastard C, Mossafa H, Leroux D *et al.* Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res* 2010; **34**: 63–68.
- 182 Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015; **526**: 525–530.
- 183 Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI *et al.* Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015; **526**: 519–524.
- 184 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; **408**: 307–310.
- 185 Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, Orłowski RZ, Andreeff M, Bueso-Ramos CE *et al.* Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood* 2012; **119**: 3668–3683.
- 186 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; **144**: 646–674.

- 187 Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* 2009; **136**: 823–837.
- 188 Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; **69**: 1237–1245.
- 189 Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; **387**: 296–299.
- 190 Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J *et al.* Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011; **208**: 1389–1401.
- 191 Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D *et al.* TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 4473–4479.
- 192 Campo E, Cymbalista F, Ghia P, Jäger U, Pospisilova S, Rosenquist R *et al.* TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *Haematologica* 2018; **103**: 1956–1968.
- 193 Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S *et al.* NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013; **27**: 1100–1106.
- 194 Oscier DG, Rose-Zerilli MJJ, Winkelmann N, Gonzalez de Castro D, Gomez B, Forster J *et al.* The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2013; **121**: 468–475.
- 195 Foà R, Del Giudice I, Guarini A, Rossi D, Gaidano G. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013; **98**: 675–685.
- 196 Close V, Close W, Kugler SJ, Reichenzeller M, Yosifov DY, Bloehdorn J *et al.* FBXW7 mutations reduce binding of NOTCH1, leading to cleaved NOTCH1 accumulation and target gene activation in CLL. *Blood* 2019; **133**: 830–839.
- 197 Close V, Close W, Kugler SJ, Reichenzeller M, Yosifov DY, Bloehdorn J *et al.* NOTCH1 Signaling Is Activated in CLL By Mutations of FBXW7 and Low Expression of USP28 at 11q23. *Blood* 2018; **132**: 946–946.
- 198 Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; **44**: 47–52.
- 199 Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K *et al.* SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2011; **365**: 2497–2506.
- 200 Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011; **478**: 64–69.

- 201 Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 2009; **136**: 701–718.
- 202 Damm F, Thol F, Kosmider O, Kade S, Löffeld P, Dreyfus F *et al.* SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes: clinical associations and prognostic implications. *Leukemia* 2012; **26**: 1137–1140.
- 203 Kotake Y, Sagane K, Owa T, Mimori-Kiyosue Y, Shimizu H, Uesugi M *et al.* Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol* 2007; **3**: 570–575.
- 204 Wang L, Brooks AN, Fan J, Wan Y, Gambe R, Li S *et al.* Transcriptomic characterization of SF3B1 mutation reveals its pleiotropic effects in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2016; **30**: 750–763.
- 205 Yin S, Gambe RG, Sun J, Martinez AZ, Cartun ZJ, Regis FFD *et al.* A Murine Model of Chronic Lymphocytic Leukemia Based on B Cell-Restricted Expression of Sf3b1 Mutation and Atm Deletion. *Cancer Cell* 2019; **35**: 283-296.e5.
- 206 Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V *et al.* SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia* 2014; **28**: 108–117.
- 207 Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, Aymerich M, Jares P, Juan M *et al.* Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood* 2014; **123**: 3790–3796.
- 208 Lin S-C, Lo Y-C, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010; **465**: 885–890.
- 209 Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y *et al.* Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 2008; **9**: 684–691.
- 210 Mansouri L, Sutton L-A, Ljungström V, Bondza S, Arngården L, Bhoi S *et al.* Functional loss of IκBε leads to NF-κB deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2015; **212**: 833–843.
- 211 Diop F, Moia R, Favini C, Spaccarotella E, De Paoli L, Brusca A *et al.* Biological and clinical implications of BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2019. doi:10.3324/haematol.2019.219550.
- 212 Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S *et al.* Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; **119**: 2854–2862.
- 213 Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E *et al.* Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J* 1997; **16**: 2004–2013.
- 214 Molnár A, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 8292–8303.

- 215 Georgopoulos K. The making of a lymphocyte: the choice among disparate cell fates and the IKAROS enigma. *Genes Dev* 2017; **31**: 439–450.
- 216 Wang JH, Avitahl N, Cariappa A, Friedrich C, Ikeda T, Renold A *et al.* Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity* 1998; **9**: 543–553.
- 217 Cariappa A, Tang M, Parg C, Nebelitskiy E, Carroll M, Georgopoulos K *et al.* The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 2001; **14**: 603–615.
- 218 Cortés M, Georgopoulos K. Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity. *J Exp Med* 2004; **199**: 209–219.
- 219 Hu Y, Zhang Z, Kashiwagi M, Yoshida T, Joshi I, Jena N *et al.* Superenhancer reprogramming drives a B-cell–epithelial transition and high-risk leukemia. *Genes Dev* 2016; **30**: 1971–1990.
- 220 Zhang J, Jackson AF, Naito T, Dose M, Seavitt J, Liu F *et al.* Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. *Nat Immunol* 2011; **13**: 86–94.
- 221 Thompson EC, Cobb BS, Sabbattini P, Meixlsperger S, Parelho V, Liberg D *et al.* Ikaros DNA-binding proteins as integral components of B cell developmental-stage-specific regulatory circuits. *Immunity* 2007; **26**: 335–344.
- 222 Morin RD, Assouline S, Alcaide M, Mohajeri A, Johnston RL, Chong L *et al.* Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 2290–2300.
- 223 Roos-Weil D, Decaudin C, Armand M, Della-Valle V, Diop MK, Ghamlouch H *et al.* A recurrent activating missense mutation in Waldenström macroglobulinemia affects the DNA binding of the ETS transcription factor SPI1 and enhances proliferation. *Cancer Discov* 2019; : CD-18-0873.
- 224 Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M *et al.* Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* 2014; **343**: 301–305.
- 225 Greaves M, Maley CC. CLONAL EVOLUTION IN CANCER. *Nature* 2012; **481**: 306–313.
- 226 Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS *et al.* Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell* 2013; **152**: 714–726.
- 227 Rose-Zerilli MJJ, Gibson J, Wang J, Tapper W, Davis Z, Parker H *et al.* Longitudinal copy number, whole exome and targeted deep sequencing of ‘good risk’ IGHV-mutated CLL patients with progressive disease. *Leukemia* 2016; **30**: 1301–1310.
- 228 Del Giudice I, Marinelli M, Wang J, Bonina S, Messina M, Chiaretti S *et al.* Inter- and intra-patient clonal and subclonal heterogeneity of chronic lymphocytic leukaemia:

- evidence from circulating and lymph nodal compartments. *Br J Haematol* 2016; **172**: 371–383.
- 229 Wang J, Khiabani H, Rossi D, Fabbri G, Gattei V, Forconi F *et al.* Tumor evolutionary directed graphs and the history of chronic lymphocytic leukemia. *Elife* 2014; **3**. doi:10.7554/eLife.02869.
- 230 Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, Lehman A, Blachly JS, Lozanski A *et al.* BTKC481S-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 1437–1443.
- 231 Quinquenel A, Fornecker L-M, Letestu R, Ysebaert L, Fleury C, Lazarian G *et al.* Prevalence of BTK and PLCG2 mutations in a real-life CLL cohort still on ibrutinib after 3 years: a FILO group study. *Blood* 2019; **134**: 641–644.
- 232 Burger JA, Landau DA, Taylor-Weiner A, Bozic I, Zhang H, Sarosiek K *et al.* Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun* 2016; **7**. doi:10.1038/ncomms11589.
- 233 Guièze R, Liu VM, Rosebrock D, Jourdain AA, Hernández-Sánchez M, Martínez Zurita A *et al.* Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies. *Cancer Cell* 2019; **36**: 369-384.e13.
- 234 Yuille MR, Condie A, Stone EM, Wilsher J, Bradshaw PS, Brooks L *et al.* TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; **30**: 336–341.
- 235 Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen S-S *et al.* Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2007; **129**: 879–890.
- 236 Claus R, Lucas DM, Ruppert AS, Williams KE, Weng D, Patterson K *et al.* Validation of ZAP-70 methylation and its relative significance in predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; **124**: 42–48.
- 237 Pallasch CP, Patz M, Park YJ, Hagist S, Eggle D, Claus R *et al.* miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; **114**: 3255–3264.
- 238 Baer C, Claus R, Frenzel LP, Zucknick M, Park YJ, Gu L *et al.* Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2012; **72**: 3775–3785.
- 239 Kulis M, Merkel A, Heath S, Queirós AC, Schuyler RP, Castellano G *et al.* Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat Genet* 2015; **47**: 746–756.
- 240 Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G *et al.* Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2012; **44**: 1236–1242.

- 241 Cahill N, Bergh A-C, Kanduri M, Göransson-Kultima H, Mansouri L, Isaksson A *et al.* 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia* 2013; **27**: 150–158.
- 242 Chen S-S, Raval A, Johnson AJ, Hertlein E, Liu T-H, Jin VX *et al.* Epigenetic changes during disease progression in a murine model of human chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 13433–13438.
- 243 Landau DA, Clement K, Ziller MJ, Boyle P, Fan J, Gu H *et al.* Locally disordered methylation forms the basis of intratumor methylome variation in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2014; **26**: 813–825.
- 244 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 7634–7638.
- 245 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; **292**: 154–156.
- 246 Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; **265**: 103–106.
- 247 Cohen-Tannoudji M, Babinet C. Beyond ‘knock-out’ mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 929–938.
- 248 Orban PC, Chui D, Marth JD. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 6861–6865.
- 249 Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ *et al.* TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 2006; **20**: 280–285.
- 250 Herling M, Patel KA, Weit N, Lilienthal N, Hallek M, Keating MJ *et al.* High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; **114**: 4675–4686.
- 251 Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R *et al.* Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 6955–6960.
- 252 Johnson AJ, Lucas DM, Muthusamy N, Smith LL, Edwards RB, De Lay MD *et al.* Characterization of the TCL-1 transgenic mouse as a preclinical drug development tool for human chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; **108**: 1334–1338.
- 253 Pekarsky Y, Palamarchuk A, Maximov V, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U *et al.* Tc11 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 19643–19648.

- 254 Laine J, Künstle G, Obata T, Sha M, Noguchi M. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell* 2000; **6**: 395–407.
- 255 pubmeddev, al PA et. Tc11 protein functions as an inhibitor of de novo DNA methylation in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308499> (accessed 22 Oct2019).
- 256 Zapata JM, Krajewska M, Morse HC, Choi Y, Reed JC. TNF receptor-associated factor (TRAF) domain and Bcl-2 cooperate to induce small B cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 16600–16605.
- 257 Stein JV, López-Fraga M, Elustondo FA, Carvalho-Pinto CE, Rodríguez D, Gómez-Caro R *et al.* APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1587–1598.
- 258 Planelles L, Carvalho-Pinto CE, Hardenberg G, Smaniotto S, Savino W, Gómez-Caro R *et al.* APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer Cell* 2004; **6**: 399–408.
- 259 Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008; **359**: 575–583.
- 260 Eichhorst B, Fink A-M, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C *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. *Lancet Oncol* 2016; **17**: 928–942.
- 261 Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J *et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; **376**: 1164–1174.
- 262 Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T *et al.* TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010; **24**: 2072–2079.
- 263 Zenz T, Häbe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Bühler A *et al.* Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009; **114**: 2589–2597.
- 264 Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R *et al.* Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; **123**: 2139–2147.
- 265 Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E *et al.* Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 1999; **10**: 345–355.

- 266 Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; **446**: 758–764.
- 267 Kuiper RP, Schoenmakers EFPM, van Reijmersdal SV, Hehir-Kwa JY, van Kessel AG, van Leeuwen FN *et al.* High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007; **21**: 1258–1266.
- 268 Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J *et al.* BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008; **453**: 110–114.
- 269 Iacobucci I, Storlazzi CT, Cilloni D, Lonetti A, Ottaviani E, Soverini S *et al.* Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood* 2009; **114**: 2159–2167.
- 270 Dupuis A, Gaub MP, Legrain M, Drenou B, Mauvieux L, Lutz P *et al.* Biclonal and biallelic deletions occur in 20% of B-ALL cases with IKZF1 mutations. *Leukemia* 2013; **27**: 503–507.
- 271 Duhamel M, Arrouss I, Merle-Béral H, Rebollo A. The Aiolos transcription factor is up-regulated in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **111**: 3225–3228.
- 272 Nüchel H, Frey UH, Sellmann L, Collins CH, Dührsen U, Siffert W. The IKZF3 (Aiolos) transcription factor is highly upregulated and inversely correlated with clinical progression in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; **144**: 268–270.
- 273 Billot K, Soeur J, Chereau F, Arrouss I, Merle-Béral H, Huang M-E *et al.* Deregulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic modifications. *Blood* 2011; **117**: 1917–1927.
- 274 Kasar S, Kim J, Improgo R, Tiao G, Polak P, Haradhvala N *et al.* Whole-genome sequencing reveals activation-induced cytidine deaminase signatures during indolent chronic lymphocytic leukaemia evolution. *Nat Commun* 2015; **6**: 1–12.
- 275 Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME *et al.* Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol* 2014; **32**: 941–946.
- 276 Tran NT, Sommermann T, Graf R, Trombke J, Pempe J, Petsch K *et al.* Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockin in Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Reports* 2019; **28**: 3510-3522.e5.
- 277 Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Dürig J *et al.* Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012; **209**: 2183–2198.

- 278 Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G *et al.* Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011; **20**: 246–259.
- 279 Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E *et al.* Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov* 2014; **4**: 1088–1101.
- 280 Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 2014; **25**: 304–317.
- 281 Do PM, Varanasi L, Fan S, Li C, Kubacka I, Newman V *et al.* Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes Dev* 2012; **26**: 830–845.
- 282 Vaughan CA, Deb SP, Deb S, Windle B. Preferred binding of gain-of-function mutant p53 to bidirectional promoters with coordinated binding of ETS1 and GABPA to multiple binding sites. *Oncotarget* 2014; **5**: 417–427.
- 283 Dell’Orso S, Fontemaggi G, Stambolsky P, Goeman F, Voellenkle C, Levrero M *et al.* ChIP-on-chip analysis of in vivo mutant p53 binding to selected gene promoters. *OMICs* 2011; **15**: 305–312.
- 284 Di Agostino S, Sorrentino G, Ingallina E, Valenti F, Ferraiuolo M, Bicciato S *et al.* YAP enhances the pro-proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins. *EMBO Rep* 2016; **17**: 188–201.
- 285 Stambolsky P, Tabach Y, Fontemaggi G, Weisz L, Maor-Aloni R, Siegfried Z *et al.* Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell* 2010; **17**: 273–285.
- 286 Zhu J, Sammons MA, Donahue G, Dou Z, Vedadi M, Getlik M *et al.* Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature* 2015; **525**: 206–211.
- 287 Walerych D, Lisek K, Sommaggio R, Piazza S, Ciani Y, Dalla E *et al.* Proteasome machinery is instrumental in a common gain-of-function program of the p53 missense mutants in cancer. *Nat Cell Biol* 2016; **18**: 897–909.
- 288 Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 1874–1887.
- 289 Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J *et al.* p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 494–501.
- 290 Boettcher S, Miller PG, Sharma R, McConkey M, Leventhal M, Krivtsov AV *et al.* A dominant-negative effect drives selection of TP53 missense mutations in myeloid malignancies. *Science* 2019; **365**: 599–604.

- 291 Lodé L, Ameer A, Coste T, Ménard A, Richebourg S, Gaillard J-B *et al.* Single-molecule DNA sequencing of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple TP53 alterations. *Haematologica* 2018; **103**: e13–e16.
- 292 Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniong M, Ott CJ, Mitsiades CS *et al.* The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science* 2014; **343**: 305–309.
- 293 Gandhi AK, Kang J, Havens CG, Conklin T, Ning Y, Wu L *et al.* Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN.). *Br J Haematol* 2014; **164**: 811–821.
- 294 Dobrovolsky D, Wang ES, Morrow S, Leahy C, Faust T, Nowak RP *et al.* Bruton tyrosine kinase degradation as a therapeutic strategy for cancer. *Blood* 2019; **133**: 952–961.
- 295 Bykov VJN, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P *et al.* Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 2002; **8**: 282–288.
- 296 Lambert JMR, Gorzov P, Veprintsev DB, Söderqvist M, Segerbäck D, Bergman J *et al.* PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 2009; **15**: 376–388.
- 297 Wiman KG. Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 921–926.
- 298 Nahi H, Merup M, Lehmann S, Bengtzen S, Möllgård L, Selivanova G *et al.* PRIMA-1 induces apoptosis in acute myeloid leukaemia cells with p53 gene deletion. *Br J Haematol* 2006; **132**: 230–236.
- 299 Tessoulin B, Descamps G, Moreau P, Maïga S, Lodé L, Godon C *et al.* PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood* 2014; **124**: 1626–1636.
- 300 Sobhani M, Abdi J, Manujendra SN, Chen C, Chang H. PRIMA-1Met induces apoptosis in Waldenström's Macroglobulinemia cells independent of p53. *Cancer Biol Ther* 2015; **16**: 799–806.
- 301 Lehmann S, Bykov VJN, Ali D, Andrén O, Cherif H, Tidefelt U *et al.* Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 3633–3639.
- 302 Nahi H, Lehmann S, Mollgard L, Bengtzen S, Selivanova G, Wiman KG *et al.* Effects of PRIMA-1 on chronic lymphocytic leukaemia cells with and without hemizygous p53 deletion. *Br J Haematol* 2004; **127**: 285–291.

Annexes

Annexe 1: Stabilization of β -catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF- κ B target genes transcription in mantle cell lymphoma.


Annexe 2: Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia

Annexe 3: Prevalence of BTK and PLCG2 mutations in a real-life CLL cohort still on ibrutinib after 3 years: a FILO group study

Annexe 1: Stabilization of β -catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF- κ B target genes transcription in mantle cell lymphoma.



Stabilization of β -catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF- κ B target genes transcription in mantle cell lymphoma

Gregory Lazarian^{1,2,3} · Chloe Friedrich^{1,2} · Anne Quinquenel^{1,2} · Julie Tran^{1,2} · Souhail Ouriemmi^{1,2} · Elisabetta Dondi^{1,2} · Antoine Martin^{1,2,4} · Imane Mihoub^{1,2} · David Chiron⁵ · Céline Bellanger⁵ · Carole Fleury^{1,2,3} · Pascal Gélébart⁶ · Emmet McCormack⁶ · Dominique Ledoux^{1,2} · Catherine Thieblemont⁷ · Jacek Marzec⁸ · John G. Gribben⁹ · Florence Cymbalista^{1,2,3} · Nadine Varin-Blank^{1,2} · Laura Gardano^{1,2} · Fanny Baran-Marszak^{1,2,3} 

Received: 17 June 2019 / Revised: 14 January 2020 / Accepted: 23 January 2020
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

Abstract

B-cell receptor (BCR) signaling pathways and interactions with the tumor microenvironment account for mantle cell lymphoma (MCL) cells survival in lymphoid organs. In several MCL cases, the WNT/ β -catenin canonical pathway is activated and β -catenin accumulates into the nucleus. As both BCR and β -catenin are important mediators of cell survival and interaction with the microenvironment, we investigated the crosstalk between BCR and WNT/ β -catenin signaling and analyzed their impact on cellular homeostasis as well as their targeting by specific inhibitors. β -catenin was detected in all leukemic MCL samples and its level of expression rapidly increased upon BCR stimulation. This stabilization was hampered by the BCR-pathway inhibitor Ibrutinib, supporting β -catenin as an effector of the BCR signaling. In parallel, MCL cells as compared with normal B cells expressed elevated levels of WNT16, a NF- κ B target gene. Its expression increased further upon BCR stimulation to participate to the stabilization of β -catenin. Upon BCR stimulation, β -catenin translocated into the nucleus but did not induce a Wnt-like transcriptional response, i.e., TCF/LEF dependent β -catenin rather participated to the regulation of NF- κ B transcriptional targets, such as IL6, IL8, and IL1. Oligo pull down and chromatin immunoprecipitation experiments demonstrated that β -catenin is part of a protein complex that binds the NF- κ B DNA consensus sequence, strengthening the idea of an association between the two proteins. An inhibitor targeting β -catenin transcriptional interactions hindered both NF- κ B DNA recruitment and induced primary MCL cells apoptosis. Thus, β -catenin likely represents another player through which BCR signaling impacts on MCL cell survival.

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a B-cell non-Hodgkin lymphoma that remains incurable despite advances in

chemotherapy. MCL is described as a very heterogeneous disease: some patients show accumulation of tumor B cells in primary and secondary lymphoid organs while others present with a more indolent nonnodal disease associated with a leukemic phase [1, 2]. The t(11;14)(q13;32) translocation is observed in a majority of MCL cases and leads to cyclin D1 overexpression [3]. However, dysregulation of cyclin D1 is not sufficient to promote the disease and other genetic events are required for MCL development [4, 5]. For a long time MCL has been considered as a naïve B-cells neoplasm but a large study including more than 800 cases reconsidered this notion [6]. Notably, the presence of somatic hypermutation in immunoglobulin heavy chain genes (*IGHV*), of a biased *IGHV* repertoire and of stereotyped CDR3 sequences indicates an antigenic-mediated ontogenesis for several MCL cases. Hypermutated *IGHV* genes are preferentially found in indolent cases [2, 7]. The heterogeneity of both clinical outcome and biological

These authors contributed equally: Gregory Lazarian, Chloe Friedrich

These authors jointly supervised this work: Laura Gardano, Fanny Baran-Marszak

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41388-020-1183-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Nadine Varin-Blank
nadine.varin@inserm.fr

✉ Fanny Baran-Marszak
fanny.baran-marszak@aphp.fr

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 6 February 2020

OPEN ACCESS

parameters among MCLs suggest the implication of a number of signaling pathways in lymphoma evolution.

Gene expression profiling of MCL compared with normal naïve B cells revealed that effectors of the PI3K-AKT and of the WNT signaling pathways were overexpressed in MCL cells [8, 9]. In addition, about half of MCL tumors displayed accumulation of nuclear β -catenin suggesting its transcriptional activation [10]. However, the mechanisms underlying β -catenin nuclear accumulation and transcriptional implication remain fragmentary in MCL. The WNT/ Frizzled/ β -catenin pathway is implicated in differentiation, migration, and proliferation process in many cell types and is altered in a number of carcinoma [11]. At the membrane, β -catenin interacts with cadherins and α -catenin. In absence of WNT-mediated activation, the cytosolic pool of β -catenin is maintained at low levels through a proteasome degradative process via a APC/Axin/ GSK-3 β complex [12]. WNT refers to a family of secreted glycoproteins that generate canonical signaling upon binding to members of the Frizzled family of receptors. Binding of WNT proteins to their cognate receptors leads to the inhibition of the degradation process resulting in β -catenin stabilization. According to this canonical mechanism, the stability of β -catenin is largely dependent on its phosphorylation status. GSK-3 β phosphorylates β -catenin at sites important for degradation, while WNT signaling inhibits GSK-3 β kinase activity, which results in β -catenin stabilization (reviewed in [13]). GSK-3 β kinase activity is also inhibited by signals emanating from PI3K/AKT or PKC (α , β , γ) [14–16] leading to cell survival and proliferation. Stabilized β -catenin partly translocates into the nucleus where it interacts with the TCF/LEF family of transcription factors inducing expression of target genes among which *Axin2*, *MYC*, and *cyclin D1* [17–20], (<http://web.stanford.edu/~musse/pathways/targets.html>).

We previously showed that B-cell antigen receptor (BCR) dependent pathways are key regulators of MCL cells survival in peripheral blood [21]. Downstream effectors include transcription factors such as NF- κ B that controls expression of several antiapoptotic factors and pro-survival cytokines, i.e., IL-6, IL8, or IL1 β [22]. BCR-mediated signals also activate PI3K and AKT leading to GSK3 inhibitory phosphorylation (reviewed in [23]). In the murine B-cell lymphoma WEHI-231, BCR triggering initiated a PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway stabilizing β -catenin [16]. Both BCR- and PI3K- pathways are constitutively activated in MCL and contribute to GSK-3 β inhibition and β -catenin stabilization [7, 8, 24].

In this study we investigated the mechanisms underlying β -catenin stabilization in MCL cells upon BCR stimulation. We identified β -catenin as a downstream effector of the BCR signaling, which is rapidly stabilized upon BCR triggering and translocates into the nucleus. Interrupting this pathway

by therapeutic compounds, such as the BTK inhibitor Ibrutinib, hampered the stabilization of β -catenin. Long-term BCR stimulation resulted in the production of WNT16 ligand that further contributed to β -catenin stabilization. Into the nucleus, β -catenin transcriptional activity was not directed toward canonical WNT regulated genes, but rather triggered NF- κ B targets. The inhibition of β -catenin interaction with its transcriptional partners impacted cell survival.

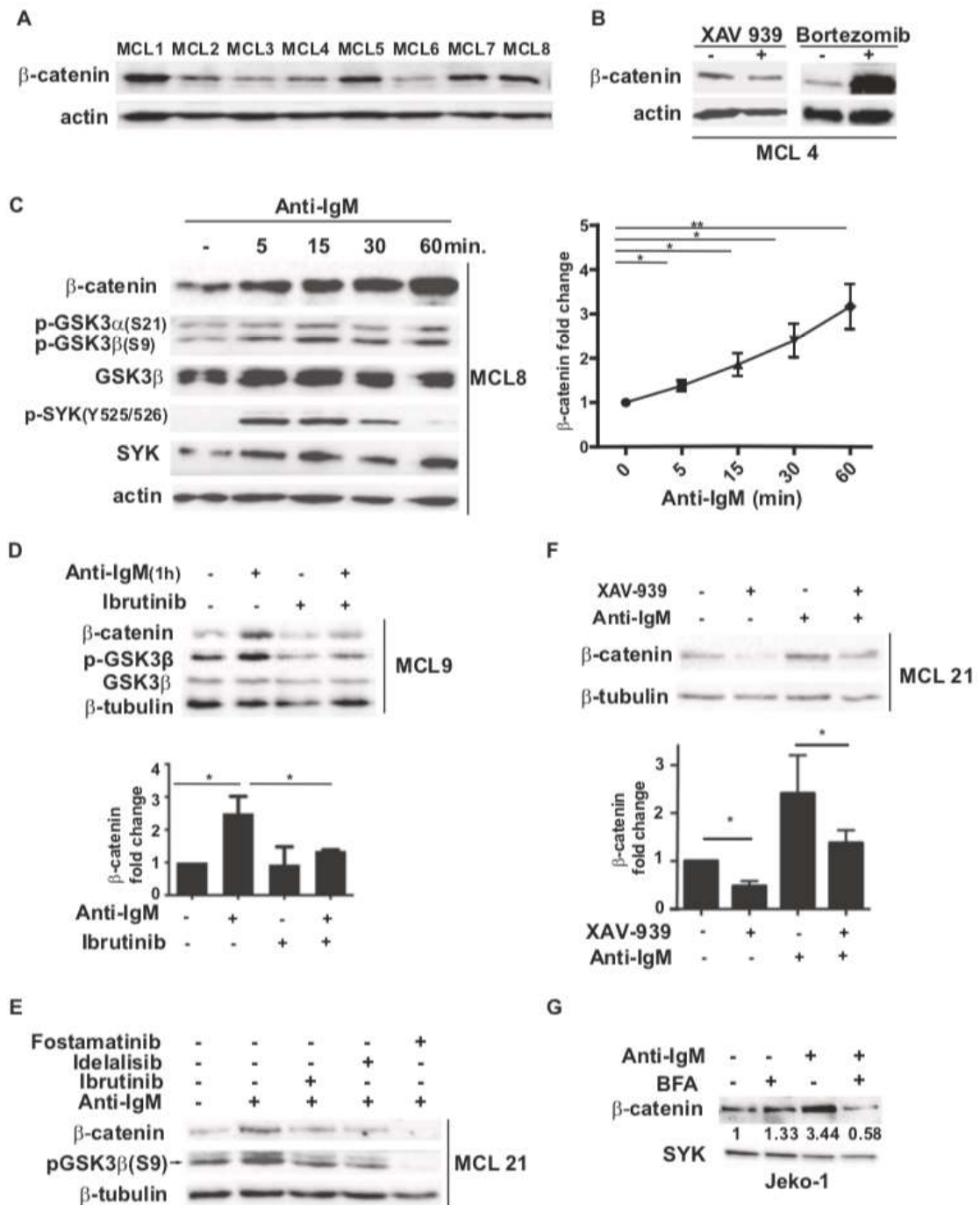
Results

BCR stimulation stabilizes β -catenin in MCL cells

It has been previously shown in MCL cell lines and in paraffin-embedded MCL tumors a stabilization and a nuclear accumulation of β -catenin [10]. Nevertheless, the dynamics of the translocation and the nuclear function of β -catenin remained unclear in MCL cells.

We first investigated the expression of β -catenin in peripheral blood MCL lymphocytes (Fig. 1a). Despite variability in the level of expression, β -catenin was detected in MCL cells of all patients tested. Since the steady state level of β -catenin depends on the activity of the destruction complex [12] we treated MCL primary cells with the compound XAV-939 that stabilizes Axin and favors the activity of the degradation complex. In such conditions, we observed a decrease of β -catenin in primary cells (Fig. 1b). On the contrary, treatment with a proteasome inhibitor, bortezomib (PS-341, Velcade) induced a strong increase of β -catenin levels in both primary cells and MCL cell lines (Fig. 1b, Supplementary Fig. 1a), indicating that the degradation complex and the proteasome participate in the regulation of the steady state levels of β -catenin in MCL cells.

BCR engagement was also described to induce the accumulation of β -catenin via a PI3K/AKT/GSK-3 β pathway [25]. We sought to verify in MCL cells whether BCR stimulation, in addition to the chronic BCR-mediated activation, could further increase the level of β -catenin. BCR triggering, which induced Y525/526 phosphorylation of the SYK kinase, increased β -catenin level within 5 min suggesting a rapid inhibition of its degradation. The increase of β -catenin was sustained over 60 min of anti-IgM exposure (Fig. 1c left and right panels). β -catenin accumulation upon BCR stimulation was also observed in Maver and Granta-519 MCL cell lines (Supplementary Fig. 1b and c). In parallel, the phosphorylated form of GSK-3 β (pS9) increased upon 5 min of BCR stimulation and remained phosphorylated after this time point, indicating the kinase inhibition in an AKT dependent manner (Fig. 1c left and Supplementary Fig. 1d). The increase of p-S9 GSK-3 β upon BCR stimulation indicated that the stabilization of β -catenin



occurs as a result of the inhibition of its phosphorylation. Pretreatment with the BTK inhibitor, Ibrutinib, hampered BCR-induced phosphorylation of GSK3 β and β -catenin stabilization (Fig. 1d top and bottom panels). We reproduced the Ibrutinib dependent decrease of β -catenin even when we treated primary MCL cells with a clinically relevant concentration of this BTK inhibitor (100 nM) prior to BCR stimulation (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1e).

Since BCR stimulation activates PI3K, which is responsible of BTK anchoring to the cell membrane and SYK, which phosphorylates BTK, we inhibited these kinases either by Idelalisib or Fostamatinib respectively, to assess their role in β -catenin stabilization. Both inhibitors impacted negatively on β -catenin level, implying that SYK and PI3K are involved in β -catenin stabilization upon BCR stimulation (Fig. 1e). These findings confirmed that β -catenin

◀ **Fig. 1 BCR-mediated stabilization of β -catenin in primary MCL cells.** **a** Western blot analysis of PBMCs cell extracts from eight MCL patients to detect β -catenin. Actin was also detected and used as loading control. **b** PBMCs were treated (+) or not (-) with XAV-939 (20 μ M, 4 h) or Bortezomib (10 nM, 2 h) ($n=2$) and the level of β -catenin was analyzed. Actin was used to verify equal loading of the protein extracts. **c** PBMCs were stimulated with 10 μ g/ml F(ab)'2 anti-IgM antibody for the indicated times. Total protein extracts were analyzed with the indicated antibodies (Left panel). Membranes were reprobated with anti-GSK-3 β (total), anti-SYK (total), and anti-actin antibodies. β -catenin levels at each time point were quantified by densitometry relative to Actin levels and to unstimulated cells. The mean \pm SEM is indicated ($n=6$ MCL cell extracts, Right panel). **d** PBMCs were pretreated or not with Ibrutinib (7 μ M, 90 min) prior to BCR stimulation (+) or not (-) with 10 μ g/ml F(ab)'2 anti-IgM Ab. Western blot analysis (upper panel) and densitometric quantification of β -catenin (lower panel) were similar to (c) ($n=3$). **e** Primary PBMC from MCL patients were pretreated or not with Ibrutinib (100 nM), Idelalisib (1 μ M), or Fostamatinib (2 μ M) for 1 h prior to stimulation with 10 μ g/ml F(ab)'2 anti-IgM Ab for 1 h. β -catenin was detected with a specific antibody and β -tubulin was used as loading control. The image is representative of three independent experiments. **f** Primary PBMC from MCL patients were treated or not with XAV-939 (20 μ M) prior to stimulation with 10 μ g/ml F(ab)'2 anti-IgM Ab for 24 h. β -catenin was detected as in the previous panels, β -catenin levels at each condition were quantified by densitometry of β -catenin relative to β -tubulin level (Lower panel) ($n=3$). **g** Jeko-1 cells were stimulated (+) or not (-) for 6 h with F(ab)'2 anti-IgM (10 μ g/ml) and, where indicated, Brefeldin A (10 μ g/ml) was added for the last 4 h of stimulation. Total cell extracts were analyzed for β -catenin expression. Quantitation is relative to unstimulated and untreated cells. Significance was determined by Student's t test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

stabilization depends on BCR stimulation. Interestingly, while pY525 SYK decreased after 30 min of stimulation (Fig. 1c and [22]), the elevated level of β -catenin persisted beyond this time. Even after 24 h we found that β -catenin remains consistently higher than in nonstimulated conditions, albeit the difference did not reach statistical significance. XAV-939 treatment decreased significantly β -catenin both in unstimulated and stimulated cells for 24 h (Fig. 1f up and down) and Supplementary Fig. 1g). Importantly, XAV-939 treatment did not affect cell survival nor it altered the BCR-dependent apoptosis inhibition as verified by Annexin V labeling followed by flow cytometry (Supplementary Fig. 1f). When Brefeldin A was added to block all cell secretions in MCL cell lines, the long-term stabilization of β -catenin was no longer observed (Fig. 1g and Supplementary Fig. 1h). This observation indicates that a soluble factor present in the medium upon BCR stimulation might contribute to the stabilization of β -catenin in long-term BCR stimulation.

β -catenin translocates to the nucleus upon BCR engagement

Following the canonical WNT signaling pathway, the stabilization of β -catenin triggers its nuclear translocation and

the interaction with the TCF/LEF family of transcription factors. Therefore, we investigated whether the BCR-mediated stabilization of β -catenin modifies its subcellular localization. Primary MCL cells, Maver and Granta-519 cell line, were stimulated for 1 h with anti-IgM antibody and cells were subjected to cell fractionation. β -catenin was detected in both cytosolic and nuclear fractions and BCR stimulation resulted in β -catenin stabilization in both fractions (Fig. 2a and Supplementary Fig. 2a). Using confocal microscopy, we confirmed a nuclear accumulation of β -catenin upon BCR stimulation. While staining of β -catenin was essentially cytoplasmic in unstimulated cells, BCR stimulation triggered β -catenin translocation into the nucleus (Fig. 2b). The nuclear localization of β -catenin prompted us to inquire its transcriptional activity. In the majority of cell types, in the WNT-canonical pathway β -catenin interacts with the TCF/LEF family of transcription factor to induce the transcription of *Axin2*, *CCND1*, *MYC*, and *LEF1* among others. Stimulation of MCL primary cells with anti-IgM for 4 h did not induce the transcription of the WNT-dependent target genes *Axin2* and *LEF1* but induced *MYC*, a well-known BCR downstream target [26], and repressed *CCND1/cyclin D1* expression (Fig. 2c). Noteworthy, the transcriptional effect was confirmed at the protein level for MYC but not for Cyclin D1 that remained unchanged after stimulation (Supplementary Fig. 2B). These results show that BCR-dependent stabilization of β -catenin does not elicit a WNT-like, TCF-dependent transcriptional activity in MCL cells.

WNT16 is overexpressed in MCL and participates in β -catenin stabilization

Since high level of β -catenin persisted over a long-term BCR stimulation even after the dephosphorylation and inactivation of the BCR effectors prompted us to search for a secreted factor that could stabilize β -catenin in an autocrine fashion. As the canonical WNT-mediated pathway is best known to stabilize β -catenin, we undertook a transcriptomic approach to assess the WNT ligands that are transcribed by MCL cells in the presence and absence of BCR stimulation for 3 h. We evidenced in MCL cells the expression of several members of the WNT family, among them the higher expression level was observed for WNT10A, WNT16, and WNT3 and their cognate receptors of the Frizzled family (Supplementary Table 2 and Fig. 3a). Interestingly, only WNT16 was significantly induced upon 3 h of BCR stimulation (Fig. 3a). RT-qPCR evaluation confirmed the expression of high amount of WNT16 mRNA in a number of primary MCL cells as compared with the physiological counterpart of CD5+ B cells from normal umbilical cord used as control (NCB) (Fig. 3b). Western blot analysis showed a BCR-dependent increase of WNT16

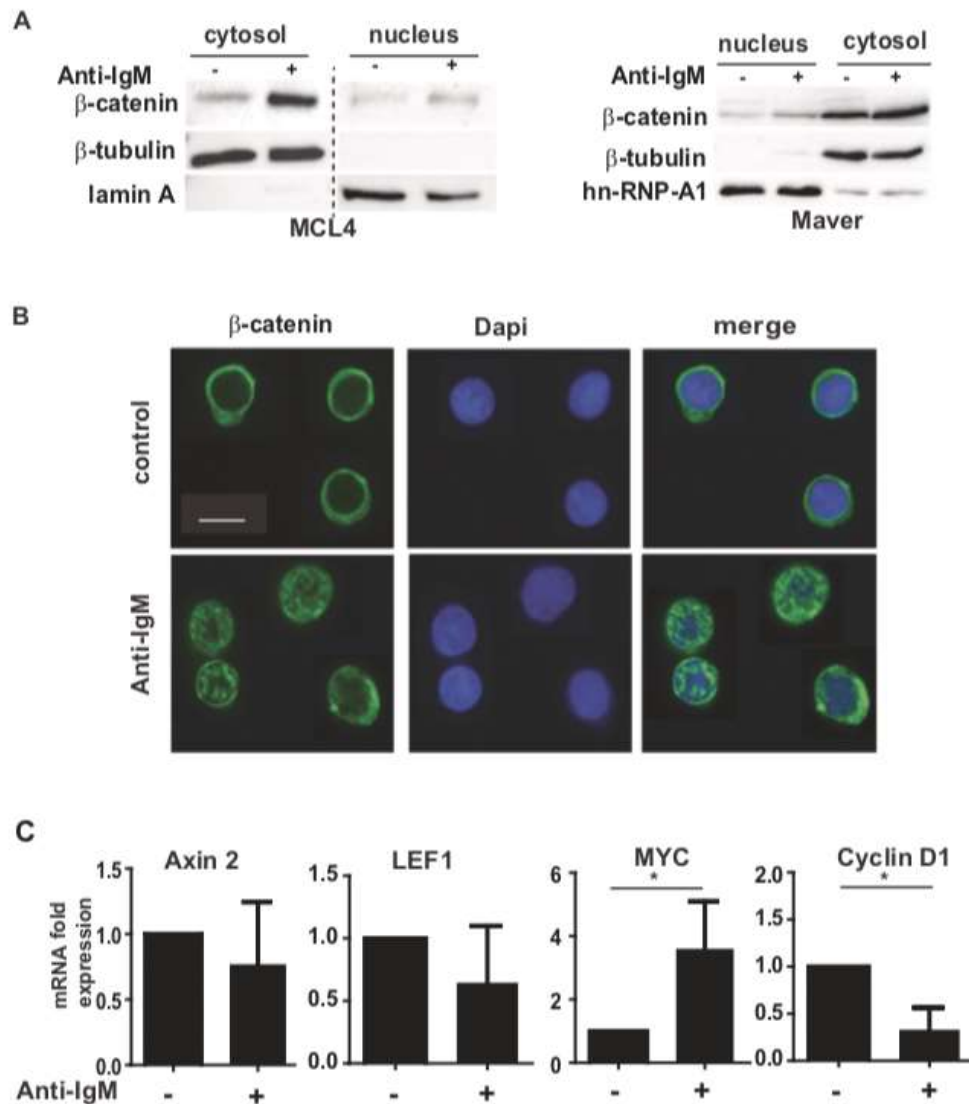
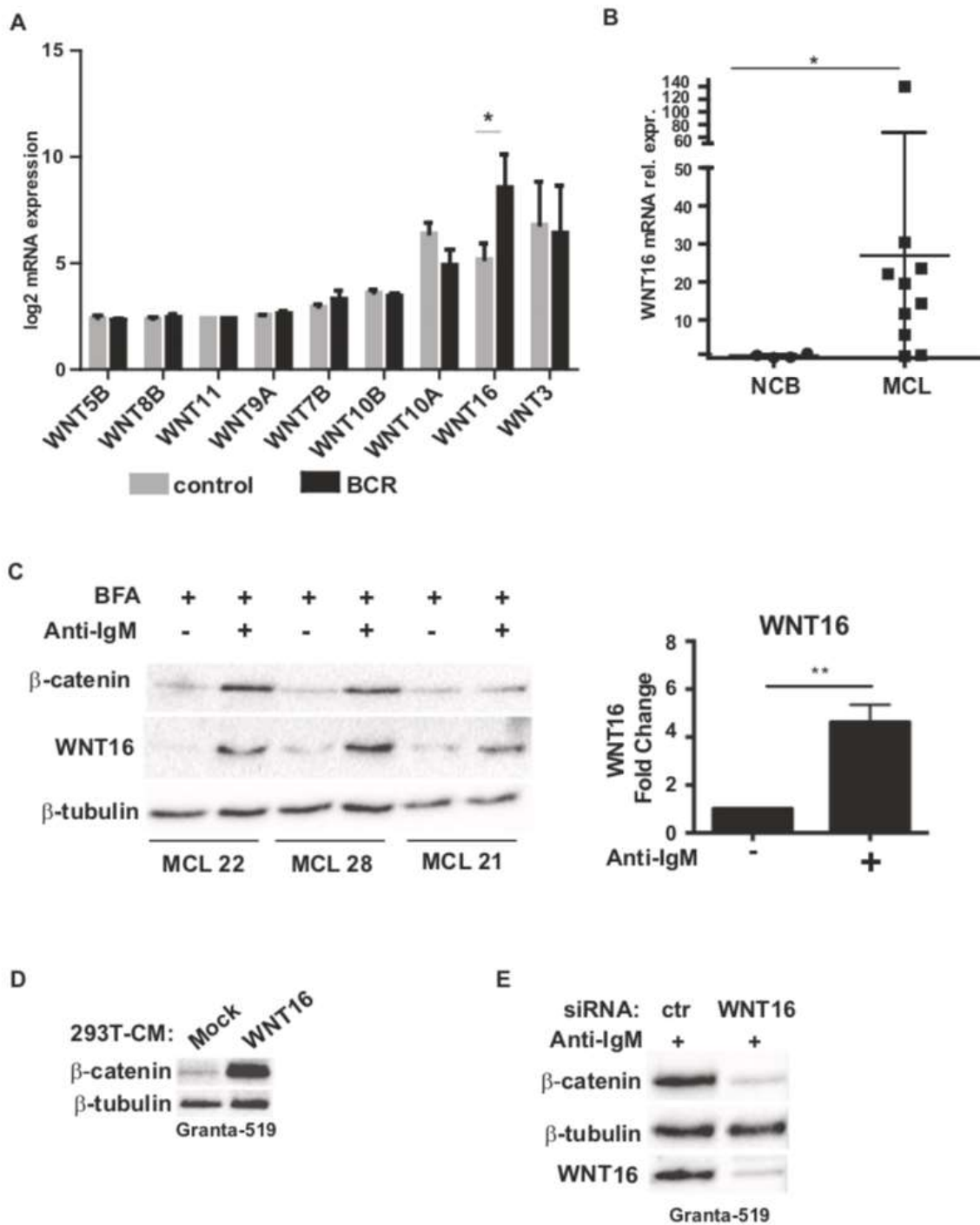


Fig. 2 BCR engagement induces β -catenin stabilization and nuclear translocation. **a** Cell fractionation. Primary PBMCs (MCL4) and Maver cell line were stimulated (+) or not (-) with 10 μ g/mL of soluble F(ab)'2 anti-IgM for 1 h. Cytosolic and nuclear fractions were prepared and analyzed by immunoblotting with the indicated Abs. β -tubulin and Lamin A were used to verify the purity of the cytoplasmic and nuclear fractions respectively. The figure is derived from the same gel and the dotted line represents the omitted lanes. The image is representative of two independent experiments. **b** Immunofluorescence. Primary PBMCs (MCL9) were stimulated (F(ab)'2 anti-

IgM, 1 h, 10 μ g/mL) or not (control). Confocal microscopy was performed using Alexa-488 coupled anti- β -catenin and Dapi to label nuclei. A minimum of 20 cells were analyzed. The scale bar corresponds to 10 μ m. **c** RT-qPCR to assess the transcriptional activity of β -catenin. PBMCs from MCL patients were stimulated (+) or not (-) with soluble F(ab)'2 anti-IgM antibody (10 μ g/ml, 4 h). Total RNAs were extracted and the indicated TCF/LEF target genes were analyzed. Data represent fold differences to unstimulated samples (mean \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$, $n = 6$). The housekeeping genes used were *ABL1* or *HPRT1*. Significance was determined by Student's *t* test: * $p < 0.05$.

in primary MCL cells treated with Brefeldin A to block cellular secretion (Fig. 3c left and right and Supplementary Fig. 2D). We hypothesized that WNT16 secretion is one of the factors that can contribute to the high level of β -catenin in MCL cells upon BCR stimulation. To confirm that WNT16 is able to elicit an increase of β -catenin, we transfected HEK293T cells with a WNT16-expressing plasmid or a control plasmid. The overexpression of WNT16 in HEK293T cells increased β -catenin level confirming that

this ligand is secreted by the transfected cells (Supplementary Fig. 2E). Next, we used the conditioned media issued from these cells to stimulate Granta-519 cells. The treatment of Granta-519 cells for 6 h with the WNT16 enriched medium strongly increased β -catenin levels as compared with the control medium (Fig. 3d). To confirm the dependence of β -catenin stabilization on WNT16 secretion upon BCR stimulation, we transfected Granta-519 cells with a pool of three specific RNA



sequences that target WNT16 mRNA. A control siRNA sequence was used to exclude off-target effects. Along with the knock down of WNT16, the decrease of β -catenin was also observed by western blot arguing for the role of WNT16 on the regulation of β -catenin stability following BCR stimulation (Fig. 3e).

All these results confirmed that WNT16 is highly expressed in MCL cells. Its expression is further induced

upon BCR signaling and can contribute to β -catenin stabilization in an autocrine fashion.

β -catenin participates in the transcription of NF- κ B regulated genes

The absence of WNT-like transcriptional activity of β -catenin in MCL cells prompted us to determine

◀ **Fig. 3 MCL cells express WNT16 ligands that contribute to β -catenin stabilization.** **a** Transcriptomic analysis of primary MCL cells stimulated (BCR) or not (control) with anti-IgM at 10 μ g/mL for 4 h. Data show the mean of four different MCL primary cells samples and error bars represent SEM. Statistical analysis was performed with paired sample Student's *t* test: **p* < 0.05. **b** RT-qPCR to detect WNT16 transcript in MCL cells and in B cells from normal umbilical cord (NCB). **c** Left, primary MCL cells (*n* = 3) were stimulated (+) or not (−) with F(ab)'2 anti-IgM (10 μ g/mL) for 16 h and treated with Brefeldin A (10 μ g/mL) for the last 4 h. Total cell extracts were analyzed by western-blotting with mouse anti-WNT16 Ab and anti- β -catenin. Tubulin was used as loading control and normalizing factor in the densitometric analysis (Right panel). Quantitation is relative to unstimulated cells. Significance was determined by Student's *t* test: ***p* < 0.01. **d** Granta-519 cells were incubated for 6 h with the conditioned medium issued from HEK293T cells transfected with the empty- or WNT16-expressing plasmid analyzed in (Supplementary Fig. 2E). Expression of β -catenin and WNT16 in Granta-519 was detected by immunoblotting with the indicated Abs. **e** Granta-519 cells were transfected with a pool of siRNA sequences to knock down WNT16 expression or a nontargeting siRNA sequence used as a control. Expression of WNT16 and β -catenin expression were verified by western blot as previously described. β -tubulin was used as loading control.

whether β -catenin participates in NF- κ B-mediated transcription of the different cytokines and factors as described in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) [27]. We previously showed that BCR signaling induces NF- κ B-dependent expression of proliferative and inflammatory cytokines, e.g., IL-6, IL-8, and IL-1 β [22]. Indeed, mRNA expression of *IL-6* and *IL-1 β* decreased upon treatment with XAV-939 that induces β -catenin degradation (Fig. 4a). The transcription of *IL-8* shows a tendency to decrease with XAV-939 although it is not statistically significant in the cohort of patients used to perform this analysis (Fig. 4a). In agreement with the transcriptional control of *IL-6* expression, treatment of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from MCL patients with XAV-939 hindered the stimulation-dependent increase of the protein in leukemic cells as observed by flow cytometry (Fig. 4b, c). To further confirm the role of β -catenin in *IL-6* induction, we transfected Jeko-1 cells with a plasmid carrying the coding sequence of *CTNNB1* and confirmed its overexpression by RT-qPCR (Supplementary Fig. 2C). β -catenin overexpression significantly induced *IL-6* transcription (Fig. 4d). As *WNT16* is a NF- κ B target gene, we inquired whether β -catenin is involved in its transcriptional regulation in primary MCL cells. By RT-qPCR we observe that XAV-939 treatment decreases *WNT16* expression both in presence and absence of BCR stimulation for 4 h (Fig. 4e).

Following BCR engagement, *WNT16* maintains the high level of β -catenin. To investigate the transcriptional outcome of *WNT16* dependent stabilization of β -catenin, we performed a RT-qPCR in primary cells stimulated for 6 h by conditioned medium containing *WNT16* and we observed the induction of *IL-6* and *IL1 β* transcription. Interestingly,

in these conditions β -catenin still does not participate to a TCF-dependent transcription as *Axin2* mRNA remains unchanged upon *WNT16* stimulation (Fig. 4f).

Overall these results show that β -catenin participates in the regulation of NF- κ B target genes such as *IL-6*, known to increase the survival of MCL cells and *WNT16* which is involved in the β -catenin stabilization in these cells.

β -catenin is present at promoter sequences specific for NF- κ B

To verify whether BCR stimulation modulates β -catenin presence on NF- κ B DNA binding sequence, we undertook an oligo pull-down approach with a biotinylated NF- κ B consensus DNA sequence [28] using nuclear extracts of cells that have been stimulated with a soluble F(ab)'2 anti-IgM antibody. p65 NF- κ B and β -catenin were detected in the oligonucleotide precipitate in Granta-519 without BCR stimulation, in agreement with the constitutive BCR activation in these cells. Both proteins were present in larger amounts in both the nuclear cell extract and the precipitate after BCR stimulation (Fig. 5a). The specificity of the interaction between the proteins and the DNA was confirmed using the identical non-biotinylated oligonucleotide in a competitive experiment. When an excess of the competitor oligonucleotide was incubated with the nuclear extract neither NF- κ B nor β -catenin were detected in the precipitate. Importantly, while the interaction of NF- κ B with the biotinylated oligonucleotide was confirmed in primary MCL cells, β -catenin was only detected in the precipitate upon BCR stimulation (Fig. 5a).

To assess that β -catenin is present at the NF- κ B binding region present on *IL-6* promoter [29], we performed chromatin immunoprecipitation with a specific β -catenin antibody and rabbit IgG as a negative control in cells previously stimulated with a soluble anti-IgM for 1 h. The precipitate with the β -catenin antibody contained significantly higher amount of DNA containing the NF- κ B binding region as compared with the IgG control (Fig. 5b). To verify the specific binding to the promoter region, the immunoprecipitates by the β -catenin antibody were subjected to another PCR using either a primer pair to amplify a region in the ORF or in the 3'-UTR of the *IL-6* gene. For both primers pairs, the enrichment over the IgG control was lower than for the promoter region containing the NF- κ B binding sequence (Supplementary Fig. 3A).

To assess whether in MCL cells β -catenin and NF- κ B p65 can interact, we undertook a co-immunoprecipitation approach in Maver cell line stimulated with a soluble anti-IgM for 1 h. In the immunoprecipitate with an antibody anti-NF- κ B p65 we detected β -catenin by immunoblot indicating that the two proteins belong to the same molecular complex to regulate gene expression (Fig. 5c).

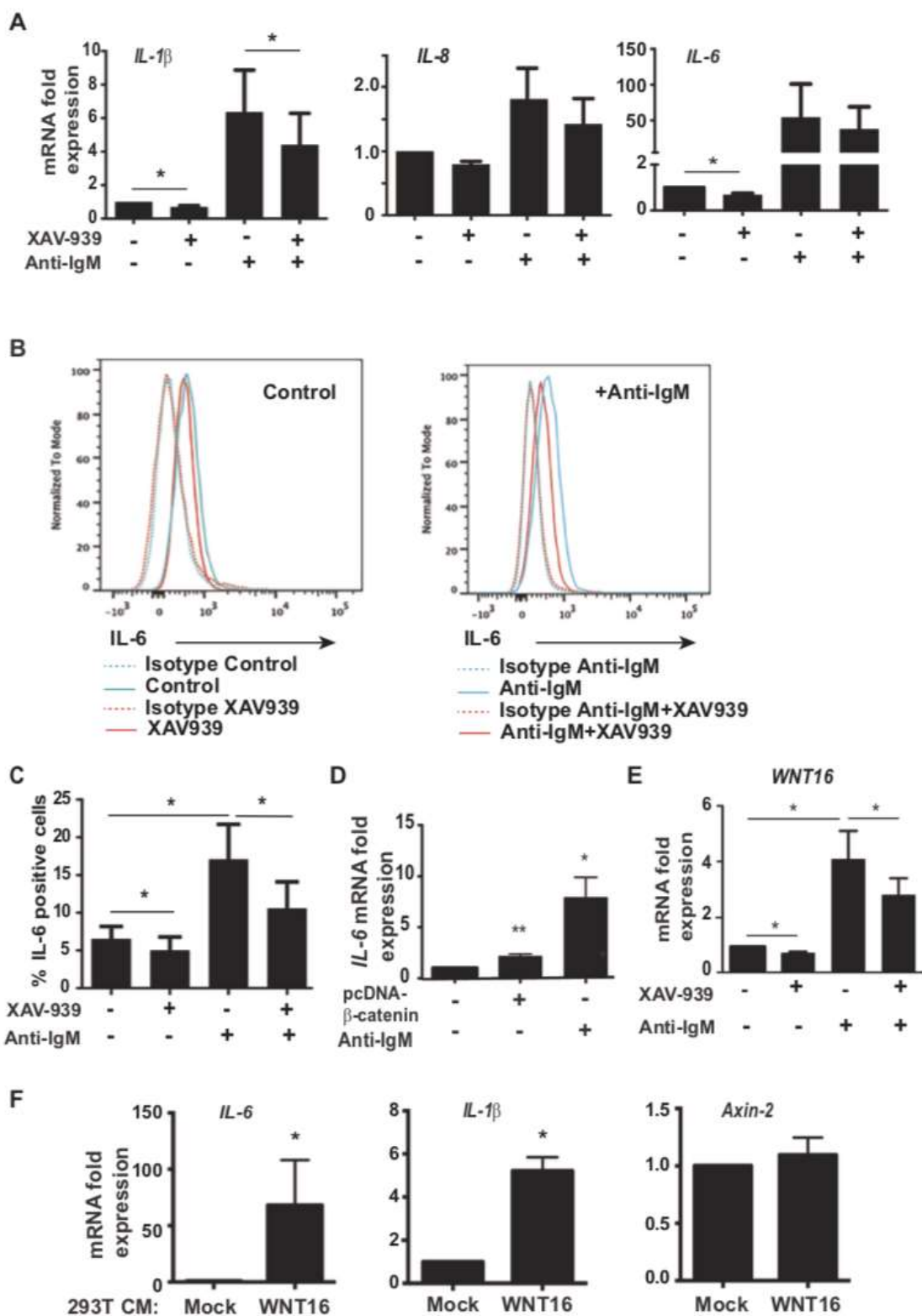


Fig. 4 β -catenin is involved in non-TCF-dependent transcription. **a** PBMCs from MCL patients were treated (+) or not (–) with XAV-939 (20 μ M) for 4 h, total RNA was extracted and modulation of *IL8*, *IL1 β* , and *IL6* was analyzed by RT-qPCR relative to nontreated cells. Data represent mean \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalized to the mRNA of the housekeeping genes *HPRT1* or *ABL*. Significance was determined by Wilcoxon-signed rank test $*p < 0.05$ ($n = 6$ for *IL-6* and *IL-8* $n = 5$ for *IL-1 β*). **b** PBMCs from 6 MCL patients were treated (+) or not (–) with XAV-939 (20 μ M) for 90 min prior to BCR stimulation or not for 15 h with soluble F(ab) $'$ 2 anti-IgM (10 μ g/ml). Intracellular IL-6 was detected by flow cytometry. CD19 and CD5 were used to discriminate MCL cells. Gating of IL-6 positive cells was placed according to the control isotype. The figure shows a representative result (MCL9) of a flow cytometry histogram of control untreated cells (left) and stimulated anti-IgM cells (right). **c** The percentage of IL-6 positive cells among the CD19 $^{+}$ cells is presented (mean \pm SEM, $n = 6$ MCL patients). Significance was determined by the Wilcoxon-signed rank test, $*p < 0.05$. **d** Jeko-1 cells were transfected with a β -catenin expressing plasmid for 24 h, total RNA was extracted and RT-qPCR of *IL-6* was analyzed. As controls *IL-6* expression was evaluated in cells transfected with a control plasmid and in cells stimulated with soluble F(ab) $'$ 2 anti-IgM (10 μ g/ml) for 4 h. **e** PBMCs from MCL patients were treated (+) or not (–) with XAV-939 (20 μ M) for 4 h, total RNA was extracted and modulation of *WNT16* expression was analyzed by RT-qPCR relative to nontreated cells. **f** PBMC from MCL patients were incubated for 4 h with a conditioned medium issued from HEK293T transfected with an empty plasmid or a plasmid carrying *WNT16* gene. RT-qPCR on *IL-6*, *IL-1 β* , and *Axin2* transcripts was performed. For all the RT-qPCRs the data represent mean \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalized to the mRNA of the housekeeping genes *HPRT1*. Significance was determined by the Wilcoxon-signed rank test $*p < 0.05$ $**p < 0.01$ ($n = 6$).

Inhibition of β -catenin-mediated transcription induces apoptosis and inhibition of tumor growth in vivo

Finally, since both BCR stimulation and NF- κ B regulated genes contribute to MCL cell survival we investigated whether inhibitors that proved efficacy in the disruption of the TCF- β -catenin complex might also impact β -catenin/NF- κ B cooperation. PKF118-310 inhibitor alters the interaction between β -catenin and TCF7L2 to inhibit TCF-dependent transcriptional activity [30] but, its impact on the interaction of β -catenin with other partners has not been investigated. In Granta-519 cells PKF118-310 treatment did not impact the complex observed on NF- κ B consensus oligonucleotide in basal conditions but hindered the higher recruitment of both β -catenin and NF- κ B upon BCR stimulation (Fig. 5d). We also analyzed the impact of this inhibitor on the BCR-dependent survival response of MCL cells. First, analyzing the apoptotic response to various doses of the inhibitor, a minimal cytotoxicity was observed in healthy control cells up to 1 μ M of PKF 118-310 for 24 h while tumor primary cells were already sensitive to 500 nM treatment (Supplementary Fig. 3B). This dose was used to measure the apoptotic rate in a series of primary MCL cells. As shown in Fig. 5e, PKF118-310 treatment increased

apoptosis in unstimulated cells and blocked the survival response induced by BCR stimulation. Furthermore, PKF118-310 also affected MCL tumor growth in vivo. JeKo-1 cells were injected subcutaneously in NOD/SCID IL2 γ null (NSG) mice. Tumor growth was monitored every other day upon intratumoral injection after 4 days of either vehicle (PBS, 0,1% DMSO; $n = 3$) or PKF118-310 (0.4 mg/kg in vehicle solution, $n = 3$) solution. PKF118-310 treatment greatly inhibited tumor growth already after 4 days of treatment (day 8) while body weight remained constant under such conditions (Fig. 5f and Supplementary Fig. 3C and 3D). These results indicate that inhibition of β -catenin-mediated transcriptional activity impacts MCL cell survival.

Discussion

β -catenin is involved in a number of human solid tumors [11] and B-cell malignancies [31, 32]. An earlier study described a nuclear accumulation of β -catenin in a number of tumor biopsies [10]. The present analysis demonstrates, in circulating primary MCL lymphocytes, that β -catenin also behaves as an effector of the BCR signaling pathway. Upon antigenic stimulation β -catenin is rapidly stabilized and partly localized into the nucleus. The BCR-dependent stabilization of β -catenin involves downstream effectors such as the BTK kinase and the phosphorylation of GSK3 β at the S9 inhibitory residue. Indeed, the inhibition of BTK by Ibrutinib leads to a reduction of S9-phosphorylated GSK3 β which results in a decrease of β -catenin. Inhibition of both PI3K δ by Idelalisib and SYK by R406 also decrease the phosphorylated form of GSK3 β leading to a decrease of β -catenin. These results are in agreement with a current model whereby BCR stimulation activated PI3K and SYK for the recruitment and phosphorylation of BTK, respectively [33]. Activated BTK kinase phosphorylates AKT, which in turn leads to the phosphorylation of GSK3 β at the S9 inhibitory residue [16, 34]. A synergistic effect of Idelalisib and Ibrutinib was reported on the adhesive ability of CLL and MCL cells to the microenvironment cells [35]. Since membrane β -catenin is able to stabilize cell adhesion structures in multiple cell types, one can hypothesize that a similar role is possible in MCL cells and that it can be targeted by combination of BCR associated kinases inhibitors. Noteworthy, SYK and BTK activations, as seen by their phosphorylation status, are transient, whereas β -catenin stabilization persists as long as BCR stimulation is applied. This differential timing suggests that BCR-mediated signals initiate a rapid stabilization of β -catenin, while another mechanism might take place to maintain the stability of the protein in the long term. Indeed, our transcriptomic approach showed the production of a number of WNT ligands in MCL cells. Among those, only WNT16

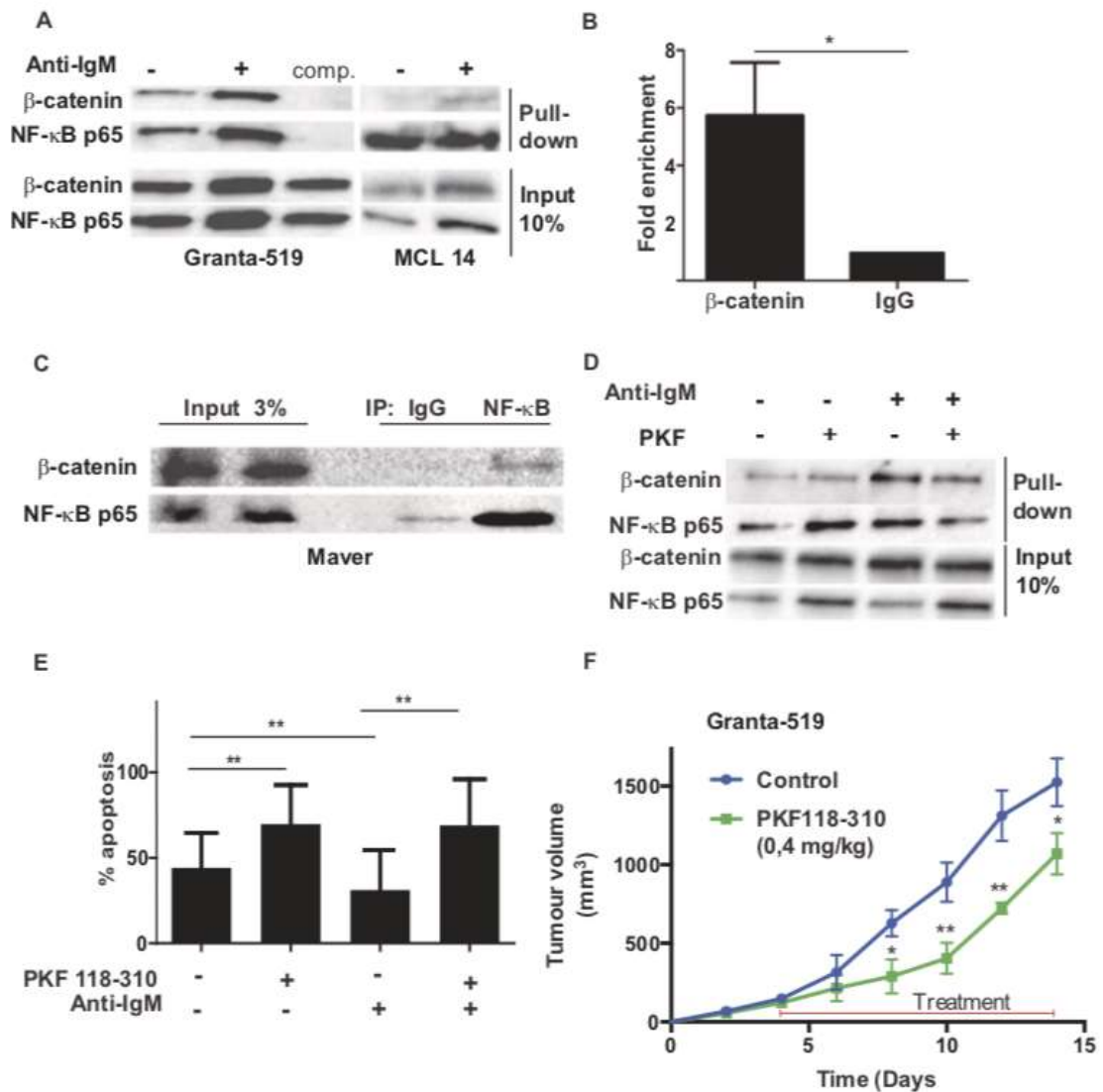


Fig. 5 β -catenin participates to a complex at NF- κ B consensus DNA sequence. **a** Oligo pull-down assay in Granta-519 cell line (Left panel) and primary cells (Right panel). Extracts from unstimulated (–) or anti-IgM stimulated (+) cells were precipitated with a biotinylated oligonucleotide corresponding to NF- κ B consensus DNA sequence. Presence of β -catenin and NF- κ B (p65) in the precipitate was analyzed with the indicated antibodies. Specificity was verified by the addition of an excess (20 \times , comp.) of the same non-biotinylated oligonucleotide during the pull-down experiment. 10% of the initial total extracts were also analyzed with the same Abs. The image is representative of a minimum of three independent pull-downs. **b** Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). Anti-IgM stimulated Granta-519 cell extracts were immunoprecipitated with anti- β -catenin specific Ab or rabbit IgG as a negative control. Primers around the NF- κ B binding site present on IL-6 promoter (IL-6) were used to amplify to detect the DNA in the immunoprecipitate. The fold enrichment was calculated as ratio of $2^{-\Delta\Delta CT}$ values of the immunoprecipitate with anti- β -catenin and rabbit IgG control. The histogram represents the mean \pm SEM of four independent

ChIP assays. **c** Maver cells were stimulated with anti-IgM and protein cells lysates were subjected to immunoprecipitation using either isotype anti-IgG or anti-NF- κ B antibodies. The immunoprecipitated fractions were analysed by western blot with anti- β -catenin or anti-p65 NF- κ B antibodies. **d** Granta-519 cells were treated 90 min (+) or not (–) with PKF 118-310 (5 μ M) prior to BCR stimulation (1 h,+) or not (–). An oligo pull-down assay was then realized as in (a) with a biotinylated NF- κ B DNA consensus sequence in presence of PKF118-310 (5 μ M). The image is representative of three independent pull-downs. **e** Apoptosis (% of Annexin V/PI positive cells) was measured by flow cytometry on PBMCs from seven MCL patients treated (+) or not (–) with PKF 118-310 (5 μ M) prior to BCR stimulation or not with soluble anti-IgM for 24 h. **f** NSG mice subcutaneously grafted with Jeko-1 cells were treated after 4 days by intratumoral injection of either a vehicle solution (PBS, 0,1% DMSO, control) or PKF118-310 (0,4 mg/kg in vehicle solution) every day. Tumor volumes (mm³) were measured by a digital calliper every other day. Data represent mean \pm SEM ($n = 3$). Significance was determined by Student's t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

was upregulated upon BCR triggering. A role for WNT16 has already been described in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment [36, 37]. WNT16 is a NF-

κ B target gene transcribed by stromal cells in the tumor microenvironment following genotoxic stress and it promotes therapy resistance and cancer progression [36]. Our

results showed that MCL cells produce WNT16 and they can respond to it by stabilizing β -catenin. Thus, WNT16 represents one of the soluble factors that is secreted following BCR stimulation and that can maintain high level of β -catenin in an autocrine/paracrine fashion.

Despite the stabilization and nuclear translocation of β -catenin upon BCR stimulation, similar to the canonical WNT signaling, its transcriptional outcome is different as there is no transcription of TCF/LEF target genes, such as *Axin2* and *LEF1*. A similar TCF-independent mechanism was described in primary mature T lymphocytes whereby TCR stimulation led to β -catenin accumulation without triggering a TCF-dependent transcriptional activity [38]. In contrast, Christian et al. showed in immature B-cell lines that BCR stimulation induces β -catenin stabilization and the activation of TCF/LEF transcriptional activity [16]. Thus, in line with our results in MCL mature B lymphocytes one can hypothesize that, depending on the state of differentiation of the cells, BCR or WNT signaling direct β -catenin toward a different transcriptional response. We found that *cyclin D1* transcript decreases upon BCR stimulation. Unlikely β -catenin is involved in this event since, in the majority of MCL cases, the level of *cyclin D1* mRNA is largely determined by the t(11;14)(q13;q32) translocation that juxtaposes the gene *CCND1* to the promoter of IGHV. The decrease of *CCND1* mRNA does not correspond to a change in the protein level arguing for a posttranscriptional regulation of the protein.

Investigating the possible outcome of β -catenin nuclear localization, we observed that treatment with XAV-939, an activator of β -catenin degradation, hampered the transcription of NF- κ B target genes essential for MCL cells survival. An interplay between the canonical WNT/ β -catenin and NF- κ B signaling pathways has been observed in several cell types and cancers with either positive or negative impact of one another depending on the model [39, 40]. We showed that β -catenin is found on NF- κ B DNA consensus sequence and interacts with *IL-6* promoter region bound by NF- κ B. These observations and the co-immunoprecipitation results strongly argue for β -catenin acting as a co-regulator of NF- κ B in MCL cells. In DLBCL, another mature B-cell lymphoma, β -catenin, and NF- κ B are also transcription partners [27]. In this mature B-cell lymphoma, where a constitutive activation of NF- κ B is observed, β -catenin stabilization did not induce WNT-like transcriptional signature. However, β -catenin was required for the induction of NF- κ B regulated genes, such as *IL-10* [27]. All these data point to an association between NF- κ B and β -catenin in BCR-mediated regulation of important cytokines and factors modulating cell survival in mature lymphomas. The comparison of gene expression profiles between MCL cells issued of the blood stream or the lymph node underlined a strong NF- κ B signature in both compartments for several patients while

others presented this signature in the lymph node only [7]. Thus, in the periphery, in absence of microenvironment-secreted survival factors, the crosstalk between NF- κ B and β -catenin might provide a BCR-initiated mechanism to WNT16 and IL-6 production. In turn, these factors provide further autocrine/paracrine-mediated β -catenin stabilization and additional survival signals for leukemic cells.

Given this role of β -catenin in mediating the NF- κ B-induced survival signals, the specific inhibition of β -catenin in MCL cells might represent a therapeutic strategy. Moreover, β -catenin interacts with a number of transcription factors apart from TCF and NF- κ B [41]; so, targeting β -catenin capacity to regulate transcription in specific cell types would be of interest in tumor targeting. Therapeutic agents targeting the WNT/ β -catenin pathway are in development and, a number of small molecules and biological agents have entered clinical trials [42] but, taking into account the developmental role of β -catenin, a very specific targeting of the leukemic cells should be addressed. Noteworthy, WNT/ β -catenin inhibition was proposed to be particularly effective in eliminating a MCL-initiating cell pool that exhibits stem cells like properties and is responsible for cancer relapse. These cells relied on the WNT signaling pathway for their survival and proliferation [43]. In this work, induction of β -catenin degradation through XAV-939 decreased the expression of survival cytokines, such as IL-6. Whether this degradation induces further apoptosis of MCL cells is difficult to determine in vitro. Moreover, XAV-939 treatment might reduce only partially the level of β -catenin and the residual pool of the protein might still be sufficient for cell survival. Like in other tumor models, administration of PKF118-310 to tumor-grafted mice inhibited the tumor growth in vivo [44].

As a factor that helps maintaining high levels of β -catenin, WNT16 represents another interesting therapeutic target. Its inhibition, directly or through the blockade of its receptor, would reduce β -catenin level and induce apoptosis as it was shown in acute B lymphoblastic leukemia with t(1;19) [45]. Altogether, our results showed that BCR signaling stabilized β -catenin and allowed increased WNT16 production. As further enhancement of β -catenin stabilization might notably rely on autocrine or paracrine WNT16 production, targeting the BCR-dependent production of WNT16 in these cells could be part of a new therapeutic strategy.

Materials and methods

MCL samples and cell lines

PBMCs were obtained from 29 MCL leukemic patients by Ficoll-Hypaque density gradient (Stem Cell Technologies,

Grenoble, France). All lymphocytosis were superior to $3.0 \times 10^9/L$ (Supplementary Table 1). For patients with low lymphocytosis ($<10.10^9/L$) B cells were purified by negative selection using RosetteSep kit (Stemcell technologies, Grenoble France). The diagnosis of MCL was ascertained by immunophenotyping, cytogenetic and FISH analysis of t(11;14), and the overexpression of *cyclin D1* was detected by competitive RT-PCR according to the World Health Organization classification. All experiments were performed with PBMC containing as a mean 80% of MCL cells. All patients provided written informed consent, validated by the Ethics Committee from the Avicenne Hospital in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients usually received treatment shortly after sampling which made challenging to repeat experiments on samples of the same patient. Granta-519, Jeko-1, Maver, and HEK293T cell lines were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). HBL2 was kindly provided by Dr B. Sola (Caen University, France).

Cell culture and reagents

Patients' cells were cryopreserved in liquid nitrogen in the presence of 10% dimethyl sulfoxide and 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) at Avicenne Hospital. MCL leukemic cells (3×10^6 cells/mL) and Granta-519, Jeko-1, Maver or HEK293T cells (1×10^6 cells/mL) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 10 μ g/mL streptomycin (Gibco BRL, ThermoFischer Scientific, Courtaboeuf, France), 1 mM sodium pyruvate (Gibco BRL), MEM vitamins 100 \times (Gibco BRL), and 5 μ g/mL plasmocin (Cayla InvivoGen, Toulouse, France). For BCR stimulation soluble F(ab')₂ fragment of donkey antihuman IgM antibody (10 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch, Interchim, Monluçon, France) were used for the indicated periods of time. Cells were also treated with either Bortezomib (10 nM) (Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France), Ibrutinib (PCI-32765) (100 nM–5 μ M), Idelalisib (1 μ M) or Fostamatinib (2 μ M) (Selleck Chemicals Euromedex, Souffelweyersheim, France), XAV-939 (20 μ M) (Selleck Chemicals) or PKF 118-310 (500 nM or 5 μ M) (Sigma Aldrich Chimie, Lyon, France).

Animal experiment

Animal experiments were approved by the Norwegian Animal Research Authority and conducted according to The European Convention for the protection of vertebrates used for scientific purposes. Local Ethics Committees (REK number 2012/2245). REK: Regional committees for medical and health research ethics. To determine the efficacy of PKF118-310 in vivo, six NOD/SCID IL2 γ null (NSG)

female mice (6–10 weeks old) (three per group) were injected subcutaneously in the left flank area with 5×10^6 JeKo-1 cells resuspended in 100 μ L of PBS solution containing 12.5 % Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The health status and weight of the mice were analysed every other day and they were randomized into two groups when tumor volumes reached ~ 100 mm³ at 4 days from engraftment. PKF118-310 toxicity was evaluated in an initial maximum tolerated dose (MTD) experiment. The toxicity screen showed that PKF118-310 at 0.4 mg/kg was tolerated. Mice were then either treated with vehicle solution (PBS, 0.1% DMSO) or PKF118-310 (0.4 mg/kg in vehicle solution) every other day. The vehicle solution and PKF118-310 were given intratumorally. Tumor volumes were measured every second day by a digital calliper using the following ellipsoid formula: Volume = $\pi(\text{length} \times \text{width} \times \text{height})/6$. The experiment ended and the animals were humanely killed when tumors reached the preestablished tumor size endpoint of ~ 1500 mm³.

Statistical analysis

Statistical analysis was made using the GraphPad Prism version 5.0. (La Jolla, CA, USA). As stated in the figures legend, Student's unpaired *t* test and Wilcoxon-signed rank test were employed. Data are generally presented as the mean \pm SEM and statistics were considered significant with **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

Acknowledgements CF was the recipient of a "Année Recherche" support from APHP. AQ was the recipient of a Jansen fellowship. This project was funded by a "Bonus Qualité Recherche" grant from University Paris 13 and benefited from the financial support of INSERM, University Paris 13 and the Labex INFLAMEX, contract ANR11 IDEX00502. We thank Dr C. Leroy for reading the manuscript, Dr L. Guittat for helpful discussion during the experimental work and Dr B. Papp for initiating collaboration with Dr P. Gelebart.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

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

References

- Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997;89:2067–78.
- Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. 2003;101:4975–81.
- Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in

- chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1994;84:2726–32.
4. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122:3416–23.
 5. Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2011;117:26–38.
 6. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue MH, Pedersen LB, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*. 2011;118:3088–95.
 7. Saba NS, Liu D, Herman SE, Underbayev C, Tian X, Behrend D, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- κ B activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016;128:82–92.
 8. Rizzatti EG, Falcao RP, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Anselmo-Lima WT, Okamoto OK, et al. Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGF β signalling pathways. *Br J Haematol*. 2005;130:516–26.
 9. Kimura Y, Arakawa F, Kiyasu J, Miyoshi H, Yoshida M, Ichikawa A, et al. The Wnt signaling pathway and mitotic regulators in the initiation and evolution of mantle cell lymphoma: gene expression analysis. *Int J Oncol*. 2013;43:457–68.
 10. Gelebart P, Anand M, Armanious H, Peters AC, Dien Bard J, Amin HM, et al. Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;112:5171–9.
 11. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149:1192–205.
 12. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. 1997;11:3286–305.
 13. Stamos JL, Weis WI. The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:a007898.
 14. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378:785–9.
 15. Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J Biol Chem*. 1992;267:16878–82.
 16. Christian SL, Sims PV, Gold MR. The B cell antigen receptor regulates the transcriptional activator beta-catenin via protein kinase C-mediated inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Immunol*. 2002;169:758–69.
 17. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999;398:422–6.
 18. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281:1509–12.
 19. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2002;22:1172–83.
 20. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002;14:381–95.
 21. Baran-Marszak F, Boukhiar M, Harel S, Laguillier C, Roger C, Gressin R, et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2010;95:1865–72.
 22. Bernard S, Danglade D, Gardano L, Laguillier C, Lazarian G, Roger C, et al. Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2014;136:2761–74.
 23. Gold MR, Ingham RJ, McLeod SJ, Christian SL, Scheid MP, Duronio V, et al. Targets of B-cell antigen receptor signaling: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway and the Rap1 GTPase. *Immunol Rev*. 2000;176:47–68.
 24. Dal Col J, Doketti R. GSK-3beta inhibition: at the crossroad between Akt and mTOR constitutive activation to enhance cyclin D1 protein stability in mantle cell lymphoma. *Cell Cycle*. 2008;7:2813–6.
 25. Gold MR, Scheid MP, Santos L, Dang-Lawson M, Roth RA, Matsuuchi L, et al. The B cell antigen receptor activates the Akt (protein kinase B)/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*. 1999;163:1894–905.
 26. Boukhiar MA, Roger C, Tran J, Gressin R, Martin A, Ajchenbaum-Cymbalista F, et al. Targeting early B-cell receptor signaling induces apoptosis in leukemic mantle cell lymphoma. *Exp Hematol Oncol*. 2013;2:4.
 27. Bognar MK, Vincendeau M, Erdmann T, Seeholzer T, Grau M, Linnemann JR, et al. Oncogenic CARMA1 couples NF- κ B and beta-catenin signaling in diffuse large B-cell lymphomas. *Oncogene*. 2016;35:4269–81.
 28. Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature*. 1998;391:410–3.
 29. Raskatov JA, Meier JL, Puckett JW, Yang F, Ramakrishnan P, Dervan PB. Modulation of NF- κ B-dependent gene transcription using programmable DNA minor groove binders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:1023–8.
 30. Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell*. 2004;5:91–102.
 31. Khan NI, Bradstock KF, Bendall LJ. Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2007;138:338–48.
 32. Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Kreuzer KA. Wnt/beta-catenin/LEF-1 signaling in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a target for current and potential therapeutic options. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10:716–27.
 33. Spaargaren M, de Rooij MF, Kater AP, Eldering E. BTK inhibitors in chronic leukemia: a glimpse to the future. *Oncogene*. 2015;34:2426–36.
 34. Lindvall J, Islam TC. Interaction of Btk and Akt in B cell signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293:1319–26.
 35. de Rooij MF, Kuil A, Kater AP, Kersten MJ, Pals ST, Spaargaren M. Ibrutinib and idelalisib synergistically target BCR-controlled adhesion in MCL and CLL: a rationale for combination therapy. *Blood*. 2015;125:2306–9.
 36. Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, Coleman I, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med*. 2012;18:1359–68.
 37. Sun Y, Zhu D, Chen F, Qian M, Wei H, Chen W, et al. SFRP2 augments WNT16B signaling to promote therapeutic resistance in the damaged tumor microenvironment. *Oncogene*. 2016;35:4321–34.
 38. Lovatt M, Bijlmakers MJ. Stabilisation of beta-catenin downstream of T cell receptor signalling. *PLoS ONE*. 2010;5:e12794.
 39. Koopmans T, Eilers R, Menzen M, Halayko A, Gosens R. beta-catenin directs nuclear Factor- κ B p65 output via CREB-binding protein/p300 in human airway smooth muscle. *Front Immunol*. 2017;8:1086.
 40. Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/beta-Catenin and NF- κ B signaling pathway during Inflammation. *Front Immunol*. 2016;7:378.
 41. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J*. 2012;31:2714–36.
 42. Zhang X, Hao J. Development of anticancer agents targeting the Wnt/beta-catenin signaling. *Am J Cancer Res*. 2015;5:2344–60.
 43. Mathur R, Sehgal L, Braun FK, Berkova Z, Romaguera J, Wang M, et al. Targeting Wnt pathway in mantle cell lymphoma-initiating cells. *J Hematol Oncol*. 2015;8:63.

Supplementary table 1

Characteristics of MCL patients

MCL	Sex	Age	Lymphocytosis 10 ⁹ /L	%CD19+CD5+	VH	DH	JH	Monotypic Kappa/Lambda	IGHV homology %	IGHV mutational status	cytology
1	F	63	10	67	VH4-34	DH2	JH5	lambda	94	M	
2	M	77	660	96	VH3-33	DH6	JH4	kappa	95,1	M	
3	M	69	70	80	VH3-9	DH1	JH4	kappa	95,5	M	
4	M	69	31	90	VH1-18	DH3	JH4	kappa	93,5	M	
5	M	85	17	73	VH5-51	DH3	JH4	kappa	98,9	UM	
6	F	54	70	80	VH3-21	DH3	JH6	lambda	100	UM	
7	F	63	28	94	VH1-18	DH3	JH4	lambda	99,2	UM	
8	M	37	39	89	VH1-69	DH2	JH5	kappa	100	UM	
9	M	74	51	90	VH3-64	DH6	JH6	lambda	100	UM	
10	M	69	42	81	VH3-30	DH5	JH4	lambda	100	UM	
11	M	63	15	91	VH3-23	DH2	JH6	kappa	99,6	UM	
12	F	74	5	50	VH3-23	DH1	JH4	kappa	100	UM	
13	F	77	172	99	VH3-74	DH5	JH4	kappa	96,6	M	
14	M	59	21	87	VH3-11	DH5	JH6	kappa	100	UM	
15	M	96	56	94	VH3-21	DH6	JH6	lambda	99,2	UM	
16	M	56	50	90	VH4-4	DH2	JH6	kappa	94	M	
17	M	77	37	88	VH1-8	DH6	JH5	kappa	98,9	UM	
18	M	65	3	80	VH4-34	DH3	JH6	kappa	98,1	UM	
19	M	58	9	87	VH4-34	DH6	JH5	lambda	99,6	UM	
20	M	52	6	60	VH3-21	DH6	JH6	lambda	100	UM	Blastoid
21	F	51	19	83	VH 4-59	DH3	JH6	kappa	94	M	
22	F	70	46	90	VH 2-70	DH3	JH4		98,5	UM	
23	F	62	60	95	VH 4-39	DH3		lambda	94	M	Blastoid
24	M	69	11	80	VH3-33	DH6	JH5		93,6	M	
25	M	64	21	85	VH3-49	DH5	JH5		99,3	UM	
26	F	74	19	85	VH5-51	DH7	JH4	kappa	100	UM	
27	M	49	11	76	VH4-34	DH2	JH4	lambda	98,3	UM	
28	M	79	71	90	VH3-74	DH7	JH5		94,4	M	
29	M	45	17	85	VH1-8	DH6	JH4	kappa	98,7	UM	

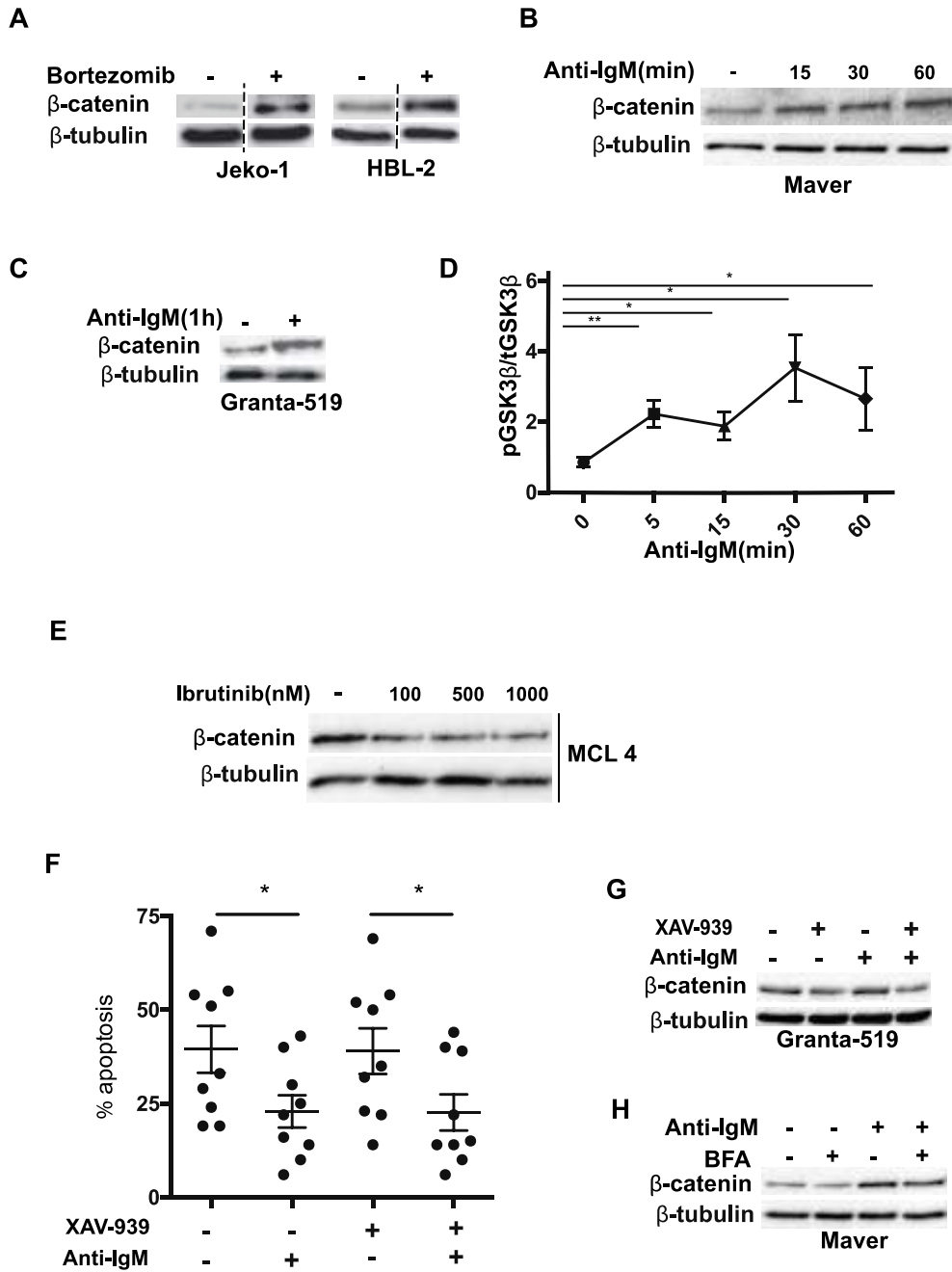
M Mutated, UM Unmutated

Supplementary table 2

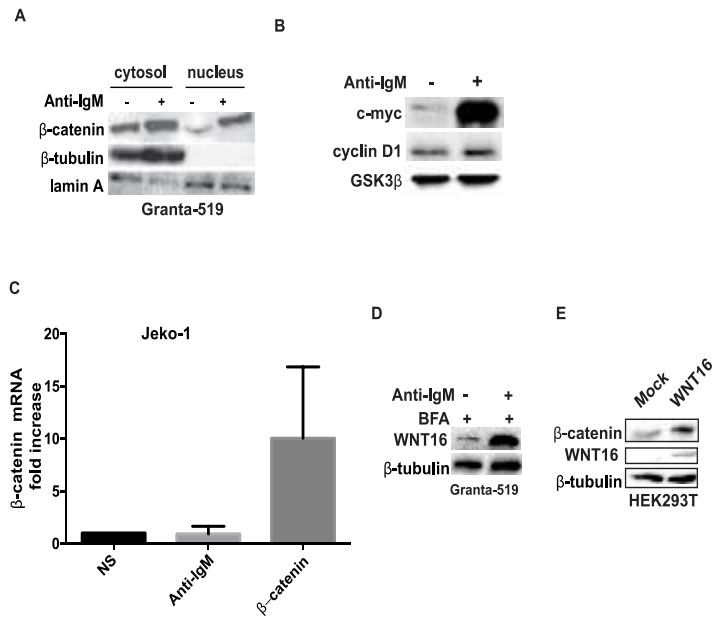
Expression of genes involved in the WNT canonical pathway in 4 MCL

Symbol	LN MCL18	LN MCL18	LN MCL17	LN MCL17	LN MCL17	LN MCL17	LN MCL17	LN MCL17	LN MCL17
WNT1	/	/	/	/	/	/	/	/	/
WNT2	/	/	/	/	/	/	/	/	/
WNT4	/	/	/	/	/	/	/	/	/
WNT5A	/	/	/	/	/	/	/	/	/
WNT6	/	/	/	/	/	/	/	/	/
FZD10	/	/	/	/	/	/	/	/	/
FZD9	/	/	/	/	/	/	/	/	/
WNT7A	/	/	/	/	/	/	/	/	/
FZD4	/	/	/	/	/	/	/	/	/
WNT8	/	/	/	/	/	/	/	/	/
WNT8A	/	2.2	/	/	/	/	/	/	/
WNT9	/	/	1.5	/	/	/	/	1.5	/
WNT9B	1.3	2.7	1.1	1.1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.2
WNT9C	1.3	1.8	1.1	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.2
WNT11	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.1
WNT18A	1.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.1
FZD9	1.8	1.8	/	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3
FZD9	1.1	/	/	/	/	/	/	/	1.1
FZD3	1.6	1.8	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
WNT7B	1.8	1.8	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2
FZD5	1.1	/	1.9	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3
WNT18B	1.4	1.4	1.4	1.7	1.6	1.6	1.6	1.6	1.4
FZD8	1.5	1.6	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
FZD1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
WNT19	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
FZD5	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
WNT14A	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
WNT1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
CCND1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1

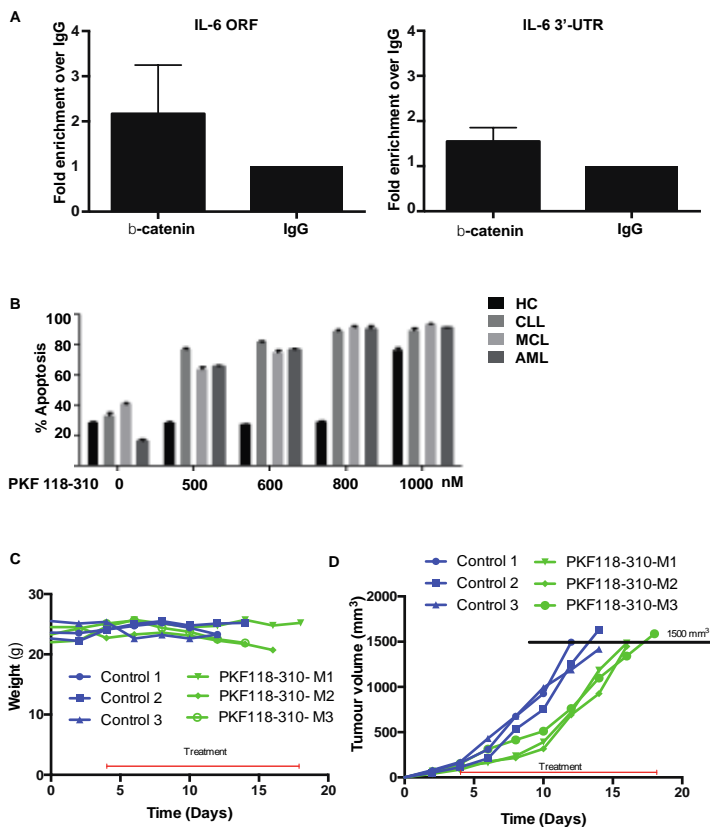
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Annexe 2 : Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia

Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia

Gregory Lazarian, Romain Guèze, and Catherine J. Wu

Author affiliations and support information (if applicable) appear at the end of this article.

Published at jco.org on February 13, 2017.

Corresponding author: Catherine J. Wu, MD, Dana-Farber Cancer Institute, Dana 520C, 44 Binney St, Boston MA 02115, e-mail: cwu@partners.org.

© 2017 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/17/3509-984w/\$20.00

A B S T R A C T

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a common B-cell malignancy with a remarkably heterogeneous course, ranging from indolent disease with no need for immediate therapy to rapidly progressive disease associated with therapeutic resistance. The recent US Food and Drug Administration approvals of novel targeted therapies such as inhibitors of B-cell receptor signaling and B-cell lymphoma 2 have opened up new opportunities in the clinical management of patients with CLL and heralded a new era in the clinical treatment of this disease. In parallel, the implementation of novel sequencing technologies has provided new insights into CLL complexity, identifying a growing list of putative drivers that underlie inter- and intratumor heterogeneities in CLL affecting disease progression and resistance. The identification of these novel genomic features that can indicate future drug resistance or guide therapeutic management is now becoming a major goal in CLL so that patients can best benefit from the increasingly diverse available therapies, as discussed herein.

J Clin Oncol 35:984-993. © 2017 by American Society of Clinical Oncology

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation and proliferation of clonal B cells in the blood, marrow, and lymph nodes. The clinical course of CLL is remarkably variable among patients, with median overall survival (OS) ranging from less than 3 years, despite the use of effective combination chemotherapy regimens, to more than 10 years without need of therapeutic intervention.^{1,2} Genetic features underlying this variability in clinical course have been long identified. Conventional karyotype banding and fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis are the bases of the existing widely used hierarchic prognostic model.³ The recent advent of transformative next-generation sequencing (NGS) has uncovered many novel putative disease-driving somatic alterations and accurately quantified intrasample heterogeneity. With the recent US Food and Drug Administration approval of inhibitors targeting CLL pathways,^{4,6} the identification of the connections between each therapy and potentially vulnerable genomically defined disease subpopulations has become a priority in CLL.

UNCOVERING SOMATIC ALTERATIONS AND GENOMIC COMPLEXITY IN CLL

Over the last decade, new genome-wide sequencing approaches have identified numerous somatic alterations associated with cancer. These studies have

provided a wealth of fresh insights into the underlying mechanisms driving cancer.⁷ The study of CLL has particularly benefited from the availability of these transformative technologies. With its ease of tissue accessibility and indolent disease kinetics, enabling repeated sampling within the same individual, CLL has been an optimal setting for examining questions of tumor heterogeneity and clonal evolution.

Earlier genetic studies of CLL that focused on the detection of copy numbers confirmed the recurrence of key cytogenetic abnormalities previously identified by FISH.^{3,8} When considering data from an aggregate of 1,590 cases of CLL worldwide⁹⁻¹³ (Fig 1A), the most common alterations and their frequencies have been focal deletions of chromosomes 13q [del(13q); 55% to 60%], 17p (3.5% to 10%), and 11q (6% to 27%) and trisomy 12 [tri(12); 10% to 16%]. Of note, the minimal deleted regions of these deletions were identified to encompass important putative CLL drivers: *ATM* and *BIRC3* within del(11q), *TP53* within del(17p), and the microRNA 15a/16-1 encoded within an intron of *DLEU2* in 13q23.¹⁴ Other cytogenetic alterations were found at lower incidence, including chromosome 2p gains [amp(2p); 2% to 7%] containing *MYCN*, *REL*, and *BCL11A*,^{15,16} amp(8q) (2% to 4%) responsible for *MYC* amplification,⁹ and del(8p) [2% to 5%] and del(15q) encompassing *TNFRSF10A/B*¹⁷ and *MGA*,¹¹ respectively.

DOI: 10.1200/JCO.2016.71.0822

984 © 2017 by American Society of Clinical Oncology

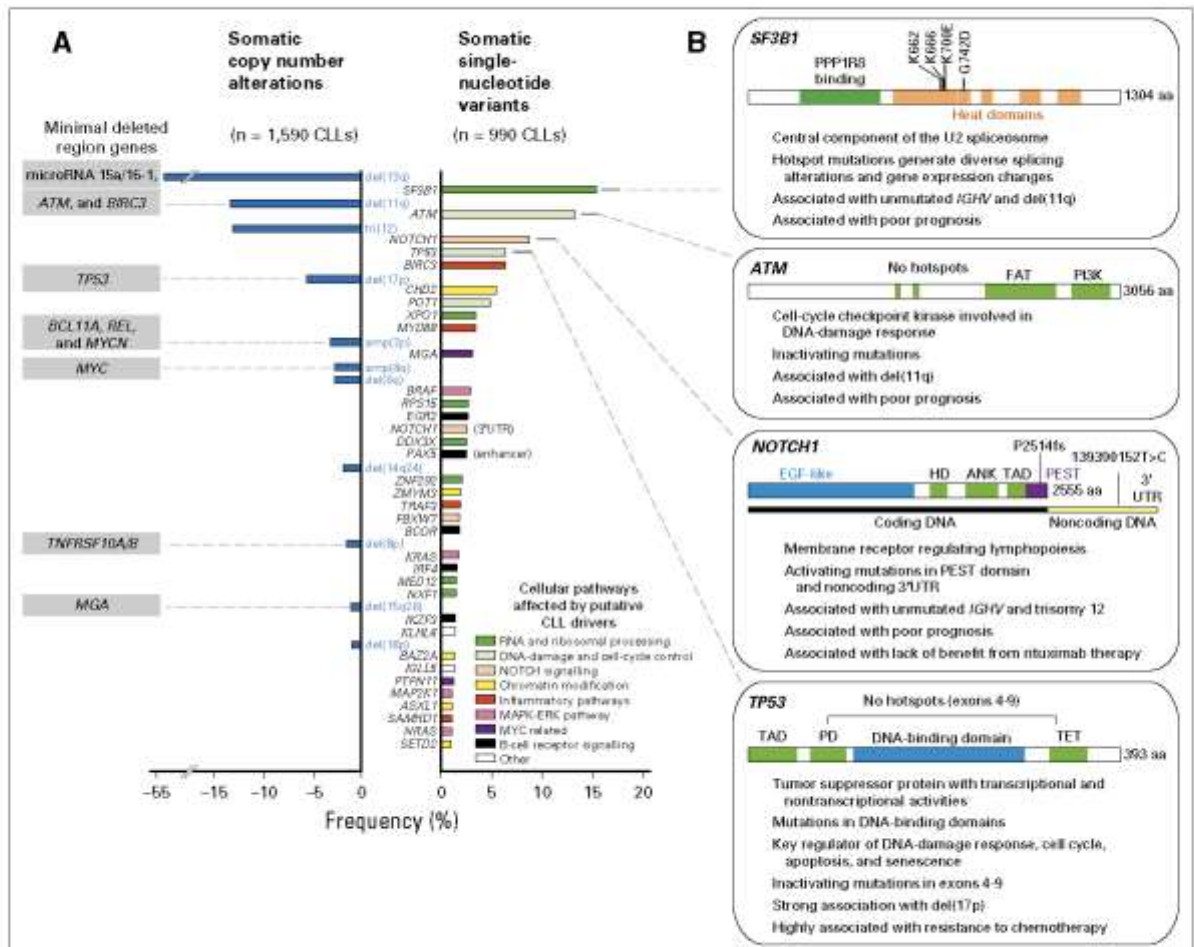


Fig 1. Putative driver gene mutations and recurrent somatic copy number variations in chronic lymphocytic leukemia (CLL). (A) Frequency of somatic copy number alterations when combining cohorts from the Spanish International Cancer Genome Consortium (ICGC) trial¹² (n = 452), German CLL Study Group CLL8 trial¹¹ (n = 353), Scandinavian SCALE trial¹³ (n = 369), Ouillette et al¹⁰ study (n = 255), and Dana-Farber Cancer Institute (DFCI)/Brown et al⁹ study (n = 161), identified through single-nucleotide polymorphism array (except as identified by whole-exome sequencing [WES] for Spanish ICGC cohort). Also shown are the frequencies of somatic single-nucleotide variants (from DFCI/Broad Institute¹⁴ [n = 548] and from Spanish ICGC¹² [n = 452]) identified through WES. Only the events over 1% in frequency in the combined cohorts are reported. *IGLL5*, *MAP2K1*, and *SAMHD1* have been reported in DFCI cohort only, whereas *ZNF292*, *KLH8*, *SETD2*, and *PAX5* enhancer have been reported in Spanish ICGC cohort only. All remaining genes were consistent among cohorts. Mutations in the 3'UTR of *NOTCH1* were detected in four of 150 patient cases with whole-genome sequencing. (B) Summaries of the characteristics of frequently mutated genes in CLL. amp, amplification; ANK, ankyrin repeat; del, deletion; EGF, epidermal growth factor; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FAT, FRAP-ATM-transformation/transcription domain associated protein; HD, heterodimerization domain; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PD, programmed death; PEST, proline, glutamic acid, serine, and threonine; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; SCALE, Scandinavian Lymphoma Etiology; TAD, transaction activation domain; TET, ten-eleven translocation.

Even more recently, NGS technologies such as whole-genome (WGS) and whole-exome sequencing (WES) have provided a more granular investigation of the genomic landscape of CLL.¹⁶⁻²⁴ Rather than revealing any universal genetic event accounting for all CLL cases, these technologies have demonstrated the diverse recurrent gene mutations associated with CLL and the high level of genetic heterogeneity among samples, consistent with the high degree of clinical variability characteristic of CLL. The development of robust algorithms and statistical modeling of these sequencing data have led to the uncovering of gene mutations likely positively selected and hence identified as putative CLL drivers.^{25,26}

Two recent efforts using WES and WGS together reported on approximately 1,000 patient cases of CLL, identifying recurrent gene mutations even of low frequency by highlighting a total of 75 significantly mutated genes.^{12,27} In aggregate, mutations in 28 genes were found, common to both studies (Fig 1A). Conversely, the frequencies of gene mutations were dependent on the composition of the investigated cohort; 16 genes were unique to the Dana-Farber Cancer Institute (DFCI)/Broad Institute study, with *SF3B1* as the most frequently mutated gene, whereas 31 were only detected within the Spanish International Cancer Genome Consortium cohort, in which *NOTCH1* was the top mutated gene. This latter study also showed that relevant mutations can affect the

noncoding genome (ie, *NOTCH1* 3'UTR and *PAX5* enhancer). Although these two studies are the largest cohorts characterized by NGS to date, it has been estimated that at least 2,000 patient cases would be required to achieve saturation in driver discovery.²⁶

Examination of the growing list of putative CLL drivers has implicated the involvement of several key pathways in CLL biology (Fig 1A). *TP53* and *ATM* are well-known tumor suppressor genes that are commonly inactivated by gene mutations or chromosomal deletions in CLL [del(17p) and del(11q), respectively; Fig 1B]. Such observations have identified the DNA-damage response pathway as a crucial CLL node. The application of NGS to CLL has also unexpectedly uncovered an important role of RNA processing in CLL. As a striking example, *SF3B1* is a commonly mutated gene and encodes a component of the spliceosome, which orchestrates the removal of introns from precursor mRNA.^{19,21} Recently, *SF3B1* mutations were shown to cause alternative splicing (with preferential alteration in 3' splice site selection)^{28,29} and a complex of changes, including impairment of the DNA-damage response³⁰ and alteration in telomere biology.³¹ Other frequently mutated genes involved in RNA processing and splicing have been identified (*XPO1*, *RPS15*, *DDX3X*, *ZNF292*, *MED12*, and *NXF1*), supporting the importance of this cellular process to CLL. *NOTCH* is another key pathway because it can be affected by either gain-of-function mutations of *NOTCH1* (2 basepair frameshift deletion),²³ mutation of *NOTCH1* 3'UTR,⁴² alternative splicing (by mutated *SF3B1*) of a pathway regulator,³¹ or *FBXW7* loss-of-function mutations.³² B-cell receptor (BCR) signaling and the B-cell transcriptional program can also be impaired by mutations in *EGR2*, *BCOR*, *IRF4*, and *IKZF3*. Chromatin maintenance (*CHD2*, *BAZ2A*, *ZMYM3*, *ASXL1*, and *SETD2*), the inflammatory pathway (*BIRC3*, *MYD88*, *TRAF3*, and *SAMHD1*), mitogen-activated protein kinase (MAPK)–extracellular signal-regulated kinase (ERK; *BRAF*, *KRAS*, and *MAP2K1*), and MYC-related signaling (*MGA* and *PITPN1*) are other relevant pathways affected by mutations.

With the increase in the number of cases of CLL worldwide characterized by WES or WGS, it has been increasingly feasible to examine the likelihood that diverse somatic alterations cooperate to contribute to the oncogenic phenotype. Indeed, in the DFCI/Broad Institute study, most patients (approximately 60%) carried more than one driver.²⁷ Several studies have detected recurrent patterns of co-occurrence, highlighting likely preferred interactions between putative drivers. Del(17p) has been consistently associated with *TP53* mutation,³³ del(11q) with *ATM* and/or *SF3B1* mutation,³⁴ and *NOTCH1* mutation with tri(12).^{35,36} Conversely, low co-occurrence between *SF3B1* mutation and tri(12) or *NOTCH1* mutation suggests redundancy in their functional activities, as recently suggested by the finding that a target of *SF3B1* mutation is a splice variant that dysregulates NOTCH signaling.³¹

In a reanalysis of our reported DFCI/Broad Institute data,²⁷ we found most CLL samples to display a unique combination of genetic alterations not occurring in any other patient sample, suggesting that each leukemia embarks on an independent evolutionary path (Fig 2). This analysis also revealed that for approximately 5% of patients, del(13q) is the sole detectable genetic abnormality. This event alone seems to be sufficient to drive CLL, because deletion in mice of the region corresponding to the human 13q14 led to the development of CLL-like disease, although at low penetrance and latency. Tri(12) and mutations of *CHD2* and *SF3B1*

are also found as sole abnormalities in patients and could be sufficient drivers for CLL as well. Two thirds of recurrent combinations involved at least two of the following drivers: del(13q), del(11q), and *SF3B1* and/or *ATM* mutations. Finally, 8% of CLLs in this cohort did not carry any known driver.²⁷ In these cases, there may have been putative genetic drivers not yet discovered; other factors such as epigenetic deregulation or microenvironmental factors could have played a role in driving disease.

Such genomic complexity defies single gene–based approaches for understanding cancer biology. Definitive understanding of the exact function of novel drivers and how they cooperate will require studies in *in vitro* and *in vivo* models.^{37,38} Emerging single-cell technologies will likely transform our ability to decipher genomic complexity in CLL and highlight new drivers that could be relevant to individual patients. An expectation, however, is that these private drivers will nonetheless affect common core CLL pathways.

UNDERSTANDING CLL LEUKEMOGENESIS THROUGH ITS PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION

Identifying founding genomic lesions and establishing when they were acquired may facilitate better understanding of the natural history of a case of CLL and suggest points of intervention. Because each mutation essentially supplies a molecular barcode for NGS reads, clustering of reads with similar variant allele frequencies (corrected for local ploidy and tumor purity) has feasibly allowed for accurate quantification of intratumor heterogeneity and investigation of clonal architecture and disease phylogeny. These types of studies have revealed events that are preferentially clonal, consistent with earlier events, and others that are preferentially subclonal, consistent with later events. On the basis of this principle, several studies have consistently categorized del(13q), tri(12), and *MYD88* mutations as early lesions, suggesting their role as CLL initiators, and *ATM*, *SF3B1*, and *TP53* mutations as later lesions.^{24,27} Likewise, the application of machine learning–based approaches has supported the idea that CLL-associated lesions are temporally ordered in a specific fashion rather than being randomly accumulated, again revealing del(13q) and tri(12) as early and potentially initiating events leading to preferred evolutionary trajectories.³⁹

A further layer of complexity that likely contributes to CLL disease heterogeneity is the impact of cell of origin on acquisition of subsequent somatic alterations. The methylome of CLLs with *IGHV*-unmutated status is more consistent with that of naive B cells, whereas the epigenetic state of CLLs with mutated *IGHV* is more similar to antigen-experienced B cells,^{40,41} although recent work has suggested that CLL cells can become fixed across diverse stages of B-cell differentiation.⁴² The state of B-cell differentiation seems to be associated with a preferential acquisition of certain somatic mutations, with mutated *IGHV* having a narrow spectrum of drivers (ie, *MYD88*, *CD79A/B*, and *TLR2*) and unmutated *IGHV* having a broad spectrum of events.²⁷ CLL-associated genomic abnormalities have been found even in the hematopoietic progenitor cells of patients with CLL. Deep sequencing of CD34+CD19-sorted cells of patients with CLL has revealed the detection of mutations in *NOTCH1*, *SF3B1*, and *BRAF*.⁴³ These findings are in

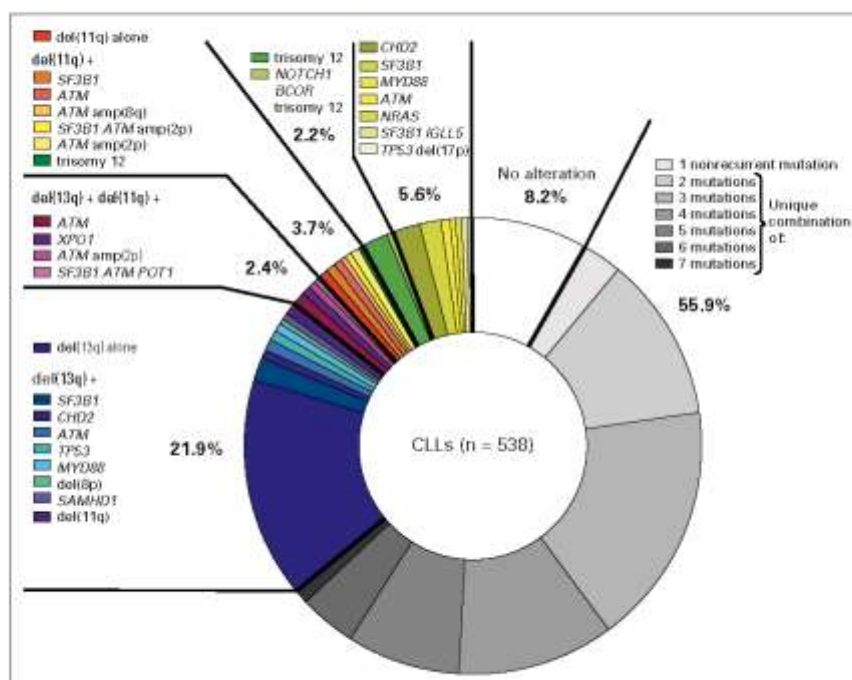


Fig 2. A summary of the frequencies and most common coassociations of putative chronic lymphocytic leukemia (CLL) drivers, per analysis of the Dana-Farber Cancer Institute/Broad Institute cohort of 538 CLLs.²⁷

line with murine xenograft studies in which engrafted hematopoietic progenitor cells from patients with CLL could produce a mature CD5+ -expressing clonal B-cell population with a phenotype of CLL.⁴⁴

IMPACT OF SOMATIC EVENTS IN CLL ON RESPONSE TO THERAPY

The treatment landscape of CLL is currently evolving considerably. For more than a decade, the combination of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab has been the conventional first-line regimen for fit patients, providing a high response rate (90%) and prolonged progression-free survival (PFS; median, 57 months).¹ Although patients treated with this combination almost uniformly experience relapse, a subset of those with mutated *IGHV* can particularly benefit from this approach, with long-term PFS.⁴⁵⁻⁴⁷ Other common chemoimmunotherapy-based monotherapy or combination regimens have included purine analogs (bendamustine, pentostatin, and cladribine),⁴⁸⁻⁵⁰ alkylating agents (chlorambucil and cyclophosphamide),^{51,52} and anti-CD20 (rituximab, ofatumumab, and obinutuzumab)⁵³⁻⁵⁵ or anti-CD52 antibodies (alemtuzumab).⁵⁶ In addition to these chemotherapy-based regimens, recent US Food and Drug Administration approvals of novel therapies targeting BCR signaling (ie, idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase,⁵ and ibrutinib, the irreversible inhibitor of Bruton tyrosine kinase [BTK]⁴) and the B-cell lymphoma 2 signaling pathway (ie, venetoclax⁶) have opened up the possibility of specifically targeting crucial CLL pathways, with less toxicity. Despite high response rates in patients for whom cytotoxic drugs have failed, resistance to these therapies is increasingly

emerging.³⁷ In this setting, genomic characterization can identify the sources of resistance and help guide subsequent therapeutic decisions.

Intratumoral Heterogeneity Fuels CLL Resistance

It is increasingly evident that intratumoral heterogeneity not only fuels clonal evolution and leukemic progression but also provides the seeds for the development of therapeutic resistance.^{24,27} Although therapy itself can potentially incite mutational events and increase genomic diversity,³⁸ multiple longitudinal studies using WES characterization in CLL have supported a scenario in which the genetic capacity for resistance is already present in the pretreatment sample as pre-existing subclones (Fig 3).^{24,47,59-62} Alternatively, leukemic tumor cells at relapse could also be progeny of dormant parental cells. Recent findings showing the presence of somatic alterations in early hematopoietic progenitors are in line with this idea.⁴³

Characterizing the Treatment-Specific Genomic Landscape of CLL

In the setting of exposure to broadly cytotoxic agents, *TP53* disruption has been clearly identified as the most crucial and independent factor of resistance. Indeed, multiple studies have shown that patients with *TP53* loss experience poor response and worse outcome after chemotherapy treatment.⁶³ In NGS studies tracking the fate of subclonal populations in patient samples before and after chemoimmunotherapy, subclones with disrupted *TP53* clearly undergo clonal expansion by the time of relapse (Fig 3).^{24,27,64} Importantly, small subclones with *TP53* mutations

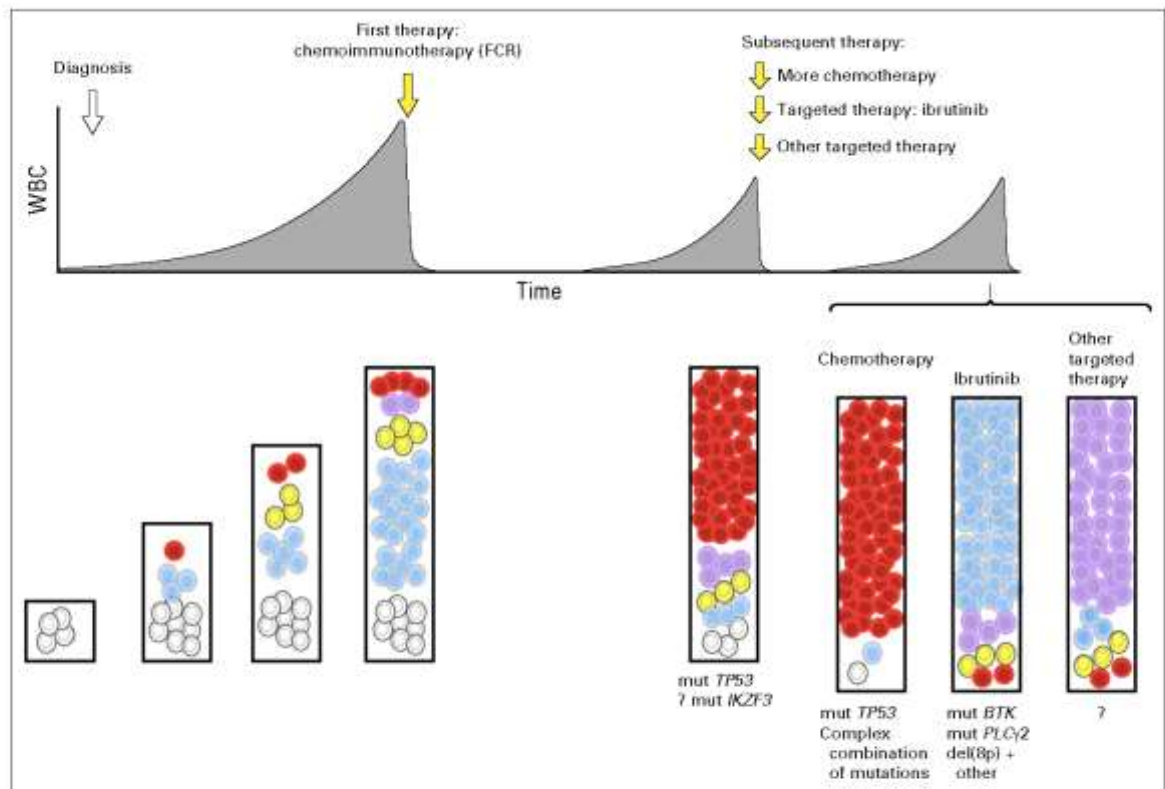


Fig 3. Schema of clonal evolution of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in relation to exposure to therapy. From the start, sequential acquisition of somatic alterations in CLL leads to its genomic diversification. Exposure to chemoimmunotherapy as first-line treatment commonly selects *TP53*-disrupted subclones. Each therapy proposed at relapse may differentially shape the CLL architecture and would be associated with preferential alterations: *TP53* loss with chemotherapy-based treatment and *BTK* or *PLCG2* mutation (mut) or 8p deletion (del) with ibrutinib therapy. ? indicates other mutations. FCR, fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab.

detected at diagnosis—only by sensitive techniques are associated with the same adverse prognosis as macroscopic subclones and can indicate future fludarabine refractoriness.^{65,66} Subclones with *TP53* mutations are also associated with lower death rates during therapy compared with subclones with *TP53* wild type, suggesting diminished sensitivity to therapy and higher growth rates during repopulation.⁶⁷ These mechanisms underlying clonal dynamics have not been yet observed with other drivers and highlight once again the leading role of *TP53* mutations in providing fitness advantage to the clone.

SF3B1 and *ATM* mutations seem to have variable evolution, with distinct clones rising or falling over time, suggesting that they likely do not bring the same advantage as *TP53* when considered individually. By contrast, targeted characterization of the relapsing CLL genome has shown that combinations of mutations involving *TP53*, *ATM*, and *SF3B1* could act synergistically to provide resistance to immunochemotherapy.⁶⁸ Thus, rather than sole abnormalities, combinations of somatic alterations could drive chemotherapy resistance in CLL.

By contrast, resistance to the targeted pathway inhibitor ibrutinib has been attributed to mutations directly affecting its target (*BTK*) or its downstream effector (*PLCγ2*).⁷⁷ *BTK* mutations (at the C481S site) are located in the ibrutinib binding site,

resulting in a protein that is only reversibly inhibited by ibrutinib.⁶⁹ *PLCG2* mutations likewise provide gain of function and lead to activation of BCR signaling in a *BTK*-independent manner.⁷⁰ Resistance to ibrutinib has been also associated with marked clonal evolution.⁷¹ Aside from *BTK* or *PLCG2* mutations, relapsing subclones have been shown to be progeny of parental del(8p) leukemic cells, present before therapy. Del(8p) was found to generate haploinsufficiency of the tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor, resulting in TRAIL insensitivity that could contribute to ibrutinib resistance (Fig 3). Although ibrutinib represents a major advance in the treatment of patients with *TP53* disruption,⁷² those treated with ibrutinib in this group of patients could nonetheless still have an adverse prognosis.⁷³ However, complex karyotype has been shown to be an even stronger predictor than del(17p) in this setting.⁷⁴ Thus, distinct modes of therapy may shape the CLL architecture differently.

Novel Approaches to the Detection and Monitoring of Subclonal Populations

Given that the bulk of recurrent putative CLL drivers have been discovered in WES or WGS studies (down to 3% frequency within the population), targeted NGS approaches are increasingly

Novel Genomic Discoveries in CLL

		Total No. (% samples with mutation)	Mutated (wild type)					
			TTFT (months)	OS (months)	ORR (%)	PFS (months)		
TP53	Retrospective Cohorts	ERIC	2,309 (16.4)	25 (106)	2.1	—	—	
		MLL	1,151 (7.1)	58 (90)	61 (87)	—	—	
		SCALE	366 (5)	4 (64)	54 (151)	—	—	
		Avogadro	309 (16.7)	—	55 (147)	—	—	
		CLL-IPi	1,626 (4)	—	37 (86)	—	—	
	Clinical Trials	First Line	GCLLSG CLL4	328 (8.5)	—	29 (89)	67 (91)	23 (52)
			GCLLSG CLL8	628 (11.5)	—	30-42 (90-NR)	52-75 (92-98)	12-15 (36-59)
			UK LRF CLL4	463 (7)	—	26 (76)	27 (83)	4 (27)
		R/R	GCLLSG CLL2H	100 (39)	—	21 (16)	NA	NA
			GCLLSG CLL3X	80 (39)	—	30 (90)	—	20 (20)
			FLOUK NCRN	114 (22.8)	—	23 (32)	54 (80)	12 (21)
	SF3B1	Retrospective Cohorts	ERIC	2,322 (11.8)	37 (118)	1.4	—	—
			MLL	1,140 (9)	46 (96)	65 (107)	—	—
			SCALE	366 (3.6)	2 (58)	64 (147)	—	—
Avogadro			309 (11)	—	42 (167)	—	—	
CLL-IPi			1,626 (15)	—	77 (121)	—	—	
Clinical Trials		First Line	GCLLSG CLL8	621 (18.4)	—	75-NR (88-NR)	90-95 (98-95)	29-43 (34-59)
			UK LRF CLL4	437 (17)	—	54 (79)	NA	25 (26)
			GCLLSG CLL2H	97 (17.5)	—	28 (17)	41 (34)	5 (8)
		R/R	GCLLSG CLL3X	80 (26)	—	30 (90)	—	24 (24)
			FLOUK NCRN	114 (26.1)	—	28 (36)	63 (78)	14 (18)
			NOTCH1	Retrospective Cohorts	ERIC	3,334 (8)	40 (119)	1.2
MLL		908 (12.3)			42 (91)	76 (85)	—	—
SCALE		366 (4.7)			5 (63)	86 (154)	—	—
Avogadro		309 (11)			—	42 (167)	—	—
CLL-IPi	1,968 (8)	—			84 (118)	—	—	
Clinical Trials	First Line	GCLLSG CLL8		622 (19)	—	85-90 (84-NR)	87-93 (88-97)	34-34 (32-57)
		UK LRF CLL4		466 (16)	—	55 (75)	NA	22 (26)
	R/R	GCLLSG CLL2H		97 (13.4)	—	NR(18)	50 (34)	15 (7)
		GCLLSG CLL3X		80 (14)	—	NR(90)	—	24 (24)
FLOUK NCRN	114 (14.9)	—	28 (40)	65 (75)	18 (19)			
	ATM	Retrospective cohort	Austen	155 (12)	—	85 (217)	—	40 (130)
		Clinical trials	First line	UK LRF CLL4	224 (14.7)	—	42 (86-78)	—
R/R			FLOUK NCRN	114 (26.3)	—	26 (36)	65 (76)	14 (22)
MYD88	Retrospective cohorts	ERIC	1,080 (2.2)	79 (178)	180 (156)	—	—	
		MLL	969 (1.5)	174 (96)	307 (NR)	—	—	
		Martinez-Trillos	587 (3.2)	35 (36) ↑	100 (85) ↑	—	—	
	Clinical trial	R/R	FLOUK NCRN	114 (2.6)	—	NR(30)	100 (72)	27 (18)

Adverse prognostic impact:
Univariable analysis
Multivariable analysis

Favorable prognostic impact:
Not significant
Univariable analysis

Fig 4. Summary of prognosis impact of somatic mutations evaluated in retrospective studies or clinical trials in chronic lymphocytic leukemia (CLL). The medians of time to first treatment (TTFT), overall survival (OS), and progression-free survival (PFS) in subgroups of patients with CLL with mutations are indicated in months and compared with subgroups of patients with wild type (in parentheses). When medians were not available in studies, the value of the hazard ratio in multivariable analyses is reported in square brackets. The UK Leukaemia Research Fund (LRF) CLL4 trial²³ compared median months for the ATM biallelic inactivation subgroup with ATM wild type and ATM mutation subgroup. Data from the German CLL Study Group (GCLLSG) CLL3X trial²⁴ were inferred from Kaplan-Meier curves. ERIC, European Research Initiative on CLL; FLO, French Intergroup on CLL; IPi, International Prognostic Index; MLL, Munich Leukemia Laboratory; NA, not available; NCRN, National Cancer Research Network; NR, not reached; ORR, overall response rate; R/R, relapsed/refractory; SCALE, Scandinavian Lymphoma Etiology. *5-year OS rate (%). †10-year rate (%).

attractive as a means of efficiently and more routinely sampling the mutational landscape of CLL in a cost-effective fashion.^{68,75} Deep-targeted sequencing displays high sensitivity, with the ability to detect mutated alleles in down to one in 100 or 1,000 cells, but it is still prohibitively expensive for the detection of rarer events.

Single-cell technologies are emerging as another powerful tool to probe the genomic composition in heterogeneous cellular populations.⁷⁶ Single-cell WGS approaches can potentially provide a comprehensive snapshot of the subclonal composition of a population,^{77,78} but this is not high throughput nor cost effective at the present time. Droplet digital polymerase chain reaction technology is an alternative method for analyzing single cells by compartmentalizing them using water-oil emulsion at high throughputs. Using this strategy, the presence of ibrutinib-resistant subclones was recently been quantified before treatment initiation, demonstrating that drug-resistant populations were present in small quantities even in advance of ibrutinib exposure⁷¹ and that capacity for drug resistance was already inherent within the patient sample.

DEVELOPING GENOMICS-BASED SCHEMA FOR PROGNOSTICATION

Over the past decade, clinical prognostication in CLL has relied on the Rai and Binet clinical staging systems,^{7,79} knowledge of the mutational status of immunoglobulin variable region (which separates CLL into either mutated or unmutated *IGHV* groups, the latter with worse outcome^{80,81}), and FISH assessment of the most recurrent chromosomal aberrations in CLL. In a hierarchic classification scheme, *del(17p)* was found to confer the poorest survival, followed by *del(11q)*, *tri(12)*, normal karyotype, and then *del(13q)* as the sole abnormality.³

A key question in the field is whether the increasing array of discovered putative drivers holds prognostic relevance and could improve the accuracy of prognostication. A growing body of validation studies has evaluated the associations between genotype and parameters such as time to first treatment (TTFT), OS, therapeutic response, and PFS (Fig 4).

Despite variability in the design and size of these studies, several consistent findings can be gleaned. First, *TP53* disruption has clearly emerged as a reliable factor conferring adverse TTFT, PFS, and OS after first-line therapy.^{33,65,82-84} In the recently reported CLL International Prognostic Index study, which evaluated 3,472 patients treated in prospective first-line trials, mutation in *TP53* contributed the greatest weight to the score.⁸⁵

Second, the impact of *SF3B1* and *NOTCH1* mutations has been variably reported, which likely points to the importance of therapeutic context and patient status in evaluating this effect. In aggregate, several clinical trial studies have highlighted the independent poor prognostic influence of *SF3B1* mutations on PFS or OS.^{33,82,84,86-88} Although *NOTCH1* mutations have independently conferred adverse OS in multiple studies, their impact on PFS has been inconsistent.⁸⁷⁻⁹⁰ Interestingly, an analysis of the international CLL8 study reported a lack of benefit from the addition of rituximab in patients with *NOTCH1* mutations.⁹¹

Fewer studies have evaluated the role of *ATM* mutations; those that have been conducted have suggested an association with

shorter OS.⁹² More recent studies, however, have argued for a notable role of biallelic rather than monoallelic inactivation in significantly shorter PFS and OS in the first-line setting.⁹³

Impact of other recurrent mutations remains under investigation. *KRAS* and *POT1* mutations have been associated with refractoriness and adverse outcome.⁹⁴ *EGR2* mutations were observed to be associated with shorter OS.⁴³ Although linked with poor prognostic features, *MED12* mutations do not affect OS.⁹⁷ WES of large CLL cohorts recently identified additional novel prognostic factors associated with shorter TTFT (*BRAF*, *ZMYM3*, and *IRF4*), OS (*ASXL1*), and PFS (*RPS15* and *SETD2*).^{13,27,96}

Given the genomic complexity and co-occurrence in drivers in CLL, sophisticated models and external validation are now required to understand the relative prognostic value of the host of diverse genomic events. Hierarchic models have been widely used for classifying cytogenetic lesions.³ By focusing on OS, a scoring system integrating both recurrent chromosomal aberrations and gene mutations was proposed to define four CLL risk groups: high (*TP53* and/or *BIRC3* abnormalities), intermediate [*NOTCH1* ± *SF3B1* mutations and ± *del(11q)*], low [*tri(12)* or normal karyotype], and very low risk [*del(13q)* as sole alteration], where survival is similar to the general population.⁸⁵ Prognostic scoring integrating a larger number of somatic alterations and focusing on both PFS and OS remains to be performed for accurately determining prognosis. The respective impact of somatic alterations is also expected to drastically change with the use of targeted agents, the resistance mechanisms of which may differ from those of conventional chemotherapies. An alternative approach would be to assign patients to subgroups based on distinct nonoverlapping molecular features, as recently proposed for acute myeloid leukemia, although this is challenging for a disease as genetically heterogeneous as CLL.⁹⁷

Given the consistent poor prognosis associated with inactivating *TP53* lesions, clinical *TP53* mutation testing [by FISH for the chromosome 17p locus and *TP53* sequencing in cases without *del(17p)*]⁹⁸ is now highly recommended before each therapeutic line. Indeed, chemotherapy-based approaches have proven unsatisfactory in the presence of *TP53* mutations and are now no longer the therapy of choice for these patients. Conversely, allogeneic transplantation remains a valid strategy for patients with *TP53* disruption, as does the use of novel agents such as ibrutinib, idelalisib plus rituximab, and venetoclax.^{6,89,99-101} Beyond *TP53*, sequencing of *SF3B1*, *NOTCH1*, and *ATM* may provide additional prognostic information, although therapeutic context will play a major role in assigning their relative importance. For analysis of clinical samples, a common panel of genes to integrate in patients with CLL could include *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1*, and *ATM*, given their frequency and potential prognostic impact. In the setting of ibrutinib treatment, the monitoring of gene mutations associated with ibrutinib resistance (ie, *BTK* and *PLCG2*) can define the potential need for alternative therapies. Larger panels of genes may be informative, but their prognostic impact remains to be determined (*MYD88*, *BIRC3*, *KRAS*, *POT1*, *EGR2*, *MED12*, *BRAF*, *ZMYM3*, *IRF4*, *ASXL1*, *RPS15*, *SAMHD1*, and *SETD2*).

In conclusion, the application of advanced genomic technologies has rapidly uncovered new mechanisms underlying CLL biology, disease progression, and therapeutic resistance. To fulfill the promise of precision oncology, future studies will need to address the challenge of translating these findings into the routine

management of CLL, so that patients can maximally benefit from recent therapeutic advances.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Disclosures provided by the authors are available with this article at jco.org.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: All authors
Data analysis and interpretation: Romain Guèze, Catherine J. Wu
Manuscript writing: All authors
Final approval of manuscript: All authors
Accountable for all aspects of the work: All authors

REFERENCES

1. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al: Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukemia: A randomized, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 376:1164-1174, 2010
2. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:199-206, 1981
3. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910-1916, 2000
4. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al: Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 369:32-42, 2013
5. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al: Idatelesib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 370:997-1007, 2014
6. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, et al: Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 374:311-322, 2016
7. Garraway LA, Lander ES: Lessons from the cancer genome. *Cell* 153:17-37, 2013
8. Malek SN: The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 32:2805-2817, 2013
9. Brown JR, Hanna M, Tesar B, et al: Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 18:3791-3802, 2012
10. Ouillette P, Collins R, Shakhn S, et al: Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118:3051-3061, 2011
11. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, et al: High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* 120:4783-4794, 2012
12. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, et al: Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 526:519-524, 2015
13. Gurnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, et al: Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 96:1161-1169, 2011
14. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15524-15529, 2002
15. Chapiro E, Leporrier N, Redford-Weiss I, et al: Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res* 34:63-68, 2010
16. Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, et al: Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 109:1202-1210, 2007
17. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, et al: Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106:3214-3222, 2005
18. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al: Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475:101-105, 2011
19. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al: SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 365:2497-2506, 2011
20. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, et al: POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 45:526-530, 2013
21. Quesada V, Conde L, Vilemors N, et al: Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44:47-52, 2011
22. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al: Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemoresistance in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119:2854-2862, 2012
23. Febbrì G, Rasi S, Rossi D, et al: Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: Role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 208:1389-1401, 2011
24. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al: Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152:714-726, 2013
25. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al: Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* 31:213-219, 2013
26. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al: Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499:214-218, 2013
27. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al: Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 526:525-530, 2015
28. DeBoever C, Ghis EM, Shepard PJ, et al: Transcriptome sequencing reveals potential mechanism of cryptic 3' splice site selection in SF3B1-mutated cancers. *PLOS Comput Biol* 11:e1004105, 2015
29. Darman RB, Seiler M, Agrawal AA, et al: Cancer-associated SF3B1 hotspot mutations induce cryptic 3' splice site selection through use of a different branch point. *Cell Reports* 13:1033-1045, 2015
30. Te Baa GD, Derks IA, Navikalova V, et al: The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response. *Leukemia* 29:1133-1142, 2015
31. Wang L, Brooks AN, Fan J, et al: Transcriptomic characterization of SF3B1 mutation reveals its pleiotropic effects in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 30:750-763, 2016
32. O'Neil J, Grimm J, Strack P, et al: FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med* 204:1813-1824, 2007
33. Stigenbauer S, Schraiter A, Paschka P, et al: Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: Results from the CLL8 trial. *Blood* 123:3247-3254, 2014
34. Austen B, Skowronska A, Baker C, et al: Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol* 25:5448-5457, 2007
35. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, et al: NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 119:329-331, 2012
36. Riches JC, O'Donovan CJ, Kingdon SJ, et al: Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood* 123:4101-4110, 2014
37. Platt RJ, Chen S, Zhou Y, et al: CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 159:440-455, 2014
38. Heckl D, Kowalczyk MS, Yutovich D, et al: Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol* 32:941-946, 2014
39. Wang J, Khlebnikov H, Rossi D, et al: Tumor evolutionary directed graphs and the history of chronic lymphocytic leukemia. *Elife* 3:e02869, 2014
40. Kulis M, Heath S, Bibikova M, et al: Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44:1236-1242, 2012
41. Kulis M, Merkel A, Heath S, et al: Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat Genet* 47:746-756, 2015
42. Oakes CC, Seifert M, Assenov Y, 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
43. Damm F, Mylonas E, Cosson A, et al: Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov* 4:1088-1101, 2014
44. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al: Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 20:246-259, 2011
45. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, et al: Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in

- IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 127:303-309, 2016
46. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, 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
 47. Rossi D, Terzi-di-Bergamo L, De Paoli L, et al: Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 126:1921-1924, 2015
 48. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, et al: Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 27:4378-4384, 2009
 49. Kay NE, Geyer SM, Call TG, et al: Combination chemoimmunotherapy with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab shows significant clinical activity with low accompanying toxicity in previously untreated B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:405-411, 2007
 50. Robak T, Blonski JZ, Gora-Tybor J, et al: Cladribine alone and in combination with cyclophosphamide or cyclophosphamide plus mitoxantrone in the treatment of progressive chronic lymphocytic leukemia: Report of a prospective, multicenter, randomized trial of the Polish Adult Leukemia Group (PALG CLL2). *Blood* 108:473-479, 2006
 51. Montserrat E, Alcalá A, Parody R, et al: Treatment of chronic lymphocytic leukemia in advanced stages: A randomized trial comparing chlorambucil plus prednisone versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone. *Cancer* 56:2369-2375, 1985
 52. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, et al: Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1750-1757, 2000
 53. Byrd JC, Murphy T, Howard RS, et al: Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J Clin Oncol* 19:2153-2164, 2001
 54. Coiffier B, Lepage S, Pedersen LM, et al: Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: A phase 1-2 study. *Blood* 111:1094-1100, 2008
 55. Cartron G, de Guibert S, Dilhuydy M-S, et al: Obinutuzumab (GA101) in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: Final data from the phase 1/2 GAUGUIN study. *Blood* 124:2196-2202, 2014
 56. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, et al: Alectuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 25:5616-5623, 2007
 57. Woyach JA, Furman RR, Liu T-M, et al: Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 370:2286-2294, 2014
 58. Landau DA, Carter SL, Getz G, et al: Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia* 28:34-43, 2014
 59. Schuh A, Becq J, Humphray S, et al: Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood* 120:4191-4196, 2012
 60. Amin NA, Seymour E, Saiya-Cork K, et al: A quantitative analysis of subclonal and clonal gene mutations before and after therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 22:4525-4535, 2016
 61. Rasi S, Khiabani H, Ciardullo C, et al: Clinical impact of small subclones harboring NOTCH1, SF3B1 or BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 101:e135-e138, 2016
 62. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, et al: Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 29:877-885, 2015
 63. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al: TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 28:4473-4479, 2010
 64. Zenz T, Kröber A, Scherer K, 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
 65. Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al: Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 123:2139-2147, 2014
 66. Lazarian G, Tausch E, Eclache V, et al: TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes. *Int J Cancer* 139:1759-1763, 2016
 67. Landau DA, Tausch E, Böttcher S, et al: Quantitative clonal dynamics define mechanisms of CLL evolution in response to combination chemotherapy. *Blood* 126:362, 2015 (abstr)
 68. Guïeze R, Robbe P, Clifford R, et al: Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood* 126:2110-2117, 2015
 69. Cheng S, Guo A, Lu P, et al: Functional characterization of BTK(C481S) mutation that confers ibrutinib resistance: Exploration of alternative kinase inhibitors. *Leukemia* 29:895-900, 2015
 70. Liu TM, Woyach JA, Zhong Y, et al: Hyper-morphic mutation of phospholipase C, $\gamma 2$ acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. *Blood* 126:61-68, 2015
 71. Burger JA, Landau DA, Taylor-Weiner A, et al: Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun* 7:11589, 2016
 72. Byrd JC, Fuman RR, Coutre SE, et al: Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood* 125:2497-2506, 2015
 73. Winqvist M, Askild A, Andersson PO, et al: Real-world results of ibrutinib in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: Data from 95 consecutive patients treated in a compassionate use program—A study from the Swedish Chronic Lymphocytic Leukemia Group. *Haematologica* 101:1573-1580, 2016
 74. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, et al: Complex karyotype is a stronger predictor than del (17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer* 121:3612-3621, 2015
 75. Sutton LA, Ljungström V, Mansouri L, et al: Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: A high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. *Haematologica* 100:370-376, 2015
 76. Gawad C, Koh W, Quake SR: Single-cell genome sequencing: Current state of the science. *Nat Rev Genet* 17:175-188, 2016
 77. Hughes AEO, Magrini V, Demeter R, et al: Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia defined by single-cell sequencing. *PLoS Genet* 10:e1004462, 2014
 78. Saadatpour A, Lai S, Guo G, et al: Single-cell analysis in cancer genomics. *Trends Genet* 31:576-586, 2015
 79. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46:219-234, 1975
 80. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1840-1847, 1999
 81. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al: Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1848-1854, 1999
 82. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, et al: Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 29:329-336, 2015
 83. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al: Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121:1403-1412, 2013
 84. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, et al: The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 121:468-475, 2013
 85. International CLL-IPI Working Group: An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): A meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 17:779-790, 2016
 86. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, et al: SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia* 28:108-117, 2014
 87. Mansouri L, Cahill N, Gunnarsson R, et al: NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 27:512-514, 2013
 88. Cortese D, Sutton LA, Cahill N, et al: On the way towards a "CLL prognostic index": Focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia* 28:710-713, 2014
 89. Dreger P, Schnaiter A, Zenz T, 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
 90. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al: Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119:521-529, 2012
 91. Pozzo F, Bittolo T, Arruga 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
 92. Austen B, Powell JE, Alvi A, et al: Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 106:3175-3182, 2005
 93. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, et al: Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom

Novel Genomic Discoveries in CLL

Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol* 30:4524-4532, 2012

94. Herling CD, Klammüßner M, Rocha CK, et al: Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemimmunotherapy. *Blood* 128:395-404, 2016

95. Kärmpjärvi K, Järvinen TM, Heikkinen T, et al: Somatic MED12 mutations are associated with poor prognosis markers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* 6:1884-1888, 2015

96. Parker H, Rose-Zerilli MJ, Larroyo M, et al: Genomic disruption of the histone methyltransferase SETD2 in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 30:2179-2186, 2016

97. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bulinger L, et al: Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 374:2209-2221, 2016

98. Pospisilova S, González D, Malcikova J, et al: ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 26:1458-1461, 2012

99. Hallek M: Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 90:448-460, 2015

100. Dreger P, Conradini P, Kimby E, et al: Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 21:12-17, 2007

101. Stigienbauer S, Eichhorst B, Scheteig J, et al: Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: A multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* 17:768-778, 2016

Affiliations

All authors: Dana-Farber Cancer Institute; **Romain Guïèze** and **Catherine J. Wu**, Harvard Medical School; **Catherine J. Wu**, Brigham and Women's Hospital, Boston; **Romain Guïèze** and **Catherine J. Wu**, Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard, Cambridge, MA; **Gregory Lazarian**, U978 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny; and **Romain Guïèze**, Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand and Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

Connect With ASCO's Global Membership Community

ASCO is unique in that we are the only oncology organization that serves members from all subspecialties and professional roles. We are also a global community of members from over 150 countries that takes an inclusive approach to the pursuit of quality cancer care and progress.

In addition to exposure to our growing global network, ASCO membership offers you deep discounts on meeting registrations and premier publications like *Journal of Clinical Oncology (JCO)*, as well as a wide array of other benefits, including:

- Advance access to members' only registration and hotel reservations for ASCO's Annual Meeting
- Savings of 20% on ASCO University resources, including Maintenance of Certification (MOC) courses and mobile apps, ASCO-SEP[®], Virtual Meetings, and much more
- Access to our recently upgraded Membership Directory, which makes referring patients and connecting with colleagues easier than ever

For a full list of benefits specific to your membership category, visit asco.org/membership.

Not an ASCO member? Join today at join.asco.org.


American Society of Clinical Oncology

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to www.asco.org/rwc or ascopubs.org/jco/site/ifc.

Gregory Lazarian

No relationship to disclose

Romain Guèze

No relationship to disclose

Catherine J. Wu

Leadership: Neon Therapeutics

Stock or Other Ownership: Neon Therapeutics

Consulting or Advisory Role: Neon Therapeutics

Patents, Royalties, Other Intellectual Property: Neon Therapeutics

Annexe 3 : Prevalence of BTK and PLCG2 mutations in a real-life CLL cohort still on ibrutinib after 3 years: a FILO group study



LYMPHOID NEOPLASIA

Prevalence of *BTK* and *PLCG2* mutations in a real-life CLL cohort still on ibrutinib after 3 years: a FILO group study

Anne Quinquenel,^{1,2*} Luc-Matthieu Fornecker,^{2,3,4*} Rémi Letestu,^{4,6} Loïc Ysebaert,⁵ Carole Fleury,⁶ Grégory Lazarian,^{6,8} Marie-Sarah Dilhuydy,¹⁰ Delphine Nollet,¹¹ Romain Guieze,¹² Pierre Feugier,¹³ Damien Roos-Weil,^{14,15} Lise Willems,¹⁶ Anne-Sophie Michallet,¹⁷ Alain Delmer,^{1,2} Katia Hornigos,^{18,19} Vincent Levy,^{6,8} Florence Cymbalista,^{6,8,†} and Fanny Baran-Marszak,^{6,8,†} on behalf of the French Innovative Leukemia Organization (FILO) CLL Group

¹Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Reims, Hôpital Robert Debré, Reims, France; ²Université Reims Champagne-Ardenne, Unité de Formation et de Recherche (UFR) Médecine, Reims, France; ³Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁴INSERM 5-1113, Strasbourg, France; ⁵Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁶Groupe de Hôpitaux Universitaires Paris Seine-Saint-Denis (GHUPSSD), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Bobigny, France; ⁷Unité Mixte de Recherche (UMR) U978 INSERM, Bobigny, France; ⁸Université Paris 13, UFR Santé Médecine, Biologie Humaine (SMBH), Bobigny, France; ⁹Institut Universitaire du Cancer de Toulouse (IUCT)-Oncopole, Toulouse, France; ¹⁰CHU Bordeaux, Pessac, France; ¹¹CHU Tours, Tours, France; ¹²CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France; ¹³CHU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France; ¹⁴Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France; ¹⁵Sorbonne Universités-Université Pierre et Marie-Curie (UPMC), Université Paris 06, Groupe de Recherche Clinique (GRC)-11, Paris, France; ¹⁶Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France; ¹⁷Centre Léon Bérard, Lyon, France; ¹⁸Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) SNC5014, UMR-S1147 INSERM, Paris, France; and ¹⁹Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Université Paris Descartes, Paris, France

KEY POINTS

- In a real-life CLL cohort still on ibrutinib after 3 years, 57% of patients with residual clonal lymphocytosis had a *BTK* mutation.
- The presence of a *BTK* mutation in patients still on ibrutinib conferred a greater likelihood of subsequent CLL progression.

Mutational analyses performed following acquired ibrutinib resistance have suggested that chronic lymphocytic leukemia (CLL) progression on ibrutinib is linked to mutations in Bruton tyrosine kinase (*BTK*) and/or phospholipase C γ 2 (*PLCG2*) genes. Mutational information for patients still on ibrutinib is limited. We report a study aimed to provide a “snapshot” of the prevalence of mutations in a real-life CLL cohort still on ibrutinib after at least 3 years of treatment. Of 204 patients who initiated ibrutinib via an early-access program at 29 French Innovative Leukemia Organization (FILO) centers, 63 (31%) were still on ibrutinib after 3 years and 57 provided a fresh blood sample. Thirty patients had a CLL clone $\geq 0.5 \times 10^9/L$, enabling next-generation sequencing (NGS); *BTK* and *PLCG2* mutations were detected in 57% and 13% of the NGS samples, respectively. After median follow-up of 8.5 months from sample collection, the presence of a *BTK* mutation was significantly associated with subsequent CLL progression ($P = .0005$ vs no *BTK* mutation). Our findings support that mutational analysis should be considered in patients receiving ibrutinib who have residual clonal lymphocytosis, and that clinical trials are needed to evaluate whether patients with a *BTK* mutation may benefit from an early switch to another treatment. (*Blood*. 2019;134(7):641-644)

Introduction

The Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor ibrutinib has demonstrated efficacy in the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the relapsed/refractory^{1,2} and first-line^{3,4} settings. Long-term outcomes have mainly been evaluated in clinical trials.⁵⁻⁹ Data from real-life cohorts are only just starting to emerge.¹⁰⁻¹²

Mutational analyses performed following acquired ibrutinib resistance have suggested that CLL progression on ibrutinib is linked to mutations in the *BTK* and/or phospholipase C γ 2 (*PLCG2*) genes.¹³⁻¹⁹ However, mutational information for patients still on ibrutinib, without evidence of CLL progression, is limited.^{13,19} Uncertainty therefore remains about whether *BTK* and *PLCG2* mutations directly cause, and are sufficient for, ibrutinib resistance.²⁰

In France, ibrutinib became available as an early-access program (EAP) in 2014 and this has allowed its evaluation for prolonged

use in a real-life cohort. Here, we report a study conducted by the French Innovative Leukemia Organization (FILO) Group that gives a “snapshot” of the prevalence of mutations in patients from the French EAP still on ibrutinib after at least 3 years of treatment.

Study design

Twenty-nine FILO centers provided data for all patients who initiated ibrutinib via the French EAP between February 2014 and April 2015 and were still on ibrutinib after 3 years. Fresh blood samples were taken and sent to the Avicenne laboratory (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris [AP-HP], Bobigny, France) for central analyses. Flow cytometry techniques were used to determine presence of minimal residual disease, at a level of <1 CLL cell per 10 000 lymphocytes ($<10^{-4}$),²¹ and to determine CLL cell counts. For samples exhibiting a CLL clone $\geq 0.5 \times 10^9/L$, mutational profiling by next-generation sequencing

(NGS) was performed for *BTK*, *PLCG2*, *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *XPO1*, *RPS15*, *ATM*, *POT1*, *BIRC3*, and *FBXW7*. All *BTK* C481S samples with variant allele frequency (VAF) <10% by NGS were confirmed by droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR). Following sample collection, patients were followed for subsequent CLL progression (as assessed by the FILO local investigator) and treatment outcomes including event-free survival (event defined as a new treatment of CLL or death) and overall survival. Statistical analyses were by the Fisher exact test (for nominal variables) or the log-rank test (for survival outcomes).

The study was conducted in accordance with national ethical recommendations and the Declaration of Helsinki, and with written informed patient consent.

Additional study details are provided in the supplemental Study protocol and supplemental Methodological details (available on the Blood Web site).

Results and discussion

Of 204 patients who received ibrutinib via the French EAP at 29 FILO centers, 63 (31%) were still on ibrutinib after at least 3 years of treatment, and 57 provided fresh blood samples (supplemental Figure 1). Considering these 57 patients, the median time between ibrutinib initiation and sample collection was 3.5 years (range, 2.8-4.2 years) (Table 1). Most patients had adverse prognostic factors. All but 3 patients (each with 17p deletion) had received previous treatment (median 2 lines), usually including immunochemotherapy or alemtuzumab. Despite 3 years on ibrutinib, 13% of patients (7 of 55 with response data) had partial response with lymphocytosis²² and all 57 patients exhibited detectable minimal residual disease (>10⁻⁴).

Our study is original in providing a snapshot of the mutational profile of patients still on ibrutinib in the real-life setting at a definite long-term time point. Most previous mutational analyses were performed in patients with acquired ibrutinib resistance.¹³⁻¹⁹ To our knowledge, only 1 previous study prospectively examined *BTK* and *PLCG2* mutations longitudinally; patients were recruited from 4 clinical trials and the data were published at a maximum 9-month time point.¹³ In our study, 30 blood samples exhibited a CLL clone $\geq 0.5 \times 10^9/L$, allowing mutational profiling by NGS (Figure 1A). The mutations detected were in line with previous reports in patients with acquired ibrutinib resistance, with no new mutations seen. One-half of the patients tested by NGS (15 of 30) had a *TP53* mutation. At least 1 *BTK* mutation (total 20 mutations; all at C481, 14 at C481S) occurred in 17 of 30 patients (57%) and the VAF range was wide (0.2%-73%) (supplemental Table 1). ddPCR confirmation of C481S samples with negative or low VAF by NGS showed high concordance, with only 1 case detected by ddPCR (VAF, 0.37%) but not NGS (supplemental Table 2). Most patients (14 of 17) had a single *BTK* mutation, and there were no statistically significant associations between presence of a *BTK* mutation and the number of previous treatment lines (0 of 1 vs ≥ 2), need for transient interruptions or dose reductions (supplemental Table 3), or presence of any other mutations. At least 1 *PLCG2* mutation (total 7 mutations) occurred in 4 of 30 patients (13%) and the VAF was low (1%-11%). Strikingly, 3 of the 4 patients had 2 *PLCG2* mutations, and all 4 also presented with a *BTK* mutation and a *TP53* mutation. The high prevalence of *BTK* mutations, with or

Table 1. Patient characteristics

Characteristic	Result, N = 57*
Age at ibrutinib initiation, median (range), y	67.7 (46.9-84.1)
Male/female, n/n, (ratio)	39/18 (2.2)
Prognostic factors, n/N (%)	
11q deletion	18/40 (45)
17p deletion	20/47 (43)
Unmutated IGHV	34/38 (89)
Previous lines, median (range)	2 (0-5)
Previous lines, n (%)	
FCR or BR	46 (81)
Alemtuzumab plus or minus dexamethasone	9 (16)
Chlorambucil plus or minus anti-CD20	14 (25)
Other	25 (44)
Best response on ibrutinib therapy, investigator reported, n/N (%)	
PR	48/55 (87)
PRi	7/55 (13)
Transient dose interruption >7 d, n/N (%)	20/55 (37)
Dose reduction, n/N (%)	23/55 (42)

BR, bendamustine plus rituximab; FCR, fludarabine plus cyclophosphamide plus rituximab; IGHV, immunoglobulin heavy chain variable gene; PR, partial response; PRi, partial response with lymphocytosis.

*Except where otherwise stated.

without *PLCG2* mutations, suggests that patients can harbor these mutations even when they are still benefiting clinically from ibrutinib. In support of this, the previous prospective longitudinal study reported that of 8 patients who experienced clinical relapse, all had a *BTK* mutation before relapse, and that a *BTK* mutation was also detected in 8 additional patients (the *PLCG2* mutational status of patients was not stated).¹³ Furthermore, a retrospective analysis using stored samples from a clinical trial found that of 9 patients with a *BTK* and/or *PLCG2* mutation detected at CLL progression, 6 had detectable mutations that predated the progression.¹⁹

During the follow-up for subsequent CLL progression in our study, at a median 8.5 months from sample collection, only 38 patients (19% of the 204 initially treated) remained on ibrutinib. The drop from 28% at sample collection suggests that a noteworthy proportion of patients experience CLL progression between the third and fourth year on ibrutinib treatment. Considering the 27 patients with CLL clones $< 0.5 \times 10^9/L$, 4 subsequently progressed (supplemental Figure 2). Of 2 patients mutationally profiled at relapse, 1 had both *BTK* and *PLCG2* mutations and the other had a *BTK* mutation only. By contrast, considering the 30 patients with a CLL clone $\geq 0.5 \times 10^9/L$, presence of a *BTK* mutation was significantly associated with subsequent CLL progression ($P = .0005$ vs no *BTK* mutation) (Figure 1B). Among the 17 patients with a *BTK* mutation, 14 subsequently progressed (1 had Richter syndrome); 3 progressors remained on ibrutinib, 9 received venetoclax (5 of 7 evaluable had an objective response), and 2 died without further treatment. Among the 13 patients with no *BTK* mutation, only 2 progressed: one died without further treatment and the other received venetoclax. The event-free survival

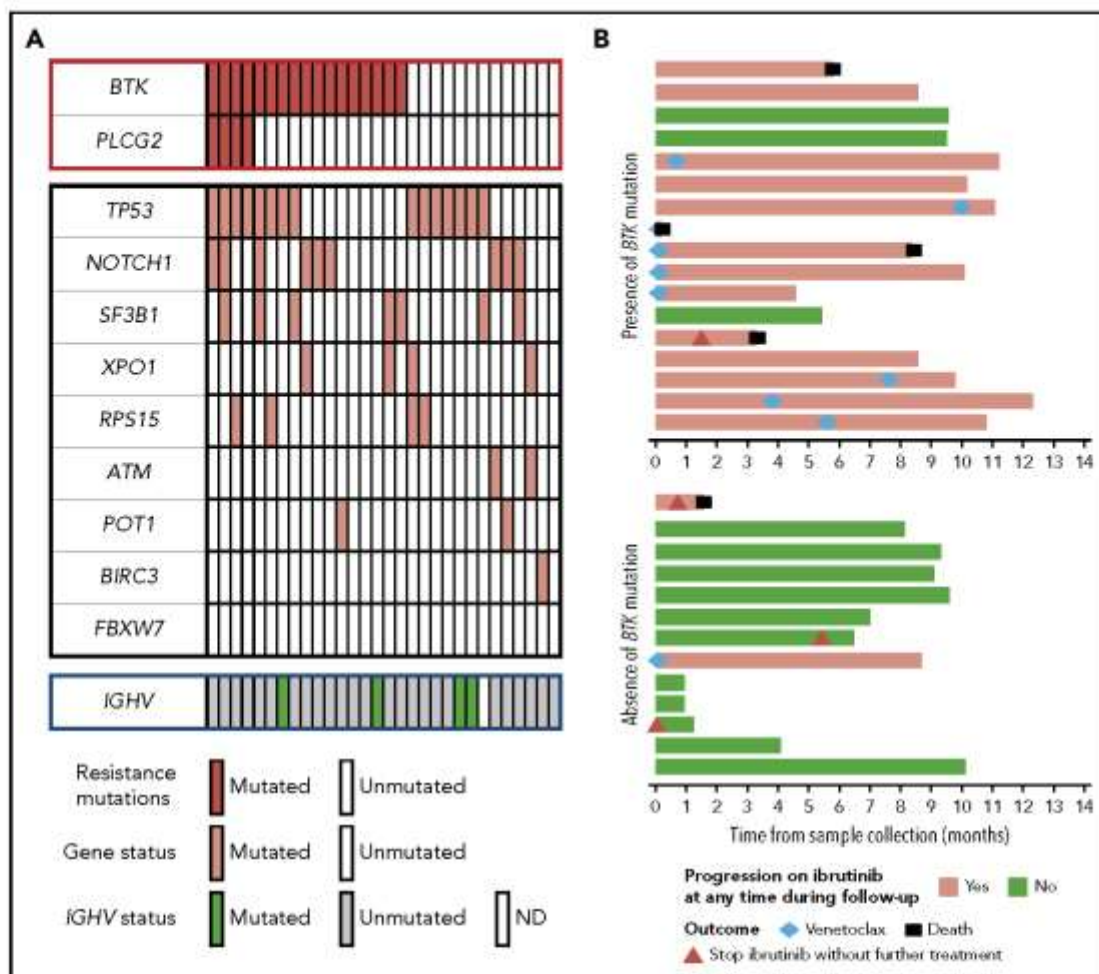


Figure 1. Findings in patients with CLL clone $\geq 0.5 \times 10^9/L$ (N = 30). (A) Mutational profile, by NGS. Each column represents a patient. BTK mutations had no association with TP53 mutations or other mutations. PLCG2 mutations were all associated with BTK mutations and TP53 mutations. (B) Outcomes subsequent to sample collection in presence (n = 17) or absence (n = 13) of BTK mutations, with regard to CLL progression and treatment. Each bar represents a patient. IGHV, immunoglobulin heavy chain variable gene; ND, not determined.

was significantly shorter in patients with a BTK mutation ($P = .0380$ vs no BTK mutation), but there was no difference in terms of overall survival (supplemental Figure 3).

In conclusion, in this real-life CLL cohort of 57 patients still on ibrutinib after 3 years, over one-half of patients (57%) with a CLL clone $\geq 0.5 \times 10^9/L$ had a BTK mutation, and presence of a BTK mutation conferred a greater likelihood of subsequent CLL progression. These findings support that mutational analysis should be considered in patients receiving ibrutinib who have residual clonal lymphocytosis, and that clinical trials are needed to evaluate whether patients with a BTK mutation may benefit from an early switch to another treatment. A new generation of noncovalent BTK inhibitor that does not interact with the BTK C481 site is of interest.²⁹

Acknowledgments

The authors thank Guillaume Cartron (Montpellier), Sophie De Guibert (Rennes), Charles Herbeux (Lille), Benedicte Hivert (Lens), Véronique

Leblond (Paris Pitié Salpêtrière), Katell le Du (Le Mans), Stéphane Leprière (Rouen), Fathia Merabet (Versailles), David Sibon (Paris Necker), Malgorzata Truchan-Graczyk (Angers), and Maud Volcine (La Roche sur Yon), who provided both clinicobiological information and samples from their patients. The authors thank Marie-Christine Bene (Nantes) for database creation. The authors thank Judy A. Fox and Pietro Tavema (Sunesis Pharmaceuticals, Inc) for reviewing and editing the manuscript.

This work was supported by Sunesis Pharmaceuticals, Inc and the Force Hemato (Fonds De Recherche Clinique en Hématologie) Foundation. Sunesis Pharmaceuticals, Inc kindly provided funding for the writing assistance.

Authorship

Contribution: A.Q., L.M.-F., F.C., and F.B.-M. conceived the study and wrote the manuscript; R.L., C.F., G.L., K.H., and F.B.-M. performed biological analyses; L.Y., M.-S.D., D.N., R.G., P.F., D.R.-W., L.W., A.-S.M., and A.D. provided blood samples and collected data from their patients; and V.L. performed statistical analyses.

Conflict-of-interest disclosure: A.Q., L.Y., R.G., A.-S.M., A.D., V.L., and F.C. declared travel grants and honoraria from Janssen, Gilead, Roche, and

AbbVie. R.L. declared travel grants and honoraria from Janssen, Roche, and AbbVie. M.-S.D. declared travel grants and honoraria from Janssen and AbbVie. L.-M.F. declared travel grants and honoraria from Janssen, Gilead, and Roche. The remaining authors declare no competing financial interests.

A complete list of the members of the FILO CLL Group appears in "Appendix."

ORCID profiles: A.Q., 0000-0002-3666-3442; D.R.-W., 0000-0002-7767-755X; A.D., 0000-0002-1430-2574.

Correspondence: Anne Quinqueneil, MCU-PH, Hématologie Clinique, CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Rue du général Koenig, 51092 Reims, France; e-mail: aquinqueneil@chu-reims.fr.

Footnotes

Submitted 29 March 2019; accepted 1 June 2019. Prepublished online as Blood First Edition paper, 26 June 2019; DOI 10.1182/blood.2019000854.

*A.Q. and L.-M.F. contributed equally to this study.

†F.C. and F.B.-M. contributed equally to this study.

Presented in abstract form at the 60th annual meeting of the American Society of Hematology, San Diego, CA, 1-4 December 2018.

For original data, please contact florence.cymbalista@aphp.fr.

The online version of this article contains a data supplement.

REFERENCES

- Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia [published correction appears in *N Engl J Med*. 2014; 370(8):786]. *N Engl J Med*. 2013;369(1):32-42.
- Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, et al; RESONATE Investigators. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2014; 371(3):213-223.
- O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15(1):48-58.
- Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al; RESONATE-2 Investigators. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(25): 2425-2437.
- Brown JR, Hillmen P, O'Brien S, et al. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia*. 2018;32(1):83-91.
- Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*. 2015; 125(16):2497-2506.
- Coutre SE, Furman RR, Flinn IW, et al. Extended treatment with single-agent ibrutinib at the 420 mg dose leads to durable responses in chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(5):1149-1155.

- O'Brien S, Furman RR, Coutre S, et al. Single-agent ibrutinib in treatment-naïve and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. *Blood*. 2018;131(17):1910-1919.
- Barr PM, Robak T, Owen C, et al. Sustained efficacy and detailed clinical follow-up of first-line ibrutinib treatment in older patients with chronic lymphocytic leukemia: extended phase 3 results from RESONATE-2. *Haematologica*. 2018;103(9):1502-1510.
- Mato AR, Hill BT, Lamanna N, et al. Optimal sequencing of ibrutinib, idelalisib, and venetoclax in chronic lymphocytic leukemia: results from a multicenter study of 683 patients. *Ann Oncol*. 2017;28(5):1050-1056.
- Mato AR, Roeker LE, Allan JN, et al. Outcomes of front-line ibrutinib treated CLL patients excluded from landmark clinical trial. *Am J Hematol*. 2018;93(11):1394-1401.
- Winqvist M, Andersson PO, Asklid A, et al; Swedish CLL Group. Long-term real-world results of ibrutinib therapy in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: 30-month follow up of the Swedish compassionate use cohort [published online ahead of print 4 December 2018]. *Haematologica*. 2019;104(5):e208-e210.
- Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, et al. BTKC481S-mediated resistance to ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(13):1437-1443.
- Woyach JA, Furman RR, Liu TM, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014;370(24):2286-2294.
- Furman RR, Cheng S, Lu P, et al. Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia [published correction appears in *N Engl*

- J Med*. 2014;370(26):2547]. *N Engl J Med*. 2014;370(24):2352-2354.
- Kanagal-Shamanna R, Jain P, Patel KP, et al. Targeted multigene deep sequencing of Bruton tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic lymphocytic leukemia with disease progression and Richter transformation. *Cancer*. 2019;125(4):559-574.
- Landau DA, Sun C, Rosebrock D, et al. The evolutionary landscape of chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib targeted therapy. *Nat Commun*. 2017;8(1):2185.
- Sharma S, Galanina N, Guo A, et al. Identification of a structurally novel BTK mutation that drives ibrutinib resistance in CLL. *Oncotarget*. 2016;7(42):68833-68841.
- Ahn IE, Underbayev C, Albitar A, et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017; 129(11):1469-1479.
- Lampson BL, Brown JR. Are BTK and PLOG2 mutations necessary and sufficient for ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia? *Expert Rev Hematol*. 2018;11(3):185-194.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018; 131(25):2745-2760.
- Cheson BD, Byrd JC, Rai KR, et al. Novel targeted agents and the need to refine clinical end points in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30(23):2820-2822.
- Thompson PA, Burger JA. Bruton's tyrosine kinase inhibitors: first and second generation agents for patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(1):31-42.