

4011

UNIVERSITE PARIS 13 NORD  
UFR de SANTE, MEDECINE et BIOLOGIE HUMAINE

ECOLE DOCTORALE GALILEE

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13**

*Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire*

---

**Population B régulatrice dans la leucémie lymphoïde chronique : phénotype et interactions fonctionnelles avec les lymphocytes T en lien avec l'évolutivité**

---

présentée et soutenue publiquement par

**Arsène MEKINIAN**

06/01/2017

**MEMBRES DU JURY :**

*Président*

Xavier Troussard

*Rapporteur*

Pierre Bobé

*Rapporteur*

Jozo Delic

*Examineur*

Olivier Fain

*Co-Directrice de Thèse*

Christine Le Roy

*Directrice de Thèse*

Nadine Varin Blank

## **Remerciements**

*A Monsieur le Professeur Xavier TROUSSARD*

Recevez mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de faire partie de mon jury et de présider cette thèse de science.

*A Monsieur le Docteur Pierre BOBE*

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

*A Monsieur le Docteur José DELIC*

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

*A Monsieur le Professeur FAIN*

Je vous remerciais jamais assez de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidé et soutenu depuis toutes ces années, et pour l'honneur que je ressens d'être à vos côtés au quotidien.

*A Madame le Docteur Christine LE ROY*

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

*A Madame le Docteur Nadine VARIN-BLANK*

Toute ma reconnaissance pour m'avoir initié à la science, de m'avoir porté, pour la confiance éternelle et la bonne humeur, et tout mon respect pour la force d'être partout en même temps.

A toute l'équipe du Laboratoire, pour votre bonne humeur, votre disponibilité et votre assistance aussi bien matérielle que morale.

A ma chère Stéphanie, pour tout le soutien depuis toujours et l'amour au quotidien.

A mes filles Anaïs et Camille, pour le bonheur d'être à leurs côtés.

A mes parents, pour avoir toujours été à mes côtés et ma mère à qui je dois tout.

## *Table des Matières*

1	INTRODUCTION.....	2
<b>1.1</b>	<b>Leucémie lymphoïde chronique : épidémiologie, présentation clinique, diagnostic et classification.....</b>	<b>4</b>
1.1.1	Epidémiologie .....	4
1.1.2	Présentation clinique .....	4
1.1.3	Marqueurs pronostiques de LLC .....	8
1.1.4	Traitement de la LLC .....	11
<b>1.2</b>	<b>Ontogénèse des lymphocytes B chez l'homme .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>Lymphocytes B1.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4</b>	<b>Physiopathologie de la LLC .....</b>	<b>26</b>
1.4.1	Origine cellulaire des lymphocytes B de LLC.....	26
1.4.2	Rôle de la stimulation antigénique du BCR.....	27
1.4.3	Prolifération et augmentation de survie des cellules B-LLC .....	30
1.4.4	Importance du microenvironnement dans la LLC .....	30
1.4.5	La migration des lymphocytes B-LLC .....	32
<b>1.5</b>	<b>Lymphocytes B régulateurs.....</b>	<b>36</b>
1.5.1	Lymphocytes B régulateurs chez la souris .....	36
1.5.2	Lymphocytes B régulateurs chez l'homme .....	38
1.5.2.1	Phénotype des Lymphocytes B régulateurs .....	38
1.5.2.2	Voies d'induction ou d'activation de la capacité régulatrice des lymphocytes B .....	45
1.5.2.3	Mécanismes d'action des lymphocytes B régulateurs : sécrétion de cytokines immunomodulatrices .....	50
1.5.2.4	Autres mécanismes d'action des B régulateurs .....	53
<b>1.6</b>	<b>Immunorégulation dans la LLC .....</b>	<b>55</b>
2	OBJECTIFS.....	61
3	RESULTATS .....	64
4	DISCUSSION ET P .....	116
5	CONCLUSIONS .....	126
6	BIBLIOGRAPHIE.....	128

## *Table des Illustrations*

**Tableau 1.** Signature membranaire spécifique dans la LLC.

**Tableau 2.** Score de Matutes.

**Tableau 3.** Classifications de Binet de Rai.

**Tableau 4.** Différents phénotypes de lymphocytes B régulateurs chez la souris et chez l'homme.

**Figure 1.** Les étapes essentielles de l'ontogénèse des lymphocytes B.

**Figure 2.** La synthèse du BCR e les différents précurseurs du lymphocyte B.

**Figure 3.** La synthèse du BCR.

**Figure 4.** Les différents types de réponses T-dépendantes et indépendantes.

**Figure 5.** La formation des centres germinatifs, l'hypermutation somatique et le switch isotypique.

**Figure 6.** Phénotypes des lymphocytes B-1, B-2 et des lymphocytes B régulateurs chez la souris.

**Figure 7.** La réponse à la stimulation du BCR *in vitro* identifie 2 groupes de patients.

**Figure 8.** Différence de niveaux d'expression de protéines de signalisation.

**Figure 9.** Survie des patients dont les lymphocytes répondent ou non à la stimulation du BCR *in vitro*.

**Figure 10.** Différents signaux de survie exprimés par des lymphocytes T et les « nurses-like cells ».

**Figure 11.** Trafic intra-ganglionnaire des lymphocytes T et B.

**Figure 12.** Modèle d'interaction des lymphocytes B clonaux avec leur environnement dans la LLC : facteurs prédictifs d'une maladie évolutive.

**Figure 13.** Lymphocytes B régulateurs CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> et inhibition des sécrétions des monocytes et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par ces lymphocytes B.

**Figure 14.** Lymphocytes B régulateurs CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> + et inhibition des sécrétions des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par ces lymphocytes B.

**Figure 15.** Phénotype des lymphocytes B régulateurs CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup>.

**Figure 16.** Phénotype de lymphocytes B régulateurs CD11b<sup>+</sup>.

**Figure 17.** Voies effectrices des différents facteurs immunorégulateurs produits par les lymphocytes B.

**Figure 18.** Les voies de signalisation induite par la stimulation du BCR.

**Figure 19.** Voies de signalisation des TLRs.

**Figure 20.** Production d'IL-10 par les lymphocytes B CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> et inhibition des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

**Figure 21.** Expression de FOXP3 par les lymphocytes B.

**Figure 22.** Capacité de sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B LLC.

**Figure 23.** Phénotype des lymphocytes B CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>low</sup> et sécrétion de l'IL-10 et de TGF-β1 par rapport aux cellules B CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>

**Figure 24.** Evolution de la sécrétion de l'IL-10, de TGF-β1 et de FOXP3 sous ibrutinib.

**Figure 25.** Evolution de la sécrétion de l'IL-10, de TGF-β1 et de FOXP3 sous ibrutinib : comparaison des sous-populations CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> et CD19<sup>interm</sup>CD5<sup>interm</sup>.

## *Liste des abréviations*

Ag: antigène

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

BAFF : B-cell activating factor

BCR : Récepteur B à l'antigène

B-LLC : lymphocyte B de LLC

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CXCL12 : C-X-C motif chemokine 12 (ou SDF1: Stromal Cell-Derived Factor 1)

CXCR4 : C-X-C Chemokine Receptor Type 4

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN : Interferon

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif

LAT : Linker of Activated T cell

Lck : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NFκB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

Pi3K : Phosphoinositide-3 kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate

PIP5K : phosphatidyl-inositol-4 phosphate- 5 kinase

PKC : Protéine Kinase C

PLCγ : Phospholipase C gamma

PMA : Phorbol Myristate Acetate

STAT3 : Signal Transducer And Activator Of Transcription 3

Syk : Spleen tyrosine kinase

TCR : Récepteur T à l'antigène

TGF-β1 : Transforming Growth Factor Beta 1

TFH : Lymphocyte T follicular helper

TK : thymidine kinase

TNF-α : tumor necrosis factor α

Zap-70 : Zeta-chain-associated protein kinase 70





## **1 INTRODUCTION**

---

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est l'une des hémopathies les plus fréquentes dans les pays occidentaux, avec près de 15000 nouveaux cas par an. Elle est caractérisée par une accumulation progressive de lymphocytes B monoclonaux matures dans le sang, la moelle et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate) (1). L'une des caractéristiques de la LLC est le profil d'évolution clinique extrêmement hétérogène, avec une majorité de patients asymptomatiques ayant une survie similaire aux sujets sains du même âge et sexe. En revanche, certains patients ont une maladie progressive, avec une augmentation des adénopathies et une aggravation des cytopénies, nécessitant le recours à un traitement spécifique. La caractérisation des facteurs pronostiques prédictifs, afin de mieux identifier les patients à risque de progression, est une priorité clinique et thérapeutique dans la LLC. Actuellement aucun traitement curatif de cette maladie n'est disponible, mais la caractérisation des mécanismes responsables de la progression, l'importance du microenvironnement pour la survie des lymphocytes B monoclonaux et la compréhension des mécanismes immunorégulateurs favorisant la progression tumorale ont ouvert une nouvelle ère d'immunothérapie ciblée dans cette pathologie.



## **1.1 Leucémie lymphoïde chronique : épidémiologie, présentation clinique, diagnostic et classification**

---

### **1.1.1 Epidémiologie**

---

La LLC est l'une des plus fréquentes hémopathies de l'adulte en Europe et en Amérique du Nord, alors qu'elle est rare sur le continent asiatique. La LLC représente 25 à 30% de toutes les leucémies et environ 15000 nouveaux cas sont diagnostiqués chez les adultes aux Etats-Unis chaque année. La LLC est exceptionnelle en dessous de 50 ans, et l'âge médian au diagnostic est de 70 ans chez les hommes et 74 ans chez les femmes.

Les facteurs environnementaux ne semblent pas être particulièrement impliqués dans la pathogénie de la maladie. Ainsi, il n'y a pas de lien démontré entre l'apparition de la LLC et les expositions aux composants chimiques ou à l'irradiation, excepté un herbicide particulier utilisé au Vietnam. D'autre part, l'incidence de la LLC reste similaire dans les populations migrantes et dans leur descendance, ce qui semble exclure un rôle, du moins prédominant, des facteurs environnementaux dans la pathogénèse de l'hémopathie.

En revanche, des données épidémiologiques montrent une prédisposition familiale dans 5 à 10 % des cas de LLC. Les parents de premier degré ont 3 fois plus de risque de développer une LLC ou une autre hémopathie lymphoïde. Une population B monoclonale circulante inférieure à  $4 \times 10^9$  lymphocytes/L est présente chez 14-18% des parents de sujets atteints de LLC, alors qu'elle est retrouvée chez 3,5% des sujets sains.

### **1.1.2 Présentation clinique**

---

Une hyperlymphocytose sanguine persistante est le mode de révélation le plus fréquent de découverte, le plus souvent fortuite à l'occasion d'un bilan sanguin systématique ou réalisé pour une autre raison. Les autres présentations sont les adénopathies symétriques indolores et la découverte de cytopénies périphériques, qu'elles soient symptomatiques ou de découvertes fortuites sur un hémogramme sanguin. Environ 10% des patients se présentent avec des symptômes de type fièvre inexplicée, une perte de poids >10% dans les 6 mois ou des

sueurs. L'examen clinique peut révéler des adénopathies périphériques indolores et symétriques, une splénomégalie et une hépatomégalie dans 20-50% des cas.

- **Hyperlymphocytose sanguine**

L'hyperlymphocytose sanguine supérieure à  $5 \times 10^9$  lymphocytes/L, persistante sur plusieurs semaines, est constante et constitue un critère nécessaire au diagnostic de LLC. Cette lymphocytose peut être très variable d'un patient à l'autre, en moyenne de  $30 \times 10^9$  lymphocytes/L, mais peut être encore plus importante ( $> 200 \times 10^9$ /L).

L'examen morphologique du frottis sanguin constitue une étape importante et montre de petits lymphocytes matures très proches du lymphocyte normal. Ces lymphocytes présentent néanmoins des atypies, telles qu'une chromatine moins dense, disposée en grosses mottes et sans nucléole visible. Le myélogramme et la biopsie ostéomédullaire sont rarement nécessaires, du fait d'un immunophénotype caractéristique de ces cellules détecté en cytométrie en flux.

- **Immunophénotype de la LLC**

L'immunophénotypage à l'aide de la cytométrie en flux des lymphocytes circulants est actuellement essentiel au diagnostic de LLC. Il s'agit de lymphocytes B, exprimant le marqueur classique CD19. L'expression de deux autres marqueurs de surface, le CD5 et le CD23, est constante et très caractéristique de la LLC. Par ailleurs, l'expression du CD20 est habituellement faible, à la différence des lymphocytes B normaux. De même, l'expression des immunoglobulines membranaires, habituellement de type IgM  $\pm$  IgD (rarement IgG ou IgA), est faible sur les lymphocytes B-LLC. L'origine clonale de ces lymphocytes est confirmée par l'expression prédominante d'une seule chaîne légère d'immunoglobulines, kappa ou lambda.

Néanmoins, aucun de ces marqueurs n'est pathognomonique de la LLC, le CD5 par exemple étant également exprimé dans les lymphomes à cellules du manteau (une catégorie de lymphome non-hodgkinien) et dans environ la moitié des leucémies prolymphocytaires.

Un score simple basé sur l'expression de ces marqueurs a été défini pour aider à la discrimination de la LLC des autres hémopathies lymphoïdes: le score de Matutes. Il donne une valeur de 1 à chacun des éléments suivants: expression de CD5, de CD23, absence d'expression de FMC7, de CD22 (ou CD79B), faible expression d'une immunoglobuline

membranaire monotypique (kappa dans 60% des cas et lambda dans 40% des cas) (**Tableaux 1-2**). La LLC se définit par un score de Matutes supérieur ou égal à 4.

Ces critères sont repris par le National Cancer Institute-Working group (NCI-WG) pour lequel le diagnostic de LLC est retenu en présence (1) d'une lymphocytose  $>5000 \times 10^9/L$  constituée de petits lymphocytes matures, persistante depuis plus d'un mois ; (2) un immunophénotype par cytométrie de flux avec une expression d'une seule chaîne légère d'immunoglobulines (kappa ou lambda), une co-expression des marqueurs CD19, CD5 et CD23, une expression faible des immunoglobulines membranaires et une expression faible, voire absence, d'expression de CD79B.

**Tableau 1. Signature membranaire spécifique dans la LLC.**

Marqueurs de surface	Ig	CD19	CD5	CD23	CD22	CD79	CD10	CD25
<i>LLC</i>	Faible	+	+	+	-	-	-	inconstante
<i>Lymphome folliculaire</i>	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>Lymphome du manteau</i>	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>Maladie de Waldenstrom</i>	Normale ou augmentée	+	-	-	+ faible	+	-	-

**Tableau 2. Score de Matutes.**

Marqueurs	Présence=1	=0
Expression des immunoglobulines	faible	normale
CD5	+	-
CD23	+	-
FMC7	-	+
CD22/CD79b	faible	normale

- **Classification clinique**

Plusieurs systèmes de classification clinique existent, basés sur l'examen clinique et la présence de masses prolifératives ; les classifications de Rai et Binet étant les plus utilisées. Ces classifications permettent principalement de définir des sous-groupes de patients avec une survie différente et servent ainsi à définir les patients nécessitant un recours à un traitement spécifique (**Tableau 3**). Ces classifications n'intègrent pas des facteurs pronostiques tels que le statut mutationnel des immunoglobulines, l'expression de CD38 ou ZAP-70 ou les anomalies chromosomiques et, ne permettent pas de définir les patients ayant un risque de progression.

Tableau 3. Classifications de Binet et Rai.

Stade	Risque	Caractéristiques	Survie globale (ans)
<b>RAI</b>			
<b>0</b>	Faible	Hyperlymphocytose isolée	>10
<b>I/II</b>	Intermédiaire	Adénopathies et/ou hépatosplénomégalie	7
<b>III/IV</b>	Haut	Anémie et/ou thrombopénie	<4
<b>BINET</b>			
<b>A</b>	Faible	<3 aires de polyadénopathies	12
<b>B</b>	Intermédiaire	≥3 aires de polyadénopathies	7
<b>C</b>	Haut	Anémie et/ou thrombopénie	2-4

### 1.1.3 Marqueurs pronostiques de LLC

La LLC se caractérise par l'accumulation progressive dans les organes lymphoïdes de lymphocytes B clonaux. Les données récentes ont permis de montrer sur le plan moléculaire l'hétérogénéité de la LLC, en décrivant les différences des niveaux d'expression du CD38 et de ZAP-70, ainsi que du statut mutationnel des gènes des immunoglobulines.

Les mutations des gènes d'immunoglobulines sont détectées en comparant les séquences d'ADN des lymphocytes B avec celles des gènes *germline*. Une séquence présentant une différence  $\geq 2\%$  avec le *germline* définit des patients avec un profil muté alors qu'une séquence  $< 98\%$  caractérise des patients non-mutés. Les gènes V des immunoglobulines sont

non-mutés (identiques aux gènes *germline*) dans un peu moins de la moitié des cas et présentent des mutations somatiques dans l'autre moitié.

ZAP-70 est une protéine intracellulaire impliquée dans la transduction du signal activée par les lymphocytes T et NK après la rencontre avec l'antigène. Son expression est habituellement restreinte aux lymphocytes T et NK, mais une expression de ZAP-70 a été montrée dans les lymphocytes B clonaux de LLC (2). L'expression de ZAP-70 par les lymphocytes B-LLC participerait à la transduction du signal délivré après la rencontre avec l'antigène. Bien que l'expression de ZAP-70 dans la LLC soit considérée de mauvais pronostic, une étude prospective récente a montré que cette expression est variable au cours du temps et ne semble pas être un facteur pronostique indépendant (3). En revanche, aucun lien direct entre son activation et la progression n'a été caractérisé.

Le CD38 est un marqueur membranaire, exprimé par les cellules stromales et les "nurse-like cells". Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type II, dotée d'une activité enzymatique qualifiée de NAD glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase ou encore ADP-ribose cyclique hydrolase, impliquée dans le métabolisme de l'ADP. La molécule CD38 est exprimée sur les lymphocytes T, B et NK. Sa présence a également été rapportée sur les monocytes, au niveau desquels elle peut s'associer avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II et jouer le rôle de corécepteur dans l'activation des cellules T induite par les superantigènes (4). L'expression de CD38 est associée avec un pronostic péjoratif, bien que son expression puisse varier au cours du temps dans la LLC. D'autre part, le seuil de positivité et la valeur pronostique indépendante de ce facteur restent controversés. L'expression de CD38 n'est pas parfaitement corrélée au statut mutationnel des lymphocytes B-LLC (5, 6, 7).

Ces différences d'expression de marqueurs au niveau des clones LLC ont permis de distinguer deux sous-groupes de patients : ceux ayant un profil d'évolution agressif, exprimant ZAP-70, le CD38, les gènes non-mutés d'immunoglobulines et, ceux avec un profil d'évolution non-évolutif, le plus souvent stables avec une pathologie indolente, présentant un clone muté pour les gènes d'immunoglobulines, n'exprimant pas ZAP-70 et avec des niveaux faibles de CD38 membranaire.

Les anomalies chromosomiques sont fréquentes dans la LLC et les nouvelles techniques de cytogénétique (FISH sur les cellules interphasiques) ont montré que plus de 80% des patients testés présentent des anomalies. Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes sont



représentées par la délétion 13q (55%), la délétion 11q (où est localisé l'oncogène ATM, 18%), la trisomie 12 (16%) et la délétion 17p (délétion p53, 7%) (8). Certaines de ces anomalies pourraient être corrélées au pronostic et en particulier à la survie des patients. Ainsi les patients porteurs d'une délétion 13q (43% des stades A étudiés) ont une meilleure survie, même en comparaison avec les patients porteurs d'un caryotype normal. Les patients avec une délétion 17p ont un mauvais pronostic et la présence de la délétion 17p serait prédictive d'un état réfractaire aux agents alkylants et aux analogues des purines. Des mutations génétiques récemment décrites chez les patients LLC, tel que celles touchant TP53, NOTCH1, SF3B1 et BIRC3 pourraient s'ajouter aux facteurs pronostiques habituels et mieux sélectionner les sous-groupes de patients avec une évolution différente (9, 10). Parmi 278 patients LLC, seuls SF3B1, TP53 et RPS15 étaient significativement associés avec la survie globale sans progression (11). Ainsi, parmi 123 patients LLC avec une maladie progressive, des mutations de NOTCH1 ont été mis en évidence dans 16% des cas, associées avec un profil d'immunoglobulines non-muté, le statut CD38(+) et ZAP-70(+). La réponse hématologique au traitement était significativement moins fréquente chez les patients avec une mutation de NOTCH1 (40% versus 80% en l'absence de mutation NOTCH1) (12). La présence de plusieurs des mutations, notamment de 2 ou plus mutations des gènes TP53, SF3B1, and ATM était associée avec une survie de 12 mois versus 22.5 mois chez les patients avec moins de 2 mutations combinées ( $p = 0.003$ ) (13).

La thymidine kinase (TK) est une enzyme cellulaire impliquée dans la réparation de l'ADN au cours de sa synthèse. Cette enzyme intracellulaire contrôle la phosphorylation de la déoxythymidine en déoxythymidine monophosphate, ensuite incorporée sous forme triphosphate dans l'ADN. L'activité de la TK sérique serait corrélée au nombre de cellules en division et ainsi indirectement pourrait refléter la masse tumorale (14, 15). Ainsi, le taux sérique de TK élevé est associé avec une survie diminuée et serait prédictif de progression chez les patients au stade A.

La  $\beta$ 2m est une protéine extracellulaire de la superfamille des immunoglobulines, associée aux chaînes  $\alpha$  des molécules du CMH de classe I. Les patients avec un taux de  $\beta$ 2m élevé auraient une survie diminuée, bien que la  $\beta$ 2m ne soit pas un facteur indépendant de survie (16).

Le temps de doublement des lymphocytes est le temps pendant lequel le taux de lymphocytes sanguins est multiplié par deux. Les patients avec un temps de doublement inférieur à 12 mois ont une survie moindre et une progression de la maladie plus fréquente (17). Parmi 1154 patients avec un stade Binet A, 157 (14%) avaient un temps de doublement des lymphocytes

inférieur à 12 mois au suivi initial, avec une survie globale de 22.8 ans en cas de temps de doublement supérieur à 12 mois versus 12.6 si inférieur à 12 mois (HR 2.2 CI 1.7-4.7 ;  $p < 0.05$ ). En analyse multivariée, parmi les différents facteurs pronostiques, le temps de doublement ressortait comme un facteur indépendant, de même que le statut mutationnel, l'expression de CD38 et l'âge, s'agissant néanmoins dans cette étude du temps de doublement au cours de la première année (18).

---

#### **1.1.4 Traitement de la LLC**

---

La prise en charge de la LLC a connu un progrès important par la mise en place de nouvelles thérapies ciblées ; l'objectif étant une rémission persistante qui est définie par une réponse clinique et moléculaire/phénotypique maximale (19). L'indication thérapeutique se fait en fonction de critères d'évolutivité ou de progression de la maladie (HAS 2012). Elle requière la présence de signes systémiques (au moins un dont la perte de poids  $\geq 10\%$  dans les 6 derniers mois, une fièvre  $> 38^{\circ}\text{C}$  pendant 2 semaines ou plus, des sueurs nocturnes et une fatigue), un syndrome tumoral (splénomégalie  $> 6\text{ cm}$  ou progressive, une adénopathie volumineuse ou rapidement progressive et une hépatomégalie), une hyperlymphocytose progressive (augmentation  $> 50\%$  sur 2 mois ou un temps de doublement des lymphocytes  $< 6$  mois), une insuffisance médullaire progressive (apparition ou aggravation d'une anémie ou d'une thrombocytopénie), une anémie hémolytique auto-immune et/ou thrombocytopénie ne répondant pas aux corticoïdes ou à un autre traitement standard. Ainsi, pour les patients de stade A, l'abstention thérapeutique est le plus souvent adoptée, pour les stades B et C (présentant une maladie évolutive), l'association de fludarabine (un analogue de purine), de cyclophosphamide (un agent alkylant) et de rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20 dirigé spécifiquement contre les lymphocytes B) est actuellement le traitement de référence, sauf en présence d'une délétion 17p, signature moléculaire de patients réfractaires à la chimiothérapie, éligibles aux nouvelles molécules ciblées et à la greffe de moelle allogénique (19). En cas d'indication de traitement, chez un patient présentant un bon état général de santé, sans mutation TP53, le traitement de première ligne comprend l'association du rituximab avec de la fludarabine et du cyclophosphamide. Le traitement de première ligne chez les patients âgés ou avec un mauvais état général sans mutation TP53 comprend l'association de rituximab et de la bendamustine (un agent alkylant). Malgré une rémission

durable, la majorité des patients vont présenter une rechute et nécessiter une 2<sup>e</sup> ligne de traitement.

Le traitement des patients réfractaires, en rechute ou mutés pour TP53, constituait il y encore quelques années un véritable défi pour le clinicien. Les patients en rechute ou réfractaires, traités en première ligne par rituximab avec de la fludarabine et du cyclophosphamide recevaient à la rechute du rituximab et de la bendamustine, tandis que les patients mutés TP53 étaient traités en première ligne par de l'alemtuzumab (Campath®) qui a perdu son AMM en 2012. L'alemtuzumab est un anticorps monoclonal IgG1 kappa humanisé dirigé contre le CD52, une protéine représentée de façon quasi-ubiquitaire par les cellules différenciées de l'hématopoïèse (lymphocytes B et T, cellules NK, monocytes, thymocytes, macrophages et certains granulocytes). Ce médicament était administré en monothérapie ou en association avec une chimiothérapie pour les patients réfractaires à la combinaison standard ou chez les patients présentant une délétion 17q. Une alternative à ces traitements était l'allogreffe pour les patients jeunes ou l'inclusion dans des essais cliniques. Avec l'arrivée sur le marché de l'ibrutinib (Imbruvica®) et de l'idélalisib (Zydelig®), cette prise en charge a été révolutionnée. L'idélalisib est un inhibiteur sélectif de l'isoforme p110δ de la PI3Kδ (Phosphoinositide 3-kinase) et interagit peu avec les isoformes PI3Kα, PI3Kβ et PI3Kγ. Initialement indiqué en association avec le rituximab pour le traitement de patients atteints de LLC en rechute ou en progression après deux lignes de traitement et en première ligne de traitement chez les patients présentant une délétion 17p ou une mutation TP53 pour lesquels une chimio-immunothérapie n'est pas appropriée, les essais en cours ont été prématurément arrêtés du fait du risque d'infections graves et de décès accrus. L'ibrutinib est un inhibiteur sélectif irréversible de BTK (20). Il est capable d'inhiber la signalisation dépendante du BCR, prévenir l'adhésion lymphocytaire et inhiber les effets pro-survie du microenvironnement. Il a obtenu l'AMM par voie orale en 2014 dans le traitement de la LLC en rechute/réfractaire (ou en première ligne avec délétion 17p/mutation TP53) (20). Il est très efficace quel que soit le caryotype, le statut mutationnel d'immunoglobulines, le statut de Rai et le nombre de traitements précédemment reçus. Ainsi, parmi les 825 patients ayant reçu en moyenne 4 lignes de chimiothérapies antérieures, 71% ont eu une réponse hématologique (complète ou partielle), avec une fréquence de survie sans évènements à 26 mois de 75% et une survie à 83% sous ibrutinib (21). Parmi les 391 patients randomisés pour recevoir l'ibrutinib ou l'ofatumumab, le taux de réponse était de 43% dans le groupe ibrutinib *versus* 4% dans le groupe ofatumumab (p<0.001) avec sous ibrutinib un risque relatif pour la progression ou le

décès de 0.22 [CI95% ; 0.15-0.32;  $p < 0.001$ ). Des associations d'ibrutinib avec un anticorps monoclonal anti-CD20 ou le régime conventionnel (combinaison fludarabine-cyclophosphamide-rituximab) sont en cours d'études cliniques (22-24).

Plusieurs autres traitements font l'objet d'études précliniques et cliniques dans la LLC, comme des immunothérapies avec des anti-CD20 «nouvelle génération» (ofatumumab, obinutuzumab), un immunomodulateur (le lenalidomide), des inhibiteurs du Syk (fostamatinib, GS-9973), des inhibiteurs de PLC $\gamma$  (CC-115), un inhibiteur de CDK (Cyclin dépendant Kinase) (Flavopiridol, SNS-032), des inhibiteurs de PKC (Protéine Kinase C) (Enzastaurin) (20). Des agents ciblant les molécules impliquées dans l'apoptose sont également en cours d'étude, tel que des inhibiteurs de la famille BCL-2 (navitoclax et ABT-199).

La transplantation de cellules souches reste réservée aux sujets jeunes et à haut risque (25). Il existe 2 modalités possibles de transplantation de cellules souches: l'autogreffe et l'allogreffe. Dans la LLC, l'autogreffe ne permet pas d'éradiquer durablement le clone leucémique. La transplantation de cellules souches allogéniques apparaît comme l'unique traitement curatif de la LLC. Cependant, elle reste associée à une mortalité due à sa procédure qui limite son usage aux patients jeunes réfractaires ou en rechute. L'efficacité du traitement repose sur l'établissement d'une réponse immunitaire du greffon contre la leucémie. Contrairement aux autres traitements, cette approche thérapeutique permet une éradication durable du clone leucémique de façon indépendante du statut pronostique initial de ces patients.

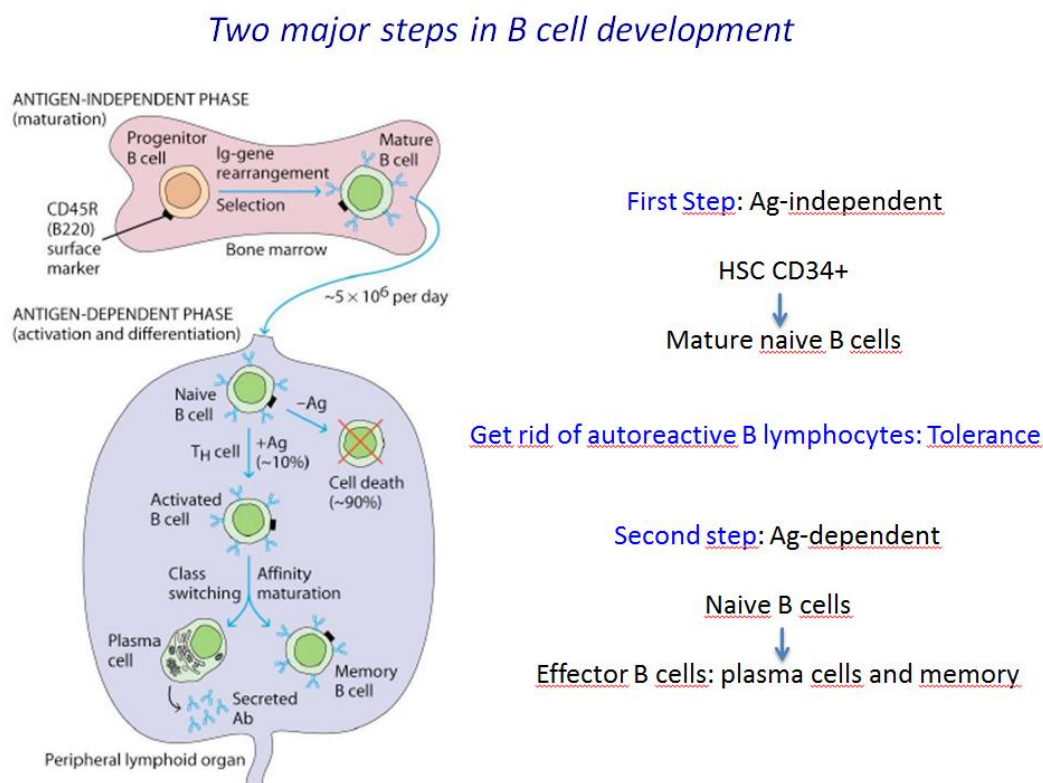
Les CAR T-cells (ou cellules T porteuses d'un récepteur chimérique) sont des lymphocytes T du patient, modifiés génétiquement *in vitro* pour leur faire exprimer un récepteur artificiel, dit chimérique. En général, ce récepteur est dirigé contre le CD19 même si des lymphocytes CAR T anti-CD20 sont également à l'étude (26). Dans le traitement de la LLC, les données de l'efficacité de cette stratégie restent encore très parcellaires, même si les taux de réponses obtenus sont encourageants.

## 1.2 Ontogénèse des lymphocytes B chez l'homme

Les lymphocytes B représentent 10-15% des lymphocytes circulants et sont définis par la présence à leur surface d'immunoglobulines, qui constituent avec des molécules de signalisation le récepteur à l'antigène, ou BCR. Les fonctions des lymphocytes B sont multiples, et comprennent notamment la production et la sécrétion d'anticorps et la présentation d'antigène. Plus récemment, il a été montré que les lymphocytes B pourraient jouer un rôle dans l'immunorégulation, au travers de la sécrétion de nombreux facteurs et cytokines.

On peut séparer l'ontogénèse des lymphocytes B en deux phases principales, une première phase de différenciation et de maturation des lymphocytes B dans la moelle et une seconde phase d'activation et de différenciation terminale dans les organes lymphoïdes secondaires (**Figure 1**).

**Figure 1. Les étapes essentielles de l'ontogénèse des lymphocytes B.**



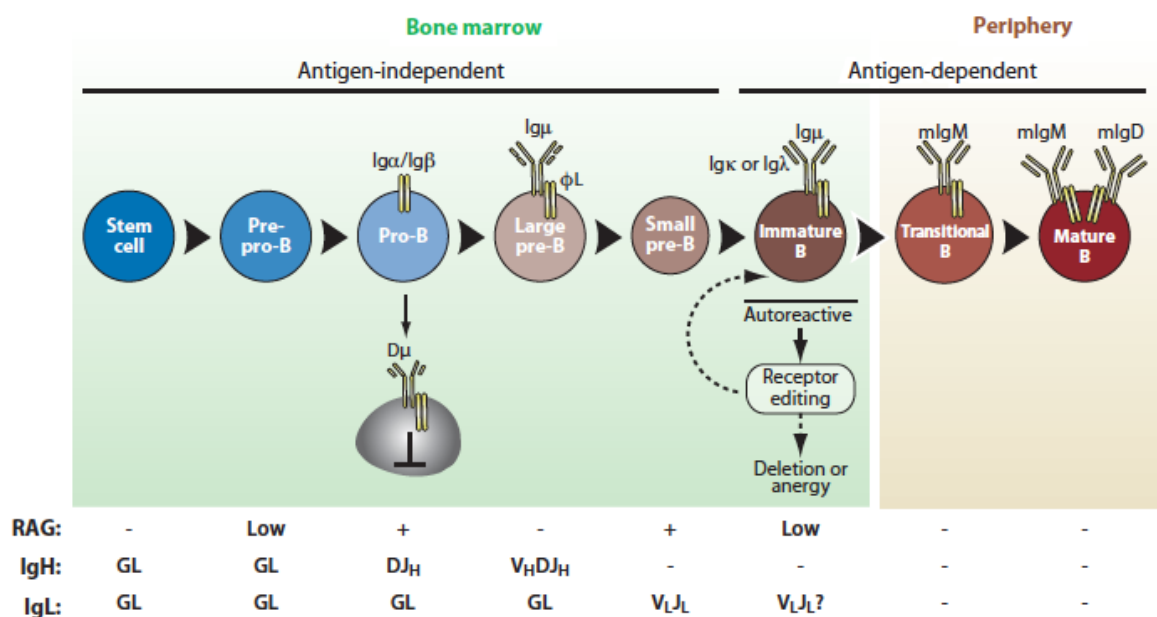
Les 2 étapes majeures de l'ontogénèse du lymphocyte B comportent une phase Ag-indépendante, qui se déroule dans la moelle, aboutissant à un lymphocyte B naïf porteur d'un BCR fonctionnel. La 2<sup>e</sup>

étape se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires, où le lymphocyte B va rencontrer l'Ag, subira l'hypermutation somatique qui permettra d'accroître l'affinité de son BCR pour l'Ag et la commutation isotypique pour aboutir à des plasmocytes capables de sécréter des anticorps de même spécificité antigénique.

Adapté d'Ontogénèse et activation des lymphocytes F. Velge-Rousse, 2010.

Cette première phase est indépendante de l'antigène et se déroule dans la moelle osseuse en l'absence de toute rencontre antigénique (**Figure 2**).

**Figure 2. La synthèse du BCR et les différents précurseurs du lymphocyte B.**



Au cours de son ontogénèse, le lymphocyte B va passer par plusieurs étapes, avec une sélection positive des lymphocytes B exprimant un pré-BCR, puis une sélection négative de ceux qui reconnaissent un autoAg, ces étapes se déroulant dans la moelle. Par la suite le lymphocyte B immature va migrer dans les organes lymphoïdes secondaires, où il va rencontrer l'Ag.

Adapté de 28:2155 Kurosaki T et la, Annu. Rev. Immunol. 2010.

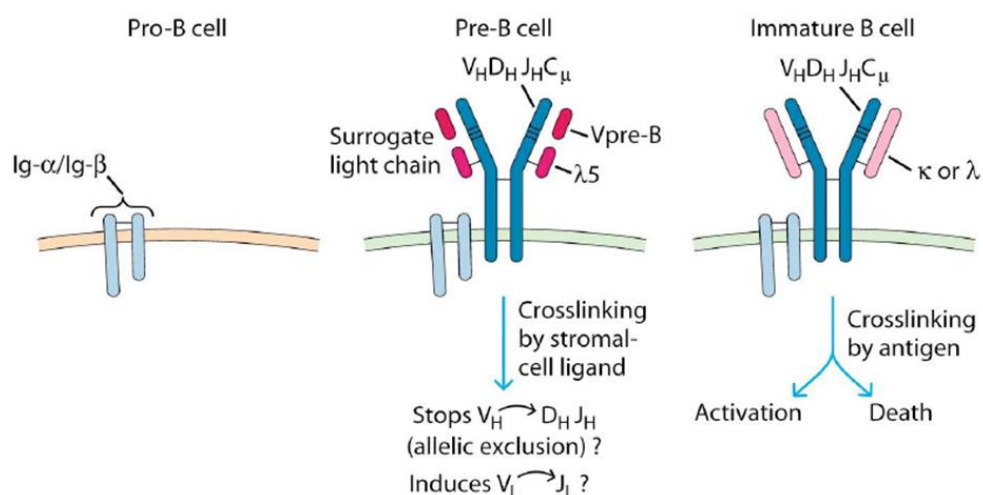
A partir des cellules souches hématopoïétiques sont issus des précurseurs lymphoïdes communs qui possèdent la capacité de reconstituer de façon restreinte la lignée lymphoïde (cellules T, B et NK) *in vivo*. Dans la moelle osseuse, les précurseurs B les plus immatures constituent une sous-population de cellules appelées pré-pro-B qui ne sont pas totalement

engagées dans la différenciation B et n'ont pas encore des gènes d'immunoglobulines réarrangés. Les cellules pré-pro-B expriment très faiblement les gènes RAG-1 et RAG-2.

Par la suite la maturation des lymphocytes B va passer par plusieurs étapes différentes. Au stade pro-B commencent à se mettre en place les réarrangements des gènes d'immunoglobulines (des segments V, D, J), avec l'apparition du marqueur CD19 à la surface cellulaire (**Figure 3**). Les réarrangements débutent au locus IGH par la jonction d'un segment  $D_H$  avec un segment  $J_H$ . Ces premiers réarrangements sont suivis par l'assemblage, d'un segment  $V_H$  avec les  $DJ_H$  réarrangés. Seuls les segments  $V_HDJ_H$  en phase de lecture correcte et sans codon stop codent pour une région variable fonctionnelle et permettent la synthèse d'une chaîne lourde  $\mu$ . Les gènes codant pour les chaînes légères et les chaînes lourdes sont présents sur les deux allèles et on observe un réarrangement sur le premier chromosome, et dans le cas où il n'est pas productif, un réarrangement se fera au niveau du second chromosome. En revanche la cellule va entrer en apoptose si aucun des réarrangements n'est productif. Dans le cas où le premier réarrangement est productif, il est nécessaire d'arrêter tout autre réarrangement ; ce mécanisme s'appelle l'exclusion allélique et permet d'obtenir un seul type de chaîne légère et un seul type de chaîne lourde. Cette inhibition de tout réarrangement est possible par inactivation des protéines Rag-1 et Rag-2 qui sont responsables de la recombinaison VDJ.

**Figure 3. La synthèse du BCR.**

Pre-BCR synthesis



La synthèse du BCR comporte plusieurs étapes, avec un réarrangement des différents segments des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines, premièrement une sélection positive des lymphocytes exprimant à la surface un pré-BCR.

**Adapté d'Ontogenèse et activation des lymphocytes F. Velge-Rousse, 2010.**

Au stade pré-B, la chaîne lourde  $\mu$  est exprimée à la surface des cellules, en association avec une pseudochaîne légère formée de la liaison non covalente des protéines  $\lambda 5$  et VpréB, formant le complexe pré-BCR. Ce complexe avec le pré-BCR permet à la cellule de passer au stade ultérieur de la différenciation et d'entrer dans une phase d'expansion clonale. Une fois le pré-BCR exprimé, la cellule sera soumise à une première sélection, la « sélection positive ». Cette sélection permettra à la cellule pré-B, dans le cas où elle exprime un pré-BCR fonctionnel, de recevoir des signaux de survie afin de poursuivre sa maturation, dans le cas contraire la cellule entrera en apoptose. Le pré-BCR joue aussi un rôle critique dans l'exclusion allélique en induisant une diminution transitoire de l'expression des gènes RAG afin d'arrêter la recombinaison des gènes sur l'autre allèle.

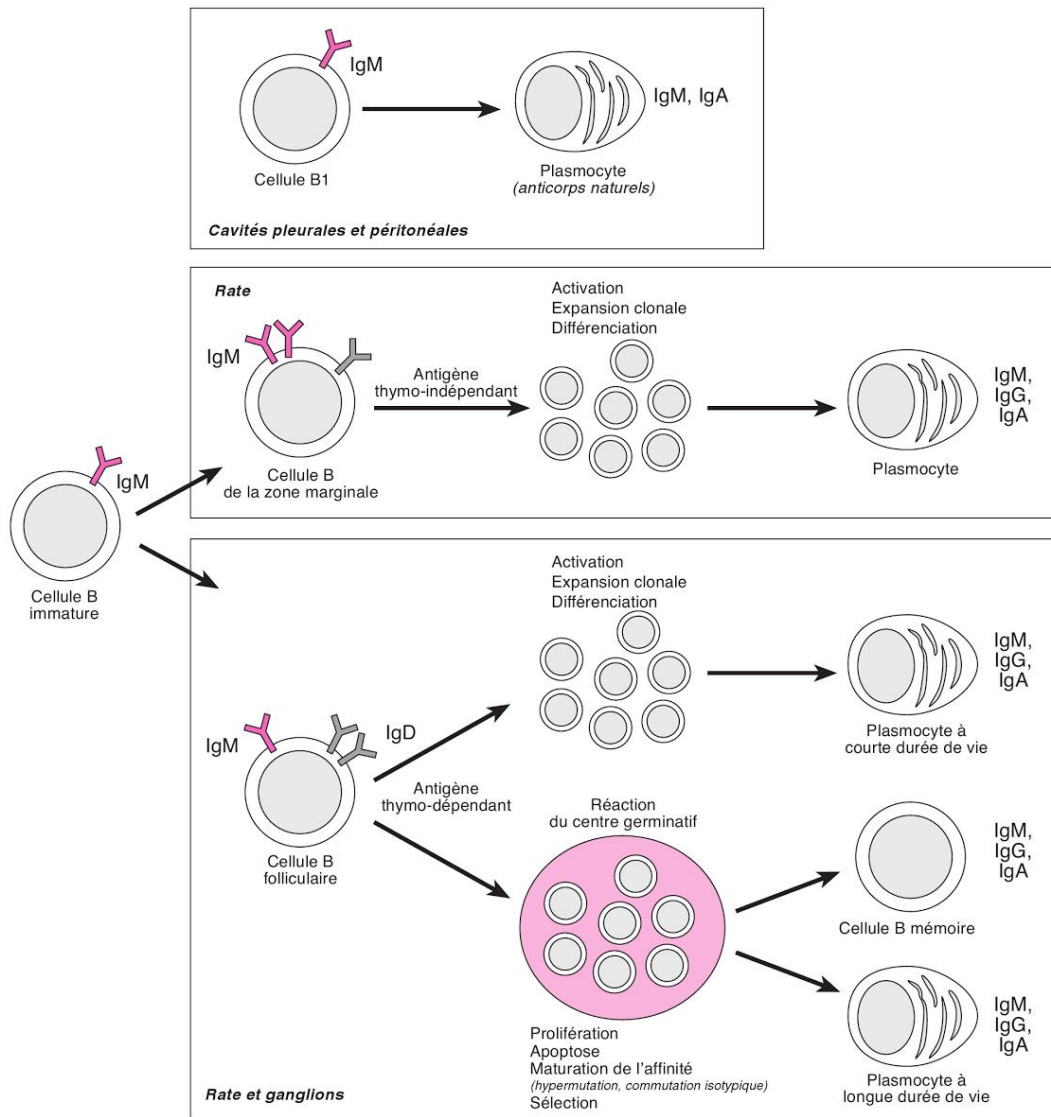
Au stade B immature, on remarque la production d'une chaîne légère classique qui remplace la pseudochaîne légère et permet l'expression d'une IgM de surface conférant à la cellule une première spécificité de reconnaissance de l'antigène (**Figure 2**). Ces lymphocytes B immatures subissent alors un processus de « sélection négative », les cellules possédant des immunoglobulines de surface spécifiques pour des antigènes du soi étant éliminées. Cette sélection est possible par la présence, au niveau de la moelle osseuse, de cellules stromales qui expriment à leur surface des peptides du soi couplés aux molécules du CMH, de la même manière que les cellules dendritiques au niveau du thymus. La cellule B immature est soit capable de reconnaître le peptide présenté par les molécules du CMH avec une forte affinité, elle sera alors considérée comme autoréactive et sera sélectionnée négativement en recevant un signal de mort. Soit la cellule B immature n'est capable de reconnaître le peptide présenté par les molécules du CMH qu'avec une faible affinité, et ne recevra pas de signal de mort, pouvant continuer la maturation après sa sortie de la moelle osseuse. Enfin, si la cellule B immature n'interagit pas avec le CMH, elle recevra alors un signal de mort. Cette sélection négative permettra l'acquisition de la tolérance au soi en éliminant les lymphocytes B autoréactifs. Les cellules qui survivent après ce processus de sélection négative quittent la moelle et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires.



La seconde phase d'activation et de différenciation terminale se déroule au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes B immatures ayant quitté la moelle osseuse expriment des IgM et IgD de surface et constituent les lymphocytes B transitionnels. Dans les organes lymphoïdes, ces lymphocytes se différencient soit en lymphocytes B folliculaires (80% des lymphocytes B de la rate adulte), avec une rencontre antigénique et une réponse dépendante des lymphocytes T, soit en lymphocytes B de la zone marginale, avec une réponse indépendante de la coopération avec les lymphocytes T (**Figure 4**).

L'activation du BCR par liaison à un antigène déclenchera des mécanismes de modifications responsables d'une augmentation de la diversité des immunoglobulines. Ces mécanismes sont indispensables à l'augmentation de la spécificité de la réaction immunitaire, ainsi qu'à l'augmentation de la spécificité vis-à-vis de l'antigène. Les lymphocytes B folliculaires, après la rencontre avec l'antigène, subiront ces étapes dans les centres germinatifs.

Figure 4. Les différents types de réponses T-dépendantes et indépendantes.



La cellule B immature selon son positionnement dans l'organe lymphoïde secondaire, pourra soit rencontrer l'Ag, subir les hypermutations somatiques et la commutation isotypique, et aboutir à des plasmocytes et des cellules B mémoires ; en l'absence de rencontre avec un Ag thymodépendant, elle pourra subir une expansion clonale et une différenciation en plasmocyte avec une capacité polyréactive et une affinité moins importante. Une population particulière de lymphocytes B, bien caractérisée chez la souris, se développe dans les cavités pleurale et péritonéale, son équivalent chez l'homme est encore controversé.

### Signaux d'activation du lymphocyte B

Certains signaux adressés aux lymphocytes B par leur environnement cellulaire seront dépendants du BCR, lorsque d'autres seront indépendants du BCR. A la suite du pontage d'au

moins deux BCR, facilité par la présence d'épitopes répétés sur l'antigène, les molécules de signalisation CD79a et CD79b sont activées. Cette activation implique une phosphorylation qui s'effectue sur les résidus tyrosine présents sur les motifs ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based-activation-motif) de la portion intracytoplasmique des molécules CD79 par des src-kinases associées au BCR (dont Lyn et Fyn). La phosphorylation permet l'ancrage de protéines adaptatrices et le recrutement en cascade de molécules de signalisation qui activent à leur tour des facteurs de transcription responsables de l'induction des gènes spécifiques des lymphocytes B.

Cette activation dépendante du BCR peut être modulée par des signaux indépendants du BCR qui permettent, en fonction du stade de développement du lymphocyte B, de l'orienter soit vers une mort programmée ou apoptose, soit vers la prolifération. L'apoptose intervient au cours de la sélection négative de l'ontogénie B, la prolifération concernant la sélection positive ou les expansions clonale après activation B. Ces signaux participent également à la différenciation et la maturation qui font évoluer les cellules du lymphocyte B naif au lymphocyte B mature, puis au lymphocyte B mémoire ou plasmocyte.

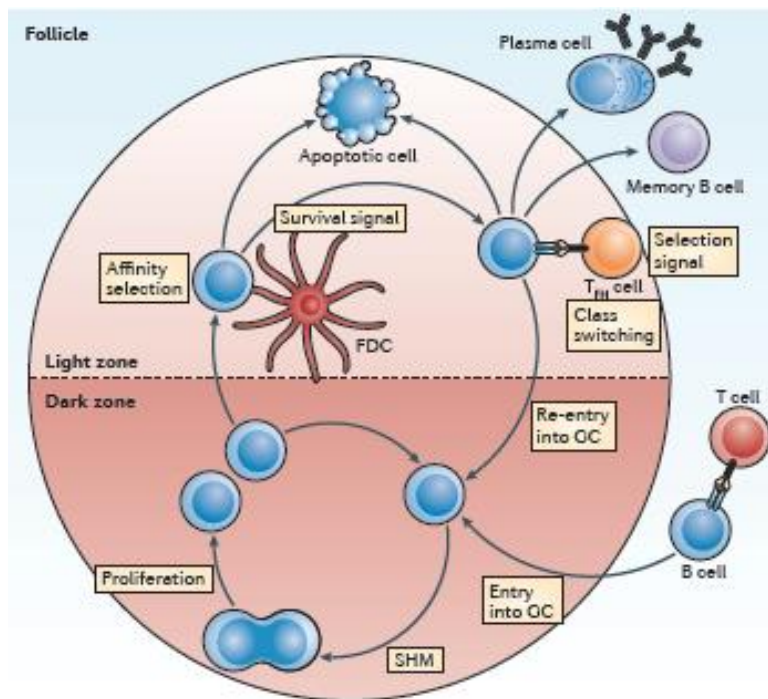
#### *Formation des centres germinatifs*

Suite à une immunisation avec un antigène qui entraîne une réponse T-dépendante, on observe dans les organes lymphoïdes secondaires la formation de structures particulières appelées centres germinatifs (**Figure 5**). Ces structures apparaissent quelques jours après la rencontre avec l'antigène. Elles sont associées à l'expansion de cellules B spécifiques, sont le site de l'hypermutation somatique, de la commutation isotypique et d'une sélection éliminant les cellules produisant des anticorps de faible affinité. Dans les centres germinatifs, on distingue deux zones principales, la zone sombre et la zone claire. La zone sombre, appelée ainsi du fait de la forte concentration cellulaire et qui correspond à la zone de prolifération cellulaire, est composée de centroblastes qui sont des lymphocytes B dont les gènes subissent les hypermutations somatiques. Dans la zone claire, les lymphocytes B sont de plus petite taille, ils ne prolifèrent plus, et sont enchevêtrés dans un large réseau de cellules folliculaires dendritiques. Ces lymphocytes expriment leur nouvelle immunoglobuline de surface et sont appelés centrocytes. Les cellules folliculaires dendritiques peuvent retenir l'antigène sous sa forme native à leur surface, sous forme de complexes immuns et ce pendant plusieurs mois, et le rendre ainsi accessible aux centrocytes issus de la prolifération dans la zone sombre. L'hypermutation somatique est un processus par lequel des mutations ponctuelles sont

introduites dans les régions variables des chaînes lourdes et légères du BCR suite à l'activation du BCR par liaison à un antigène et grâce à l'aide des LT dans le centre germinatif. Ces mutations se faisant au hasard, les mutations délétères sont responsables d'une diminution de l'affinité de l'antigène pour son BCR ; la sélection négative sera alors responsable de la mort de ces cellules. En revanche, les mutations positives sont responsables d'une augmentation de l'affinité de l'antigène pour son BCR et les cellules vont alors poursuivre leur maturation. Le but de ce processus est de permettre une sélection des lymphocytes B qui auront une meilleure affinité pour l'antigène, afin d'obtenir des anticorps plus efficaces et des cellules mémoires plus spécifiques.

Seuls les centrocytes exprimant un récepteur de haute affinité pour les épitopes présentés par les cellules folliculaires dendritiques sont sélectionnés efficacement en captant l'antigène. Au contraire, si les mutations somatiques ne modifient pas l'affinité du BCR, ces cellules sont éliminées par apoptose. Suite à cette sélection, les centrocytes ayant capté l'antigène l'appâtent et le présentent sous forme de peptides dans leurs molécules du CMH de classe II aux lymphocytes T helper folliculaires, présents spécifiquement au sein de la zone claire. Ces lymphocytes T helper folliculaires donnent alors des signaux de survie et de différenciation aux lymphocytes B, qui peuvent alors subir la commutation de classe. Ils mûrissent ensuite soit en plasmocytes, soit en cellules B mémoires.

**Figure 5. La formation des centres germinatifs, l'hypermutation somatique et le switch isotypique.**



Adapté de Klein U, *Nature Reviews Immunology*, 2008.

Les fonctions effectrices des immunoglobulines dépendent des régions constantes des chaînes lourdes et varient selon les isotypes. Les IgM sont produites au cours de la réponse primaire, alors que les IgG, IgA ou IgE sont produites au cours d'une réponse secondaire. Au cours du changement d'isotype ou commutation de classe, la partie variable réarrangée en VDJ va être rapprochée d'un nouveau segment constant codant pour les domaines constants d'une classe d'immunoglobuline différente par un processus de recombinaison somatique. Ainsi les lymphocytes B issus des centres germinatifs où ils ont subi une hypermutation somatique et une commutation isotypique, seront des lymphocytes B mémoires et des plasmocytes d'un nouvel isotype et pourront fournir des cellules effectrices de la réponse humorale sécrétant les anticorps. Les cellules B mémoires constituent un groupe de cellules à longue durée de vie, capables de persister à l'état quiescent sans proliférer. Elles n'expriment en général plus d'IgD, ont commuté (expriment un autre isotype) et peuvent avoir des localisations préférentielles telles que les muqueuses pour les cellules ayant commuté pour produire des IgA. Les cellules mémoires ont la faculté de répondre très rapidement à des pathogènes. Les

plasmocytes, exprimant CD38 et CD138, sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale. Ce sont des cellules de production et de sécrétion d'anticorps à destination de l'ensemble de l'organisme.

En ce qui concerne les lymphocytes B de la zone marginale, ils interviennent dans les réponses indépendantes de la coopération avec les lymphocytes T. Ces lymphocytes produisent des anticorps « naturels », polyréactifs, de faible affinité et constituent une défense antimicrobienne de première ligne. On en distingue deux types, les lymphocytes B de la zone marginale folliculaire de la rate et les lymphocytes B1 présents principalement au niveau de la cavité péritonéale. Alors que les lymphocytes B1 représentent une population plus homogène chez la souris, bien distincte des lymphocytes B2 folliculaires et des B de la zone marginale, leur phénotype et leur origine sont plus débattus chez l'homme (*cf.* chapitre ci-dessous « Lymphocytes B1 »).

---

### 1.3 Lymphocytes B1

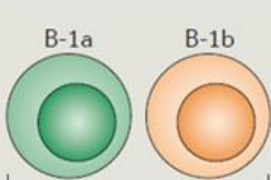
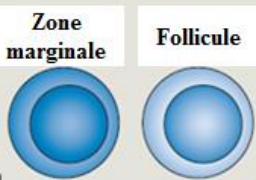

---

Il existe deux populations de lymphocytes B chez la souris, les lymphocytes B1 et B2 (**Figure 6**)(27). Les lymphocytes B2 normaux sont issus de la moelle osseuse, subissent une sélection négative, circulent dans les organes lymphoïdes, subissent l'hypermutation somatique et la commutation isotypique, avec une production d'anticorps de forte affinité et la persistance de cellules B mémoires. Les lymphocytes B1 sont en revanche localisés dans la cavité péritonéale et pleurale, produisent des anticorps IgM « naturels » avec une faible affinité et une polyréactivité (27). Ils expriment un répertoire de BCR très large, avec une reconnaissance des autoantigènes et des antigènes microbiens multiples. Cette capacité à reconnaître le Soi suggère une différence fondamentale dans l'ontogénèse de ces cellules en comparaison avec les lymphocytes B2; l'ontogénèse des lymphocytes B1 étant beaucoup moins connue. Les lymphocytes B1 avec un BCR qui reconnaît les autoantigènes pourraient même subir une sélection positive, alors que leur faible affinité pour un antigène du Soi permet d'éviter la sélection négative. On distingue chez la souris deux types de lymphocytes B1, les B1-a qui sont des cellules CD5<sup>+</sup> et les B1-b qui n'expriment pas ce CD (28). Bien que d'autres marqueurs pouvant différencier ces 2 sous-populations ont été identifiés, tel que le CD43, CD11b et Ly49, des études complémentaires restent nécessaires pour le confirmer. Si les B1-a exercent une réponse à plusieurs pathogènes, tels que *S. pneumoniae*, virus influenza, *Francisella tularensis*, les B1-b quant à eux ont une réponse Ag-dépendante à *Salmonella Typhi*, *B. hermsii* et *S. pneumoniae*. Leur capacité à reconnaître des autoantigènes leur permet de jouer un rôle dans l'élimination des corps apoptotiques ou des débris incluant des molécules du soi. Ces cellules sont capables de présenter un antigène et de polariser la différenciation des lymphocytes T. Les B1-a exprimant le CD5 ont une moindre sensibilité à l'apoptose induite par la stimulation du BCR, à la différence des B2 des zones marginale et folliculaire. Cette particularité pourrait rendre compte d'un des mécanismes de survie de ces cellules autoréactives, mais aussi soulève l'importance de l'expression du CD5 dans la survie dépendante du BCR.

A la différence de ce qu'on observe chez la souris, l'existence et la caractérisation des lymphocytes B1 chez l'homme reste controversée et relativement peu étudiée. Les lymphocytes CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> capables de sécréter des IgM polyréactives ont été mis en évidence chez l'homme, néanmoins l'expression du CD5 est clairement insuffisante pour caractériser cette sous-population spécifique chez l'homme (29). Ainsi 15-30% de lymphocytes B sont

positif pour le CD5 chez l'homme, et moins de 1% chez la souris. Chez l'homme, des lymphocytes CD5<sup>+</sup> sont également capables de sécréter des IgM polyréactives, et d'autres sous-populations humaines, telles que les B transitionnels expriment le CD5. Certaines études analysant l'expression génique et les similitudes phénotypiques avaient rapproché la sous-population de lymphocytes B humains, IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, des B1 murins. Cependant, à la différence des B1 chez la souris, cette sous-population exprime un répertoire polyréactif divers à l'exclusion (l'exception ?) des BCR autoréactifs. Une autre sous-population humaine, les lymphocytes B CD21<sup>low</sup>IgM<sup>hi</sup>FCRL4<sup>+</sup>, présente des similitudes avec les B1 murins, et notamment la capacité à sécréter des anticorps IgM. Enfin, une sous-population CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD70<sup>-</sup> exprimant le CD5 a été décrite comme l'équivalent d'un B1 humain. Cependant, plusieurs équipes ont montré que cette population pourrait correspondre à un phénotype précédant les plasmablastes, eux-mêmes précurseurs des plasmocytes, qui sont les lymphocytes sécréteurs d'anticorps (30, 31).

**Figure 6. Phénotypes des lymphocytes B-1, B-2 et des lymphocytes B régulateurs chez la souris.**

<b>Phénotype</b>	CD5 <sup>+</sup> CD19 <sup>hi</sup> CD1d <sup>mid</sup>	CD5 <sup>-</sup> CD19 <sup>hi</sup> CD1d <sup>mid</sup>	CD5 <sup>-</sup> CD19 <sup>mid</sup> CD1d <sup>hi</sup> CD21 <sup>hi</sup>	CD5 <sup>-</sup> CD19 <sup>mid</sup> CD1d <sup>mid</sup> CD23 <sup>+</sup>	CD5 <sup>+</sup> CD19 <sup>hi</sup> CD1d <sup>hi</sup> CD21 <sup>hi/mid</sup> CD23 <sup>+/-</sup> CD43 <sup>-</sup> IgM <sup>hi</sup> IgD <sup>low/mid</sup>
	CD23 <sup>-</sup> CD43 <sup>+</sup> IgM <sup>hi</sup> IgD <sup>low</sup>	CD23 <sup>-</sup> CD43 <sup>+</sup> IgM <sup>hi</sup> IgD <sup>low</sup>	CD23 <sup>-</sup> CD43 <sup>-</sup> IgM <sup>hi</sup> IgD <sup>low</sup>	CD23 <sup>+</sup> CD43 <sup>-</sup> IgM <sup>low</sup> IgD <sup>hi</sup>	
<b>Fréquence des B spléniques</b>	2%	<1%	15%	>70%	1%
	 <p>B-1</p>		 <p>B-2</p>		 <p>B régulateurs</p>
					Lien avec B-1/B-2 incertain

Adapté de Baumgarth N, Nature 2011.



---

## 1.4 Physiopathologie de la LLC

---

### 1.4.1 Origine cellulaire des lymphocytes B de LLC

L'origine cellulaire et la cascade d'évènements conduisant au développement du lymphocyte B-LLC restent encore non élucidées, malgré un certain nombre d'hypothèses physiopathologiques.

Le lymphocyte B-LLC n'est pas une cellule anormale sur le plan phénotypique, puisque l'on retrouve dans la différenciation normale B un lymphocyte non-clonal avec une expression similaire ( $CD19^+CD5^+CD23^+$ ). L'origine cellulaire des lymphocytes B-LLC reste controversée, mais la capacité à générer les cellules B clonales pourrait être présente au stade des cellules souches hématopoïétiques. Ainsi, le transfert de cellules souches  $CD34^+CD38^-$  issues de patients atteints de LLC dans une souris « non-obese diabetic » (NOD)  $NOD/RAG-1^{-/-}IL2rg^{null}$  permet de générer des lymphocytes  $CD5^+$  exprimant les marqueurs membranaires habituels de B-LLC, à la différence des cellules souches issues de témoins sains produisant uniquement des lymphocytes B polyclonaux (32).

Le lymphocyte B-LLC correspond ainsi sur le plan phénotypique aux lymphocytes B matures, une des sous-populations circulantes de cellules B. L'hypothèse d'une expérience antigénique tient au fait qu'il existe deux formes de B-LLC, dont une forme avec des gènes  $IgVH$  ayant subi l'hypermutation somatique qui se produit au niveau des centres germinatifs après la rencontre avec un antigène. Par conséquent, le modèle actuel indique que les cellules de LLC avec des immunoglobulines mutées dériveraient de cellules B mémoires d'origine post-centre germinative. On considère ainsi que l'origine cellulaire serait commune à toutes les formes de LLC, avec une rencontre antigénique T-dépendante pour les formes LLC avec des gènes  $IgVH$  mutés. Une autre lignée cellulaire B pourrait avoir une ontogénèse indépendante des centres germinatifs, et ainsi présenter un profil d'immunoglobulines non-mutées en l'absence de rencontre antigénique dans les centres germinatifs. Cette hypothèse est confortée par l'auto-réactivité des cellules B-LLC avec un statut non-muté qui associe ces cellules à des lymphocytes B résidents dans la zone marginale. En effet, la poly/autoréactivité des anticorps produits par les cellules B-LLC avec un statut non-muté l'apparente à la lignée murine B1a, avec le marqueur  $CD5$  à la surface, une immunoglobuline non-mutée et un fort potentiel de transformation.

D'autre part, en comparaison avec les B-LLC exprimant des immunoglobulines mutées, les patients ayant des cellules B-LLC avec des immunoglobulines non-mutées présentent plus fréquemment d'autres mutations, en accord avec l'évolution clinique péjorative de ces patients. L'analyse génétique au cours du temps en cas de rechute a montré l'existence de mutations sous-clonales (p.e SF3B1, TP53), correspondant à des événements plus tardifs de l'évolution de la LLC et à la différence de mutations précoces ou dominantes (ou mutations pilotes) sous forme clonale (p.e MYD88, trisomie du chromosome 12 et del(13q)) (11). Les anomalies génétiques sont à l'origine de la population clonale et les techniques récentes de séquençage de l'exome entier ont montré l'importance des altérations génétiques au cours de la progression tumorale tout en caractérisant certains des gènes impliqués. Ainsi, en analysant 538 patients présentant une LLC, 44 mutations clonales ont été mises en évidence. Ces mutations ont révélé des voies cellulaires impliquées dans la tumorigénèse de la LLC, comme par exemple la voie modulant l'activité de MYC (les mutations PTPN11 et FUBP1), la voie de prolifération MAPK-ERK (mutations BRAF, MAP2K1, RAS), celle de modifications de la chromatine (gènes ASXL1, HIST1H1B, BAZ2B) et de l'activation B (TRAF2, TRAF3 et CARD11).

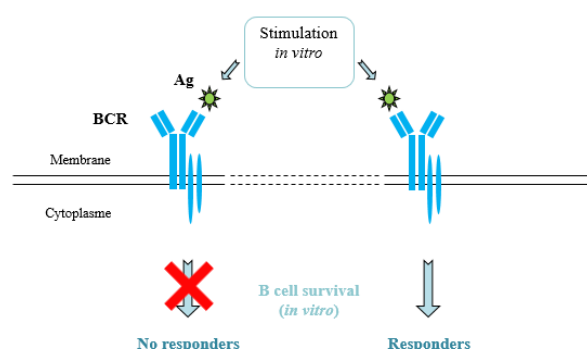
#### **1.4.2 Rôle de la stimulation antigénique du BCR**

Les analyses transcriptomiques ont montré une signature génique de la LLC différente des autres hémopathies lymphoïdes (33, 34). L'analyse de l'expression génétique des régions IgVH a permis de différencier des patients avec des IgVH mutés et non-mutés et des différences d'expression génique selon le statut mutationnel, montrant ainsi l'importance de la signalisation du BCR dans le profil évolutif de l'hémopathie.

La stimulation du BCR est cruciale au développement, à la prolifération et la survie du lymphocyte B normal. Dans les modèles animaux, un fort signal du BCR est à l'origine de la prolifération d'une population CD5<sup>+</sup>, à l'image de la LLC (35). Les souris CD19<sup>-/-</sup>, Btk<sup>-/-</sup> ou vav<sup>-/-</sup> présentent une déplétion en lymphocytes B CD5<sup>+</sup> (36, 37). La stimulation antigénique est l'une des caractéristiques majeures des lymphocytes B-LLC qui permet d'expliquer leur capacité d'expansion et de survie cellulaire. Bien que les cellules B-LLC présentent une faible expression des immunoglobulines de surface, l'analyse du phénotype des cellules de B-LLC montre que celles-ci expriment, de façon inhérente, un certain nombre de marqueurs d'activation tels que le CD23, CD25, et fréquemment le CD69, le CD71 et le CD27. Après stimulation *in vitro* par un anti-IgM, l'apoptose des cellules B-LLC est significativement

réduite de 50-60% pour les patients dont les lymphocytes répondent à la stimulation, alors que les lymphocytes ne répondant pas à la stimulation ne montrent pas d'augmentation de survie (**Figure 7**)(38). Les patients dont les cellules ne présentent pas d'augmentation de la survie cellulaire *in vitro* à une stimulation du BCR (= non-répondeurs) présentent également des facteurs de bon pronostic, avec une maladie non évolutive, à la différence de ceux dont les cellules ont une réponse cellulaire suite à une stimulation (= répondeurs).

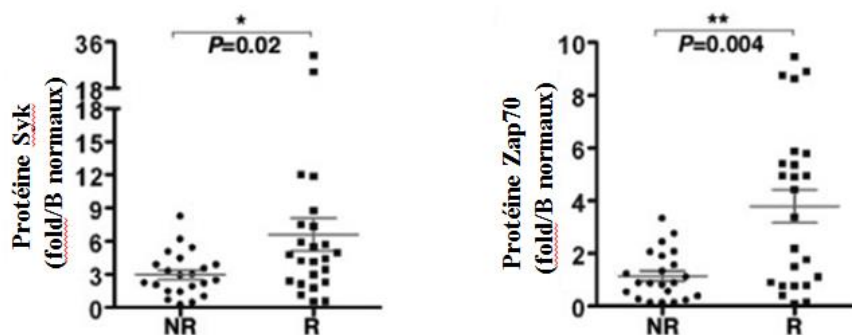
**Figure 7. La réponse à la stimulation du BCR *in vitro* identifie 2 groupes de patients.**



Les lymphocytes B-LLC ayant une réponse à la stimulation du BCR par l'Ag ont une survie cellulaire augmentée, à la différence des lymphocytes B-LLC non-répondeurs qui subissent une apoptose.

Les niveaux d'expression cellulaire des immunoglobulines sont plus importants chez ces patients répondeurs à la stimulation du BCR, de même que l'expression des différentes protéines effectrices de la signalisation du BCR, telles que Syk et ZAP-70 (**Figure 8**)(39). De plus, la capacité de réponse cellulaire *in vitro* à la stimulation du BCR est associée à l'évolution clinique des patients : les patients « répondeurs » en termes de survie cellulaire ayant une survie globale significativement réduite par rapport aux patients « non-répondeurs » à la stimulation du BCR (**Figure 9**)(39).

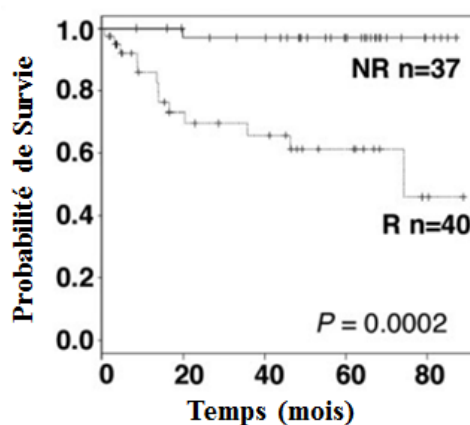
**Figure 8. Différence de niveaux d'expression de protéines de signalisation.**



Les niveaux d'expression cellulaire de différents effecteurs de la signalisation du BCR, tel que Syk et ZAP-70, sont plus importants chez les patients dont les lymphocytes B-LLC sont dits « répondeurs » à la stimulation du BCR par comparaison aux lymphocytes leucémiques dits « non-répondeurs ».

Adapté de Le Roy C *et al.*, Blood 2012.

**Figure 9. Survie des patients dont les lymphocytes répondent ou non à la stimulation du BCR *in vitro*.**



Adapté de Le Roy et al Blood 2012.

Les patients « répondeurs » au niveau cellulaire à la stimulation du BCR (R) ont une survie globale réduite par rapport aux patients « non-répondeurs » *in vitro* à la stimulation du BCR (NR).

### 1.4.3 Prolifération et augmentation de survie des cellules B-LLC

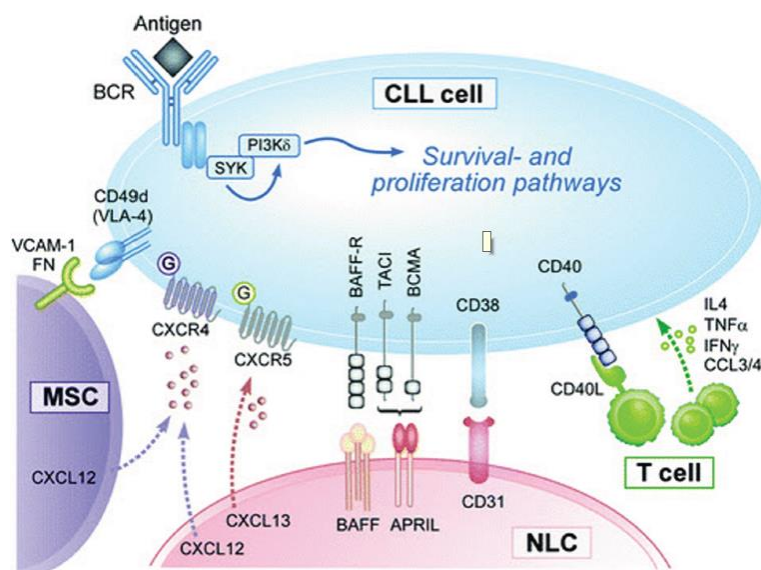
L'une des hypothèses initiales proposée pour expliquer l'amplification des cellules B-LLC était leur résistance intrinsèque à l'apoptose, avec une accumulation des lymphocytes B clonaux ayant une survie augmentée. En effet, une surexpression des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1) et la sous-expression des protéines pro-apoptotiques (Bax et Bcl-xs) sont habituellement retrouvées dans les lymphocytes B-LLC. Des travaux récents et, en particulier ceux de Messmer en 2005, ont montré qu'une activation est à l'origine de la prolifération cellulaire B-LLC (40). Une étude à l'aide de l'incorporation d'eau lourde ( $H_2O_2$ ) dans l'ADN des cellules tumorales *in vivo*, a montré que la quantité de cellules leucémiques produite dépasse les taux rencontrés dans la génération de cellules B normales. Un taux de génération de cellules clonales serait même associé avec un profil clinique progressif, évoquant ainsi le fait qu'une sous-population clonale puisse s'établir dans une niche intégrant des signaux du microenvironnement au niveau de structures particulières appelées les centres de prolifération (ou pseudofollicules).

### 1.4.4 Importance du microenvironnement dans la LLC

La démonstration de l'influence du microenvironnement sur la survie de la cellule B-LLC est la mort spontanée des cellules cultivées *ex vivo*. L'ajout de lymphocytes, de « nurse-like cells » et de cytokines permet d'augmenter la survie cellulaire B-LLC *in vitro* (**Figure 10**). Parmi les cellules impliquées, on note un recrutement particulier des lymphocytes T  $CD4^+$  avec un phénotype  $CD40L^+$  dans les centres prolifératifs. Ce recrutement des lymphocytes T, dépendant des chimiokines CCL22 et CCL27, permettrait aux cellules B-LLC nichées dans les centres prolifératifs de recevoir des signaux de survie médiés par CD40L et l'IL-4 (41). Le rôle des lymphocytes T a été également démontré dans la survie des lymphocytes B-LLC dans des modèles de xélogreffe, où la survie des B-LLC est dépendante des T autologues (42). D'autres cellules du microenvironnement de grande taille, adhérentes, d'aspect fibroblastique et apparaissant phénotypiquement stromales (expression de Vimentin et STRO-1), les « nurse-like cells », jouent également un rôle important dans la survie des cellules B leucémiques. Ces cellules préviennent l'apoptose des lymphocytes B-LLC par un mécanisme dépendant du SDF-1 et de BAFF/APRIL (42). BAFF est un facteur de survie et de maturation des lymphocytes B périphériques et au cours de la progression de la LLC on note une augmentation des niveaux de BAFF. BAFF fait partie de la famille des cytokines du TNF- $\alpha$  parmi lesquels on compte également le TNF- $\alpha$ , le CD40L et APRIL. Il a été également

montré qu'en présence de cellules stromales et de la stimulation du BCR, les lymphocytes B-LLC sont capables de sécréter les chimiokines CCL3 et CCL4 qui pourraient activer l'interaction avec les lymphocytes T et ainsi participer à la survie du clone LLC (41, 43). La capacité à exprimer le CCL3 et le CCL4 serait plus importante dans les cellules de patients présentant des facteurs pronostiques péjoratifs, tel que ZAP-70(+), et pourrait être la conséquence de l'activation des lymphocytes B *via* la présentation antigénique par les cellules stromales (41). Les lymphocytes B-LLC pourraient eux-aussi jouer un rôle dans l'induction de ces cellules stromales ; la culture de lymphocytes B normaux avec des cellules CD14<sup>+</sup> n'induit pas ce sous-type particulier de cellules, à la différence de la coculture avec des B-LLC (44).

**Figure 10. Différents signaux de survie exprimés par des lymphocytes T et les « nurses-like cells.**



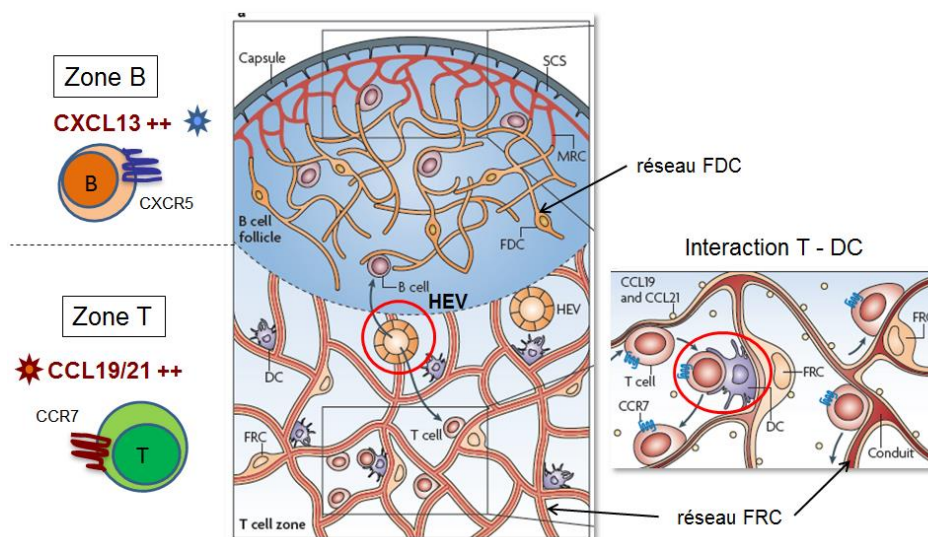
Adapté de Klaus Okkenhaug, *Curr Top Microbiol Immunol* 2016 (45)

Le lymphocyte B LLC reçoit de multiples signaux de survie des cellules de son environnement, comme par exemple l'IL-4 et le CD40L des lymphocytes T ou le couple BAFF/APRIL des cellules stromales.

### 1.4.5 La migration des lymphocytes B-LLC

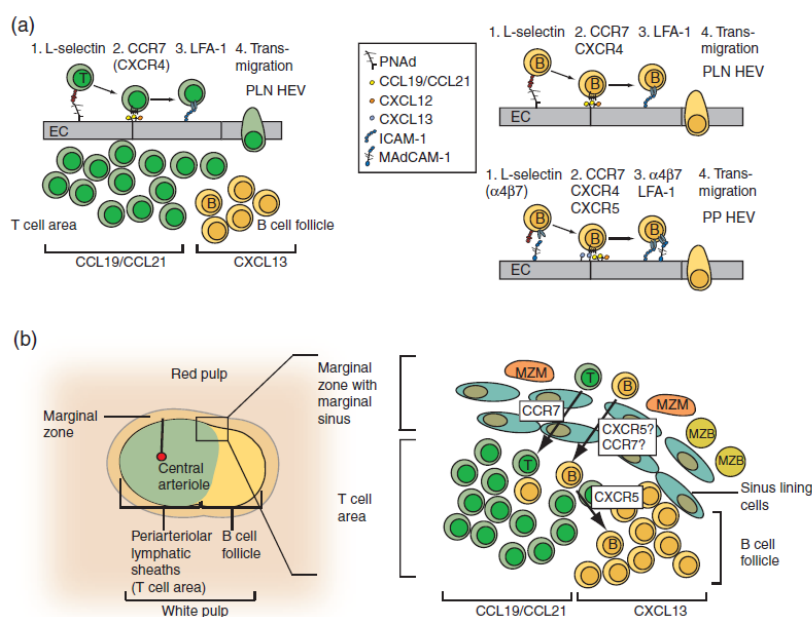
Un ensemble de chimiokines joue un rôle clé dans la migration et le maintien de l'homéostasie des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires. Pour l'entrée des lymphocytes B naïfs dans les organes lymphoïdes, les chimiokines principalement impliquées sont CCR7 et CXCR4 (**Figure 11**) (46). Le CXCL13, secrété par les cellules dendritiques folliculaires, permet d'attirer les lymphocytes B naïfs dans les follicules alors que le CCL19 et le CCL21 sont les chimiokines attirant les lymphocytes T dans la zone T des organes lymphoïdes. Après activation par la rencontre avec l'Ag, l'expression de CCR7 par les lymphocytes B augmente, à l'inverse des cellules T, permettant ainsi l'établissement d'un gradient de migration différentiel des lymphocytes B et T. Pendant la formation des centres germinatifs, CXCR4 et CXCR5 jouent un rôle important dans la migration des lymphocytes entre les zones claires et foncées (**Figure 11**).

**Figure 11. Trafic intra-ganglionnaire des lymphocytes T et B.**



Certaines chimiokines jouent un rôle prépondérant dans la migration des lymphocytes B et T dans des zones distinctes, tels CXCL13 pour les cellules B et CCL19/21 pour les cellules T.

Adapté de Turley SJ, *Nature Rev Immunol*, 2010



Adapté de Stein et al, *Immunology* 2005.

Plusieurs axes de molécules chimio-attractives, CCL et CXCL (« chemokine ligand ») et leurs récepteurs spécifiques (CCR : « chemokine receptor »), semblent être impliqués dans la migration des cellules leucémiques, tel que CXCL12/CXCR4 et CCL21 ou CCL19/CCR7, CXCL13/CXCR5.

L'axe CCL21 ou CCL19/CCR7 est impliqué dans la migration préférentielle des cellules B-LLC vers les ganglions. L'expression du CCR7 par les B-LLC est plus importante que celle des cellules de sujets sains, et leurs niveaux d'expression sont plus importants en cas de stade Rai IV et dans le sang par rapport aux organes lymphoïdes (47). Un autre axe chimio-attractif a été montré important dans la LLC et comporte le CXCL13 et son récepteur CXCR5. Ce dernier est exprimé par les lymphocytes B matures et induit le recrutement de lymphocytes B dans les follicules. Il joue aussi un rôle prépondérant dans le cheminement des lymphocytes B-1. Au cours de progression de la LLC, l'expression de CXCR5 sur les B-LLC est augmentée, et suite à l'effet du CXCL13, principalement sécrétée par les cellules « nurse-like », on note une augmentation de la capacité migratoire des lymphocytes B (48, 49).

L'axe CXCL12/CXCR4 intervient dans la régulation de l'entrée des B-LLC dans la moelle osseuse et le ganglion. L'expression membranaire du CXCR4 et du CD62L après une stimulation du BCR par un anti-IgM diminue de façon différente selon les patients LLC dont les cellules sont issues. Les B-LLC ayant une diminution de l'expression du CXCR4 et du CD62L après une stimulation du BCR ont une capacité réduite de migration vers le CXCL12 et une capacité d'adhésion diminuée, contribuant ainsi au maintien des B-LLC dans les

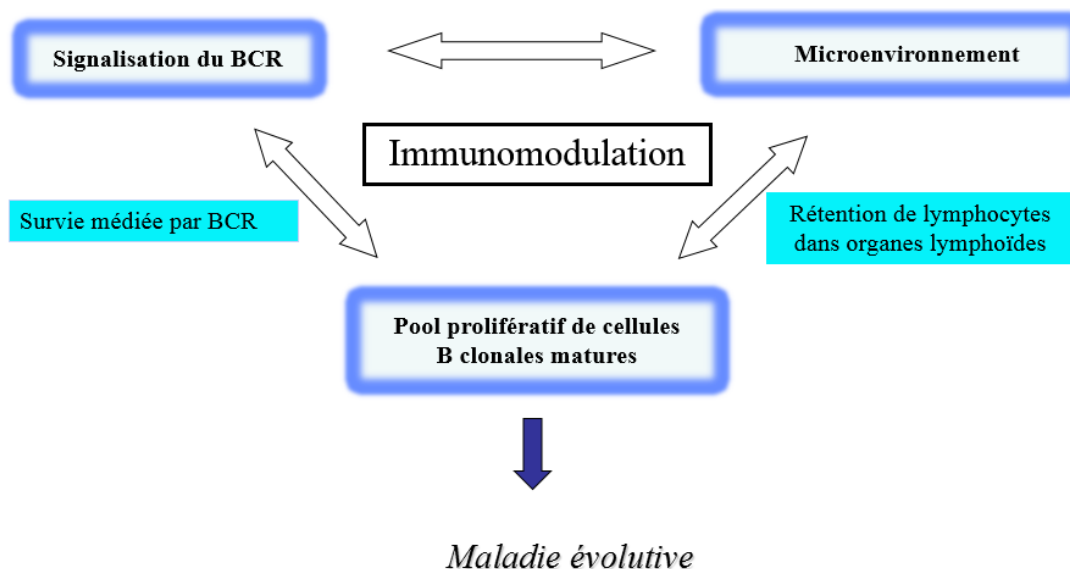


organes lymphoïdes (50). La diminution de l'expression membranaire du CXCR4 est liée à son internalisation après sa phosphorylation par la PKD ; cette dernière étant activée par la PI3K- $\delta$ , qui elle-même, est activée en réponse à une stimulation du BCR (51). L'expression de ces marqueurs CXCR4 et CD62L est corrélée à celle d'autres marqueurs de mauvais pronostic de la LLC, tel que le statut mutationnel des immunoglobulines, l'expression de ZAP-70 et la réponse cellulaire de survie à la stimulation du BCR (50). De plus, le taux de diminution de l'expression membranaire du CXCR4 en réponse à une stimulation du BCR est significativement lié à la présence d'adénopathies chez les patients, quels que soient leur statut mutationnel des IgVH.

Dans la LLC plusieurs modèles démontrent un défaut de migration des B-LLC pour sortir des organes lymphoïdes, participant ainsi à l'accumulation croissante de ces cellules dans ces organes. Une hétérogénéité dans ce potentiel de migration, en termes de niveaux d'expression et de disponibilités des différentes chimiokines et de leurs récepteurs, pourrait ainsi également rendre compte de l'hétérogénéité dans l'évolution clinique des patients.

En conclusion, de nombreux facteurs pourraient refléter l'hétérogénéité de l'évolution et de la réponse au traitement des patients atteints de LLC. Ainsi, les caractéristiques des cellules B-LLC, en particulier en terme de réponse à la stimulation du BCR, la qualité du microenvironnement pour expliquer la résistance à l'apoptose, les mécanismes à l'origine de la migration et de la rétention des B-LLC sont autant de caractéristiques pouvant impacter l'évolution clinique et ainsi rendre compte de l'hétérogénéité des patients (**Figure 12**).

**Figure 12. Modèle d'interaction des lymphocytes B clonaux avec leur environnement dans la LLC : facteurs prédictifs d'une maladie évolutive.**



Dans ce modèle d'interaction des lymphocytes B clonaux avec leur environnement, la signalisation médiée par le BCR joue un rôle clé dans la survie des cellules leucémiques, et l'interaction avec le microenvironnement participe à la rétention de ces lymphocytes dans les organes lymphoïdes, constituant ainsi un pool croissant de B-LLC à l'origine d'une maladie évolutive.

**D'après Cymbalista et al, John Libbey, 2012.**

---

## 1.5 Lymphocytes B régulateurs

---

---

### 1.5.1 Lymphocytes B régulateurs chez la souris

---

Malgré les premiers travaux effectués dans les années 1970, où le transfert adoptif de lymphocytes B activés par un antigène induisait une tolérance chez la souris naïve, le potentiel immunomodulateur des lymphocytes B n'a été démontré que récemment (52). Les souris déficientes en lymphocytes B, immunisées contre la protéine basique de la myéline (MBP), développaient une encéphalite auto-immune évolutive. L'absence de lymphocytes B présentateurs d'Ag était considérée à l'origine d'un défaut d'activation (53). Par la suite, il a été montré que cette fonction passait par l'intermédiaire de l'IL-10. En effet, les souris chimériques avec des lymphocytes B déficients en IL-10 avaient une réaction inflammatoire Th-1 persistante, avec une encéphalite auto-immune évolutive (54). Dans les modèles de colite induite, d'encéphalite auto-immune expérimentale et d'arthrite au collagène, l'addition d'IL-10 permettait une amélioration de l'inflammation (54, 55, 56). Depuis, plusieurs phénotypes de cellules capables de sécréter de l'IL-10 ont été décrits dans différents modèles cellulaires et après différentes stimulations.

- **Lymphocytes B précurseurs des cellules transitionnelles 2 de la zone marginale (T2-MZP)**

L'équipe de C. Mauri a montré que parmi les lymphocytes B spléniques, les lymphocytes B de la zone marginale correspondant au phénotype CD19<sup>+</sup>CD21<sup>hi</sup>CD23<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup>IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>hi</sup>CD1d<sup>hi</sup> (T2-MZP) étaient les principales cellules productrices d'IL-10 après une immunisation par le collagène de type II. Le transfert adoptif de ces cellules permettait de contrôler la survenue d'arthrite au collagène (57, 58).

- **Lymphocytes B10**

Par la suite, il a été montré qu'une autre sous-population de lymphocytes B spléniques (B10), avec un phénotype caractéristique CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup>, pouvait sécréter de l'IL-10 (59, 60). Le transfert adoptif des lymphocytes B CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup> permettait de diminuer l'apparition et la gravité de l'arthrite au collagène et de l'encéphalite auto-immune (55, 61).

- **Lymphocytes B TIM-1(+)**

Les protéines TIM (T cell Ig domain and mucin domain) sont une famille de molécules co-stimulatrices habituellement exprimées par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés et jouent un rôle important dans la différenciation de ces lymphocytes. Parmi ces protéines, la stimulation de TIM-1 avec un anticorps de faible affinité (RMT1-10) inhibe le développement d'encéphalite auto-immune, alors qu'un anticorps anti-TIM-1 de forte affinité induit une polarisation Th-1 et Th-17 et l'inhibition de lymphocytes T régulateurs (62).

Récemment, il a été montré chez la souris que les lymphocytes B expriment également TIM-1, et l'expression de TIM-1 est observée dans une large majorité de cellules B régulatrices IL-10 (+) (63). Les lymphocytes B TIM-1(+) induisent une différenciation Th-2, et leur transfert adoptif prévient le rejet de greffe.

- **Autres phénotypes B régulateurs**

D'autres phénotypes de lymphocytes B régulateurs dotés d'une capacité à sécréter l'IL-10 ont été décrits chez la souris (64). Les cellules dendritiques auraient la capacité d'induire une sous-population de lymphocytes B régulateurs sécréteurs d'IL-10, les CD19<sup>hi</sup>FCγRIIb<sup>hi</sup> (65). Récemment, une sous-population B PD-L1<sup>hi</sup> a été montrée avec des capacités régulatrices indépendantes de l'IL-10, mais capable d'inhiber l'expansion des lymphocytes T follicular helper (T<sub>FH</sub>). Les lymphocytes T<sub>FH</sub> sont une sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui aident à la prolifération, la commutation isotypique et l'hypermutation somatique du lymphocyte B. Les lymphocytes T<sub>FH</sub> circulants dans le sang périphérique sont caractérisés par l'expression de CXCR5 et PD-1<sup>high</sup>. Ces lymphocytes sont capables de sécréter l'IL-21, qui joue un rôle important dans l'expansion et la différenciation en plasmocytes des lymphocytes B, et le blocage de l'IL-21 dans une co-culture de lymphocytes B réduit la sécrétion des immunoglobulines par les lymphocytes B. Le transfert adoptif de cette sous-population dans le modèle animal d'encéphalite auto-immune induite, immunisé par la MBP permet de réduire la gravité de la pathologie (66). Alors que les lymphocytes B régulateurs chez la souris sont majoritairement mis en évidence dans la rate, les plasmablastes CD138<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> des ganglions auraient également la capacité d'exprimer de l'IL-10, et seraient capables d'inhiber l'encéphalite auto-immune induite (67).

---

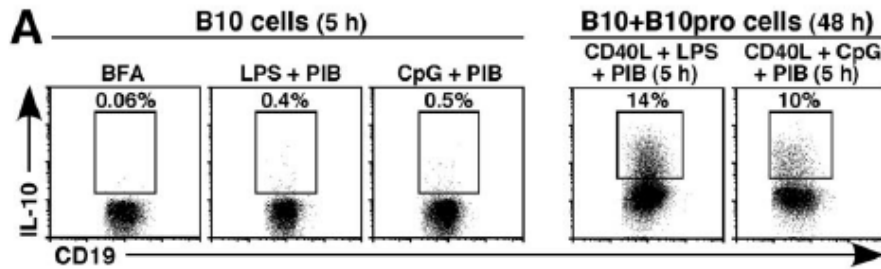
## 1.5.2 Lymphocytes B régulateurs chez l'homme

---

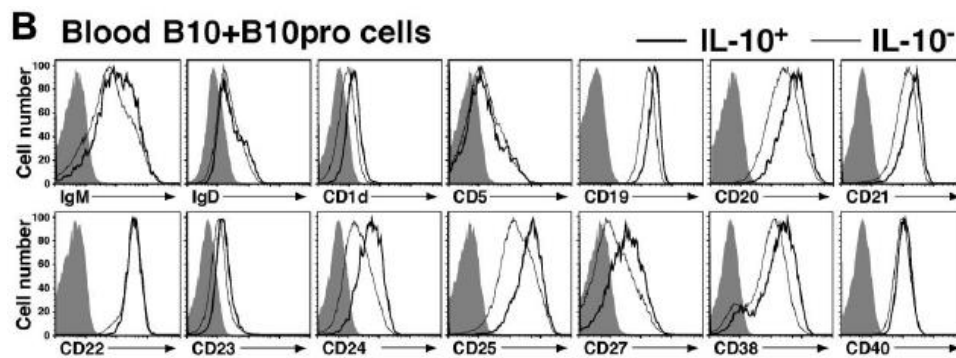
### 1.5.2.1 Phénotype des Lymphocytes B régulateurs

Plusieurs travaux chez l'homme ont également montré la capacité des lymphocytes B à sécréter de l'IL-10. Plusieurs sous-populations ont été décrites, parmi lesquelles principalement les CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> (68, 69) et les CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> (70). Cependant, il est important de considérer que ces études ont évalué la capacité de sécrétion de l'IL-10 par les lymphocytes B en réponse à une pré-stimulation *in vitro* de 48-72 heures avec un facteur soluble (anti-IgM ± CD40L) ou cellulaire (lignée cellulaire CHO exprimant le CD40L) qui est associée, dans la majorité des cas, à une stimulation de plusieurs heures avec du PIB (PMA, ionomycine et bréfeldine). Les membres de l'équipe d'Iwata ont montré qu'après une stimulation par les CPG, PMA, ionomycine et bréfeldine pendant 5 heures, 0,8 ± 0,1% des lymphocytes B exprimaient l'IL-10 (70) (**Figure 13**). En réponse à une stimulation de 48 heures avec le CD40L et le CPG, et l'addition de PIB pendant les 5 dernières heures, 7 ± 1,4% des lymphocytes B étaient alors capables d'exprimer l'IL-10 (**Figure 11**). Les lymphocytes B IL-10(+) exprimaient de façon plus importante les marqueurs CD1d, CD19, CD20, CD21, CD23, CD24, CD25, CD27, CD38 par comparaison aux lymphocytes B IL-10 (-); la majorité des lymphocytes B IL-10(+) ayant une expression largement augmentée du CD24 et CD27. Après purification cellulaire, l'expression d'IL-10 était 10 fois plus importante dans la sous-population CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>, avec un taux moyen de 3,4%, par rapport à la sous-population CD24<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup>. La capacité des sous-populations CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> et CD24<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup> à inhiber l'expression du TNF- $\alpha$  par les T CD4<sup>+</sup> étaient en revanche similaire. L'inhibition n'était pas restaurée après addition d'anti-IL-10, suggérant que le mécanisme d'inhibition des T CD4<sup>+</sup> par les lymphocytes B soit indépendant de l'IL-10. En revanche, la sous-population CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>, en comparaison avec les lymphocytes B CD24<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup>, avait une capacité plus importante à inhiber la production du TNF- $\alpha$  par les monocytes avec un effet dépendant de l'IL-10 produit (effet restauré après addition d'anti-IL10) (70).

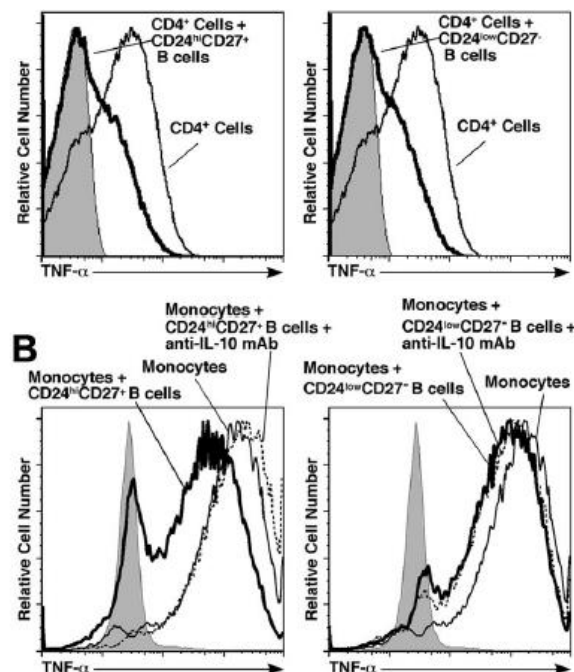
**Figure 13. Lymphocytes B régulateurs CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> et inhibition des sécrétions des monocytes et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par ces lymphocytes B.**



Les lymphocytes B sont capables d'exprimer l'IL-10 après une stimulation de 5 heures (B10) et 48 heures (B10+B10pro).



Les lymphocytes B capables de sécréter l'IL-10 sont caractérisés par un phénotype CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>.

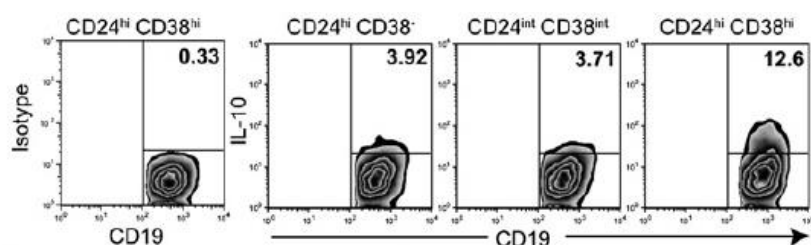


Les lymphocytes CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> comparativement aux CD24<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup>, sont capables d'inhiber la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les monocytes, mais n'inhibent pas la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

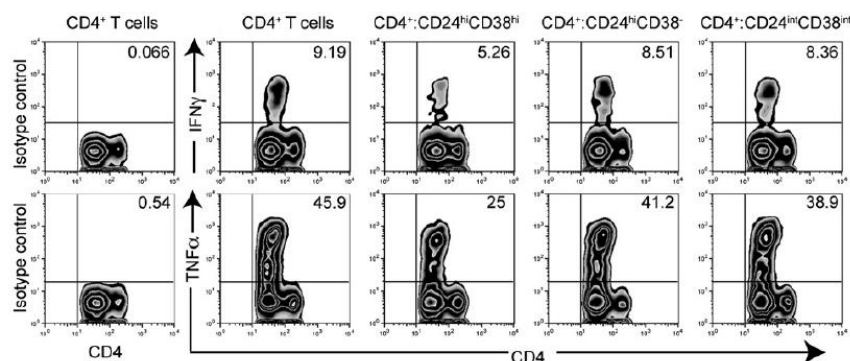
Adapté d'Iwata *et al.*, Blood 2013

Blair *et al.*, ont décrit en 2010 un autre phénotype pour les lymphocytes B régulateurs, les cellules  $CD24^{hi}CD38^{hi}$ , ayant la capacité d'exprimer l'IL-10 (68). La fréquence des cellules IL-10(+) était plus importante parmi les lymphocytes B  $CD24^{hi}CD38^{hi}$ , en comparaison avec les  $CD24^{hi}CD38^{-}$  et les  $CD24^{int}CD38^{int}$  (**Figure 14**). Les lymphocytes B  $CD24^{hi}CD38^{hi}$  avaient la capacité d'inhiber la production de  $TNF-\alpha$  et d' $IFN-\gamma$  par les lymphocytes T  $CD4^{+}$ . Cette capacité était dépendante de l'IL-10, de l'expression du CD80 et CD86, comme démontré par l'utilisation d'anticorps bloquants contre un de ces marqueurs (**Figure 14**). Par la suite, la même équipe a montré qu'en présence de  $CD24^{hi}CD38^{hi}$  on notait une augmentation des lymphocytes T  $CD4^{+}CD25^{+}$  exprimant le FOXP3, avec une capacité à supprimer la prolifération des lymphocytes T  $CD4^{+}CD25^{-}CD127^{+}$  autologues (69). Cette capacité à induire les lymphocytes T  $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{+}FOXP3$  était en partie dépendante de l'IL-10 ; la présence d'anticorps bloquants anti-TGF- $\beta$ 1, anti-CD86 ou anti-CD80 n'avait pas d'effet sur cette capacité des cellules B  $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ .

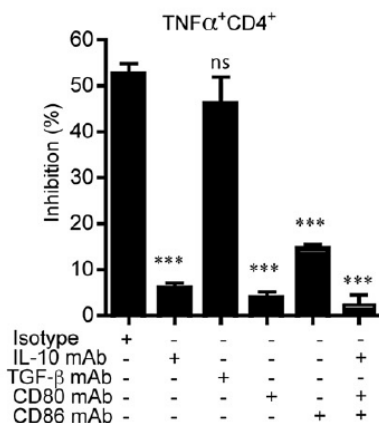
**Figure 14. Lymphocytes B régulateurs  $CD24^{hi}CD38^{hi}$  et inhibition des sécrétions des lymphocytes T  $CD4^{+}$  par ces lymphocytes B.**



Les lymphocytes B  $CD24^{hi}CD38^{hi}$  ont une expression d'IL-10 plus importante par comparaison aux B  $CD24^{hi}CD38^{-}$  et  $CD24^{int}CD38^{int}$



En co-culture avec les T CD4<sup>+</sup>, les lymphocytes B CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> ont une capacité d'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  par les T CD4<sup>+</sup> plus importante par rapport aux B CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>-</sup> et CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup>



L'inhibition de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  des T CD4<sup>+</sup> par les lymphocytes B CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> est dépendante de l'IL-10, de CD80 et CD86, mais pas de TGF- $\beta$ 1.

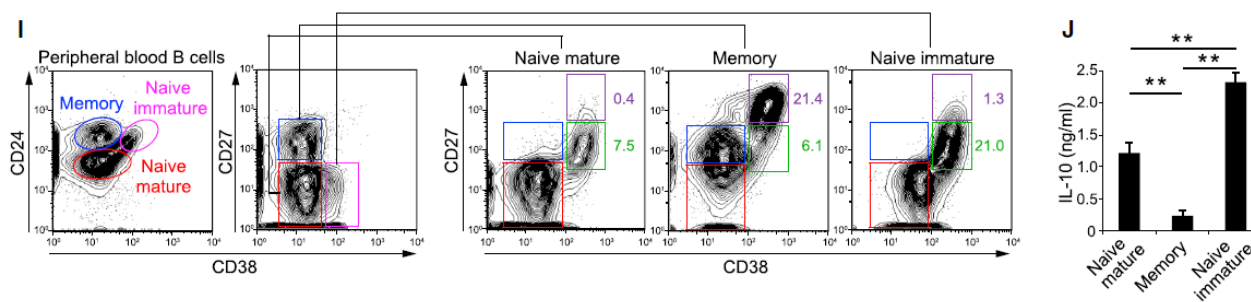
Adapté de Blair *et al.*, *Immunity* 2010.

Une autre équipe a également montré qu'une sous-population B CD19<sup>hi</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>, après stimulation du CD40 avait une capacité à sécréter de l'IL-10 (71). Cette sous-population était capable d'inhiber la production de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>; inhibition dépendante de l'IL-10.

D'autre part, Matsumoto *et al.*, ont montré que la stimulation des lymphocytes B purifiés par le CPG, l'IL-2/IL-6 et l'IFN- $\gamma$  permettait d'induire des sous-populations CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> et CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup> (67) (**Figure 15**). Après purification, la sous-population des plasmablastes CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup> exprimait plus d'IL-10 par rapport aux autres sous-populations exprimant différents niveaux de CD27 et CD38. Ces plasmablastes étaient principalement issues des lymphocytes B naïfs (CD24<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>), alors que les plasmablastes CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> étaient issues des lymphocytes B mémoires (CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> et CD38<sup>low</sup>).



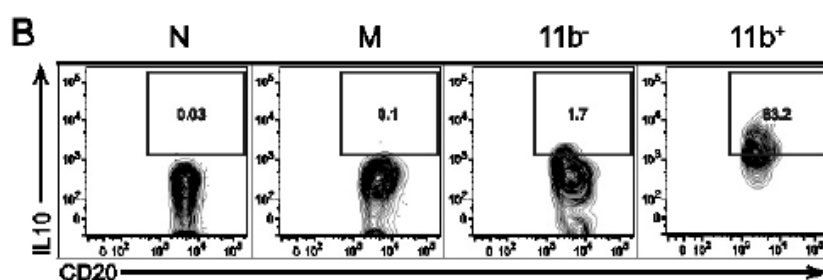
**Figure 15. Phénotype des lymphocytes B régulateurs CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup>.**



Adapté de Matsumoto *et al.*, *Immunity* 2014.

A ce jour, une seule équipe a montré la capacité d'une sous-population de lymphocytes B à exprimer de l'IL-10, en absence de toute stimulation préalable. Ces cellules sont des lymphocytes CD11b<sup>+</sup>B1 (CD3<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) (**Figure 16**). Les T CD4<sup>+</sup>, en co-culture avec cette sous-population, montrent une inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les T, alors que cette régulation n'existe pas en présence des lymphocytes B CD11b<sup>-</sup> (72) ; cet effet étant directement lié à l'action de l'IL10.

**Figure 16. Phénotype de lymphocytes B régulateurs CD11b<sup>+</sup>.**



Les lymphocytes CD11b<sup>+</sup>B1 (CD3<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) sont majoritairement responsables de l'expression d'IL-10.

Adapté de Griffin *et al.*, *Mol Medicine* 2012.

Une sous-population de lymphocytes B PD-L1<sup>hi</sup>, ayant un profil de B naïfs (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) et, persistante après un traitement de déplétion avec du rituximab, pourrait

également avoir une capacité régulatrice qui est indépendante de l'IL-10 et permet d'inhiber les lymphocytes T<sub>FH</sub> *via* PD-L1 (66).

L'ensemble des différentes études décrites ci-dessus a principalement analysé la capacité d'expression de l'IL-10 par les lymphocytes B après stimulation *in vitro*. De plus, elles ont permis de déterminer un phénotype éventuellement associé à une expression plus importante d'IL-10. Cependant, la caractérisation des cellules IL-10(+) et leur étude fonctionnelle restent un véritable défi du fait de la nécessité de la fixation et la perméabilisation des cellules permettant un marquage intracellulaire de la cytokine. Une étude récente a décrit une nouvelle méthode de purification des cellules IL-10(+) à l'aide d'un cocktail anti-cytokinique (Miltenyi Biotec) après stimulation des lymphocytes B par un anti-IgM et du CPG (73). Les cellules IL-10(+) purifiées présentaient une augmentation des ARNm du CD25, CD71 et PD-L1, avec une diminution de l'expression du CD73. Les cellules CD25<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> avaient une expression plus importante d'IL-10, ainsi que la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire T (74). Une étude transcriptomique entre les lymphocytes B IL-10(+) et IL-10(-) montrait que 0,7% transcrits étaient différentiellement exprimés. Parmi ces derniers, l'ARNm codant pour le CD11c était significativement diminué dans les cellules IL-10(+). Les lymphocytes B CD11c<sup>-</sup> ont montré une expression d'IL-10 significativement plus importante comparée à celles de lymphocytes B CD11c<sup>+</sup>. Le pourcentage de lymphocytes B CD38<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> était également plus important dans la culture des lymphocytes B IL-10(+) purifiés que dans celle des lymphocytes B IL-10(-). En revanche, la fréquence des B CD38<sup>+</sup>27<sup>+</sup> sécrétrices d'immunoglobulines était significativement plus importante dans la culture des lymphocytes B IL-10(-) (73). Les cellules B exprimant l'IL-10 pourraient ainsi avoir un profil correspondant à une évolution des lymphocytes mémoires des centres germinatifs, à la différence des lymphocytes B IL-10(-) ayant plutôt celui de plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines.

Ainsi, en l'absence d'un marqueur phénotypique caractéristique consensuel, les lymphocytes B régulateurs semblent constituer une sous-population de lymphocytes B avec des caractéristiques immunorégulatrices. De plus, ils peuvent représenter des cellules B ayant une certaine capacité dans un contexte cytokinique spécifique à acquérir des fonctions immunorégulatrices en réponse à une stimulation particulière, à l'image de la plasticité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th-1/Th-2.

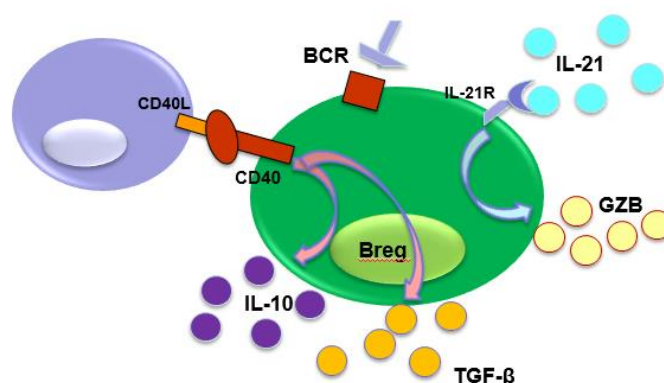
**Tableau 4. Différents phénotypes de lymphocytes B régulateurs chez la souris et chez l'homme.**

Type de lymphocytes B régulateurs	Phénotype chez la souris	Phénotype chez l'homme	Références
<b>B précurseurs de la zone marginale (T2-MZP)</b>	CD19 <sup>+</sup> CD21 <sup>hi</sup> CD23 <sup>hi</sup> CD24 <sup>hi</sup> IgM <sup>hi</sup> gD <sup>hi</sup> CD1d <sup>hi</sup>	-	(57, 58)
<b>B immatures</b>	-	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup>	(68, 69, 75)
<b>B10</b>	CD5 <sup>+</sup> CD1d <sup>hi</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD27 <sup>+</sup>	(55, 59, 60, 64, 70) (61).
<b>CD11b+</b>	-	CD20 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	(72)
<b>B TIM-1+</b>	CD19 <sup>+</sup> TIM-1 <sup>+</sup>	-	(62, 63)
<b>Br1</b>	-	CD25 <sup>+</sup> CD71 <sup>+</sup> CD73 <sup>-</sup>	(74)
<b>Plasmablastes</b>	CD138 <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup>	CD27 <sup>int</sup> CD38 <sup>+</sup>	(67)
<b>B naïfs</b>	-	CD19 <sup>+</sup> PD-L1 <sup>hi</sup>	(66)

### 1.5.2.2 Voies d'induction ou d'activation de la capacité régulatrice des lymphocytes B

Plusieurs voies de stimulation sont actuellement décrites pour induire la capacité immunorégulatrice des lymphocytes B, telle que la stimulation du CD40 (71), du BCR (76), des récepteurs Toll (Toll-Like Receptors, TLRs) (76) et de l'IL-21 (77).

**Figure 17. Voies effectrices des différents facteurs immunorégulateurs produits par les lymphocytes B.**



L'induction de la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β1 peut être dépendante de différentes voies, telles que celles du CD40-CD40L, du BCR ou encore de l'IL-21-IL-21R pour la sécrétion de Granzyme.

#### ▪ Signal CD40

Le CD40 est une protéine membranaire, membre de la famille des récepteurs de TNF. De nombreuses études ont montré que l'interaction CD40-CD40L (CD154) est essentielle à l'activation de lymphocytes B régulateurs. Le CD40, exprimé par les lymphocytes B, interagit spécifiquement avec son ligand, le CD40L, présent à la surface des lymphocytes T. La souris, déficiente en TCR- $\alpha$ , développe une colite ulcéreuse. Si le transfert de lymphocytes B issus de souris déficiente pour le CD40 (ou de lymphocytes B prétraités par un anticorps anti-CD40) ne prévient pas l'apparition de la colite, le transfert de lymphocytes B issus de souris exprimant le CD40 évite l'apparition de la pathologie (78). Dans le modèle murin d'arthrite au collagène, l'ajout d'anti-CD40 permet d'inhiber la réponse Th-1 par l'intermédiaire de l'IL-10 (55). La stimulation du CD40 par les fibroblastes transfectés avec le CD40L permet également d'induire l'expression d'IL-10 par les lymphocytes B, avec un effet synergique par

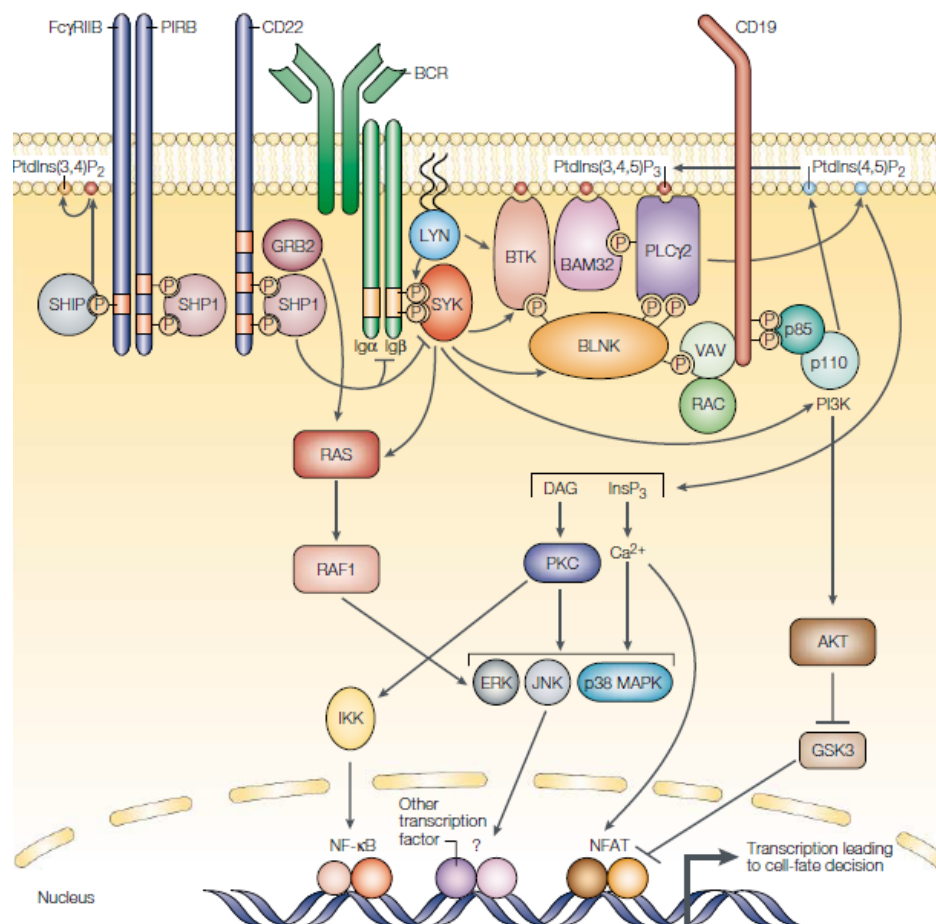
addition d'anti-IgM ou de CPG. La capacité des lymphocytes B régulateurs à inhiber la prolifération des lymphocytes T est ainsi diminuée en présence d'un anticorps bloquant anti-CD40L (71). En co-culture avec la lignée CHO exprimant le CD40L, on peut également noter une induction de l'expression d'IL-10 par les lymphocytes B CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>, alors qu'aucune induction d'IL-10 n'est observée avec des CHO n'exprimant pas CD40L (68). De même, on observe un défaut d'induction de l'expression d'IL-10 par les lymphocytes B CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> en co-culture avec les T CD4<sup>+</sup> lorsque l'on est en présence d'un anticorps bloquant anti-CD40L (68). Enfin, après la stimulation par le CPG, l'addition du CD40L à une culture de lymphocytes B purifiés permet d'augmenter significativement l'expression de l'IL-10 par ces derniers (70).

#### ▪ Signal BCR

Le signal du récepteur à l'antigène (BCR) est une voie importante pour l'activation et la prolifération du lymphocyte B, et pourrait également être importante pour l'induction des fonctions régulatrices. Dans un modèle d'encéphalite auto-immune, l'expression du CD19 (un corécepteur nécessaire au signal généré par le BCR) est directement liée à la production d'IL-10 ; en absence de CD19 on note une exacerbation de la maladie (61). La stimulation du BCR entraîne l'activation de la PLC- $\gamma$ 2 à l'aide de l'adaptateur BLNK, participant ainsi au maintien du signal calcique suivant une activation SOCE dépendante de STIM1 et STIM2. Les souris déficientes pour STIM ont une encéphalite auto-immune exacerbée, avec un défaut de sécrétion d'IL-10 (**Figure 18**)(79). Les souris BLNK<sup>-/-</sup> ont également un défaut de production d'IL-10 et une hypersensibilité allergique de contact accrue (80). Les mécanismes par lesquels le signal calcique pourrait réguler l'expression d'IL-10 feraient intervenir le facteur de transcription NFAT1 qui est déphosphorylé par la calcineurine dont l'activation dépend du signal calcique. Néanmoins, la nécessité de la stimulation antigénique pour l'activation des lymphocytes B régulateurs reste à être démontrée. Ainsi, l'addition d'anti-IgM à la culture de lymphocytes B avec le CD40L et/ou le CPG ne modifie pas le pourcentage de cellules B exprimant l'IL-10 (70). Néanmoins, les taux d'IL-10 dans les surnageants de culture de lymphocytes B stimulés par le CPG et l'anti-IgM sont plus importants qu'avec le CPG, l'anti-IgM ou le CD40L appliqués seuls (81). L'induction de la sécrétion d'IL-10 par la stimulation du BCR pourrait également être dose-dépendante, avec

une induction plus importante d'IL-10 avec de fortes doses d'anti-IgM en comparaison à la stimulation par le CPG (82).

**Figure 18. Les voies de signalisation induite par la stimulation du BCR.**



En présence de son co-récepteur CD19, l'activation du BCR induit l'activation de différentes protéines effectrices et la transcription régulée notamment par le calcium.

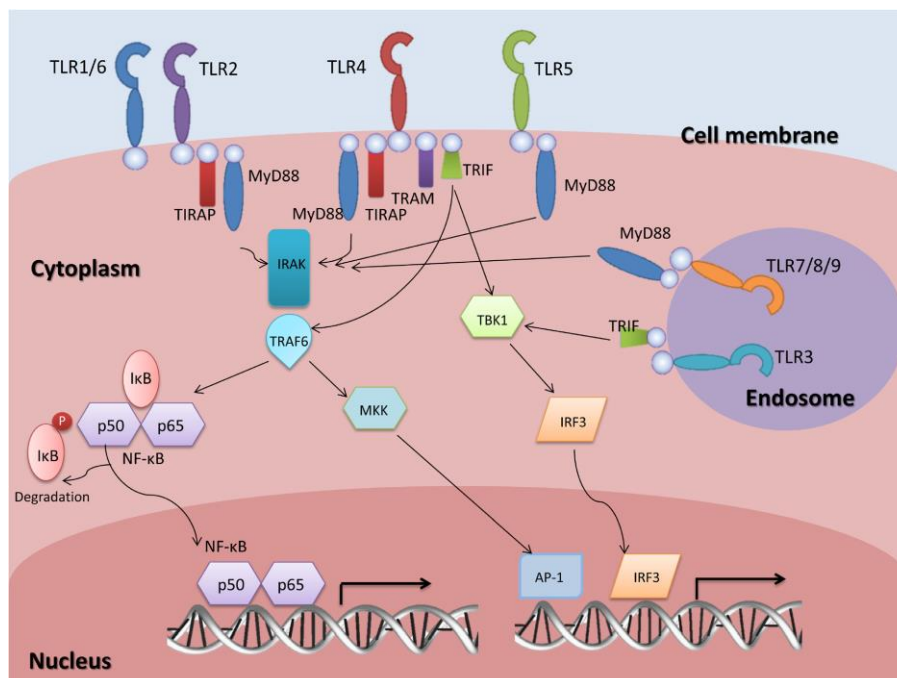
Adapté de Niuro Nat Rev 2002 (83).

### ▪ Signaux TLR

Les Toll-like receptors (TLRs) sont des récepteurs qui reconnaissent des motifs microbiens, et jouent donc un rôle essentiel dans la défense antimicrobienne. Il a été également montré que l'activation des TLR peut contribuer au développement de la réponse anti-inflammatoire et auto-immune, mais l'effet peut être variable selon le type de TLR activé (**Figure 19**). La prévention du développement du diabète chez les souris NOD après le transfert de

lymphocytes B activés par le lipopolysaccharide (LPS) a argumenté le rôle de l'activation de la voie TLR dans l'induction de la réponse anti-inflammatoire des lymphocytes B (84). Les souris invalidées pour MyD88 (molécule de signalisation des lymphocytes B et effectrice des TLRs), TLR2 ou TLR4 sur les lymphocytes B développent une encéphalite auto-immune (85). Il a été également montré que des lymphocytes B humains activés par le TLR9 sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T, ainsi que leur production d'IFN- $\gamma$ , notamment par le biais de l'IL-10 (76). La stimulation des lymphocytes B par la voie TLR9 (CPG) en présence de CD40L permettrait ainsi d'induire l'expression d'IL-10 et la capacité d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par les lymphocytes B, de manière plus importante que celle générée par la stimulation du BCR (anti-IgM), alors que la stimulation par le CPG seul serait insuffisante à induire l'expression d'IL-10 (71). Des travaux ont précisé que l'induction de l'expression de l'IL-10 par la voie des TLRs est aussi dépendante des effecteurs de signalisation tels que Syk, Btk et PI3K qui sont des effecteurs de la voie BCR (82).

**Figure 19. Voies de signalisation des TLRs.**



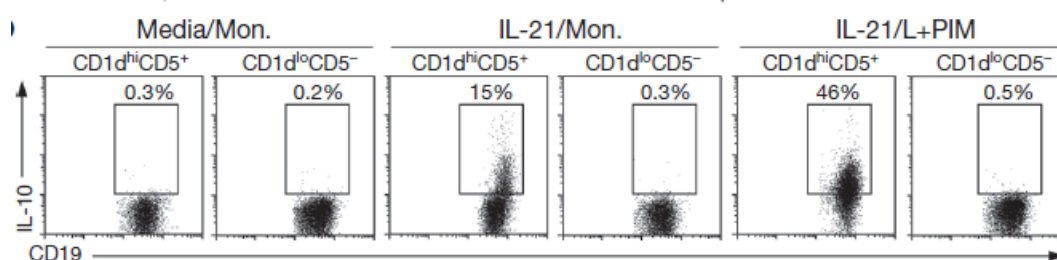
Adapté d'Isaza-Correa et al. *Journal of Hematology and Oncology* 2014 (86).

### ▪ Autres voies d'induction

Plus récemment, d'autres voies de stimulation ont été décrites pour induire l'expression de l'IL-10. Chez la souris, la culture des lymphocytes B spléniques *in vitro* avec de l'IL-21 permet d'augmenter le nombre de lymphocytes B IL-10(+), de façon similaire à une stimulation avec du LPS ; cette augmentation de l'expression d'IL-10 est caractéristique des cellules B CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> et pas les CD1d<sup>low</sup>CD5<sup>-</sup> (**Figure 20**)(77). Les cellules B CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> après stimulation par l'IL-21 ont la capacité d'inhiber la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et Th-17 (77). Au cours de l'infection par le VIH, les T CD4<sup>+</sup> sont capables d'induire l'expression de Granzyme B par les lymphocytes B. Cette activation dépend de la stimulation par l'IL-21, alors que celle par le CD40L inhibe l'expression de Granzyme B (87). L'IL-21, synthétisée par les T CD4<sup>+</sup> stimulés uniquement par anti-CD3, permettrait la commutation isotypique et la différenciation des lymphocytes B naïfs en plasmocytes, alors que son action serait plus limitée en ce qui concerne les lymphocytes B mémoires (88).

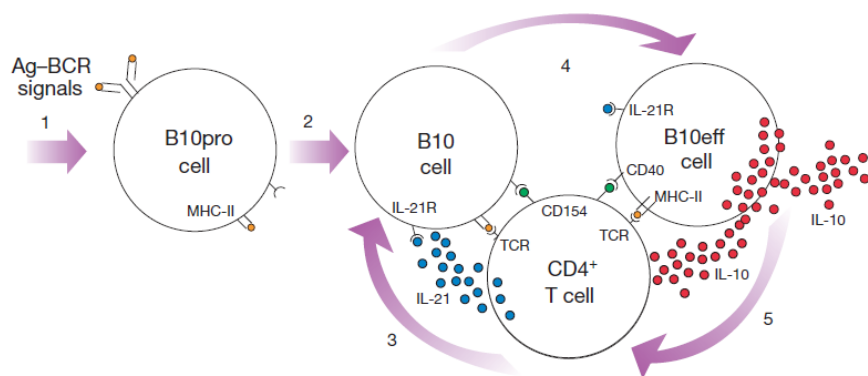
Une autre stimulus, tel que BAFF, pourrait également augmenter l'expression d'IL-10 par les lymphocytes B. BAFF est un facteur de survie et de maturation des lymphocytes B périphériques. En présence de BAFF soluble, les lymphocytes B purifiés stimulés par le CPG ont une capacité accrue à sécréter l'IL-10, la seule présence de BAFF n'étant pas suffisante à cette induction (89).

**Figure 20. Production d'IL-10 par les lymphocytes B CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> et inhibition des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**



Les lymphocytes CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> sont capables de sécréter l'IL-10 après une stimulation par l'IL-21 à la différence des lymphocytes B CD1d<sup>low</sup>CD5<sup>-</sup>





Adapté de Yoshikazi et al, Nature 2012.

### 1.5.2.3 Mécanismes d'action des lymphocytes B régulateurs : sécrétion de cytokines immunomodulatrices

#### ▪ IL-10

L'IL-10 est une cytokine produite par différentes cellules et est dotée d'effets pléiotropiques. Elle est capable de moduler l'expression de cytokines, de médiateurs solubles et de molécules de surface sur les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (90). Ainsi, elle inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF et PAF par les monocytes/macrophages activés. Elle inhibe également la production de chimiokines par ces cellules, telles que MCP, MIP, IP-10, IL-8, impliquées elles-mêmes dans le recrutement des monocytes, des cellules dendritiques, des neutrophiles et des lymphocytes T. Elle inhibe également l'expression membranaire du CD80 et CD86, du CMHII et du CD54, altérant ainsi la capacité des monocytes à activer les lymphocytes T. L'IL-10 inhibe aussi la sécrétion de cytokines et la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, tout en activant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en augmentant le recrutement, l'activité cytotoxique et la prolifération de ces cellules.

La capacité à sécréter de l'IL-10 reste l'une des caractéristiques principales définissant le lymphocyte B régulateur (*cf.* chapitre précédent). Les lymphocytes B purifiés transfectés avec un plasmide contenant le gène humain de l'IL-10 présentent une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-8 et le MIP1 $\alpha$ , et une augmentation de l'expression des cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-1R et le VEGF, ainsi que l'IL-10 elle-même (91). Les lymphocytes B exprimant l'IL-10 sont capables d'inhiber la prolifération de PBMC activés, de diminuer la sécrétion de cytokines pro-

inflammatoires par ces PBMC, et d'inhiber la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (91).

Bien qu'habituellement les caractéristiques de l'IL-10 soient anti-inflammatoires, elle peut présenter dans certains contextes une activité pro-inflammatoire, en particulier au cours de néoplasies. En effet, des études sur différents types de cancer ont montré que l'IL-10 peut favoriser l'immunité anti-tumorale en activant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les cellules Natural Killer (NK) (92). De plus, la surexpression d'IL-10 après une opération chirurgicale peut conduire à de graves complications infectieuses, alors qu'il lui est reconnu des effets protecteurs contre l'infection (93, 94). Les caractéristiques de l'environnement pourraient donc jouer un rôle prépondérant dans la balance cytokinique orientant l'effet de l'IL-10.

Plus récemment il a été montré que les lymphocytes B seraient également capables de sécréter d'autres cytokines immunomodulatrices, telles que le TGF- $\beta$ 1, les granzymes et l'IL-35.

- **TGF- $\beta$**

La famille des TGF- $\beta$  (transforming growth factor) est présente sous 3 formes (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3). Ses membres sont impliqués dans le développement et l'homéostasie de nombreux tissus et jouent un rôle dans la régulation des réponses immunitaires (95). Parmi ces 3 formes, le TGF- $\beta$ 1 est considéré est la plus étudiée dans les fonctions immunorégulatrices. Cette cytokine inhibe la différenciation des lymphocytes T effecteurs et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4. Elle permet aussi l'induction des lymphocytes T régulateurs et inhibe la prolifération des lymphocytes. Parmi les cellules immunitaires, les T régulateurs sont les principales cellules sécrétrices de TGF-  $\beta$ 1.

Après stimulation par le LPS, les lymphocytes B sont capables de sécréter du TGF- $\beta$ 1, d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et d'induire l'apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de façon TGF- $\beta$ 1-dépendante (84, 96). Dans un modèle de souris NOD avec une greffe de pancréas les lymphocytes B pouvaient exprimer le TGF- $\beta$ 1 et permettre l'induction de lymphocytes T régulateurs nécessaires à éviter le rejet de greffe.

### ▪ Granzymes

Les granzymes sont des sérines protéases qui constituent les composants essentiels des granules cytotoxiques des lymphocytes NK et T cytotoxiques. Le Granzyme B, le plus étudié, est une protéine de 32 kDa, libérée par exocytose des granules et responsable d'une destruction cellulaire perforine-dépendante par le clivage de la caspase 3 et l'activation d'autres voies cytotoxiques (97). En dehors de ces fonctions cytotoxiques, le Granzyme B pourrait jouer d'autres rôles, en particulier un effet immunomodulateur. Il a été montré que le Granzyme B pourrait être exprimé par d'autres cellules dont les lymphocytes B. L'expression de Granzyme B pourrait dépendre d'une stimulation par l'IL-21 et non pas le CD40L (87). Les lymphocytes B CD5<sup>+</sup> ont une capacité plus importante à exprimer le Granzyme B (98). Dans le modèle pathologique de la LLC, la stimulation par l'IL-21 augmente l'expression de Granzyme B par les B-LLC, mais cette expression est inférieure à celle des sujets sains (99). L'induction de l'expression de l'IL-21 est augmentée par la stimulation du BCR, alors que celle de CD40L inhibe l'expression de Granzyme B (100). Les B-LLC exprimant le Granzyme B sont capables d'induire l'apoptose des cellules n'ayant pas été stimulées par l'IL-21.

### ▪ Interleukine 35

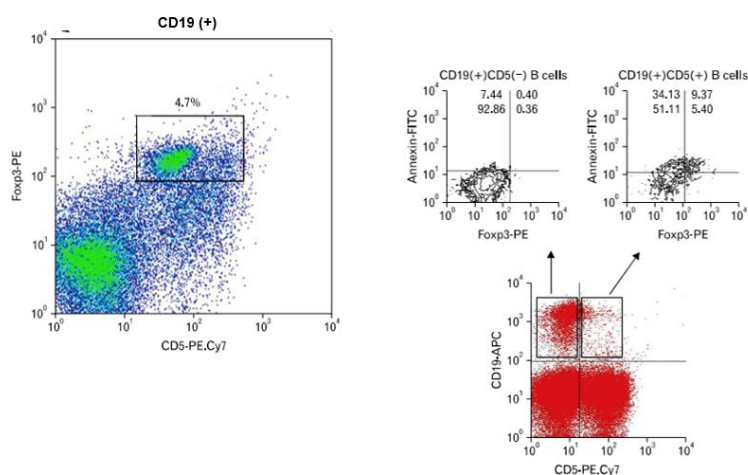
L'interleukine 35 (IL-35) est un hétérodimère composé de 2 sous-unités, p35 et EBi3. Après stimulation du TLR4 en présence du CD40L, les lymphocytes B sont capables de sécréter l'IL-35. Les souris B-p35<sup>-/-</sup> et EBi3<sup>-/-</sup> présentent une encéphalite auto-immune plus active après immunisation par le MOG35-55 (un composant de la myéline capable d'induire une encéphalite auto-immune), en lien avec une augmentation du nombre de lymphocytes Th-17 et T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ (+) (101). En utilisant de l'IL-35 recombinante, Wang et al. ont montré que le nombre de lymphocytes B exprimant l'IL-10 augmentait en présence d'IL-35. En coculture avec les lymphocytes T en présence d'IL-35 soluble, on note une inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et une augmentation des T régulateurs (102). D'autre part, l'IL-35 recombinante est capable d'induire l'expression d'IL-35 par les lymphocytes B eux-mêmes. Les souris avec une uvéite auto-immune induite ont une maladie moins active en présence d'IL-35 recombinante, avec une diminution de la fréquence des Th-17 et Th-1 dans les ganglions et une augmentation des lymphocytes B régulateurs spléniques (B220<sup>+</sup>IL-10(+)). Après plus de 10 ans de travaux sur le rôle de l'IL-10 comme régulateur des

lymphocytes B, la démonstration de leur capacité à exprimer une autre molécule modulatrice comme l'IL-35 soulève de nombreuses questions, à savoir : 1. une même population peut-elle sécréter l'IL-35 et l'IL-10? 2. Leur effet est-il synergique ? 3. Existe-il des populations différentielles ? etc. (103). Peu de données sur l'effet immuno-modulateur de l'IL-35 sont disponibles chez l'homme. Chez les patients présentant une maladie de Crohn active, le pourcentage de lymphocytes B exprimant l'IL-35 dans la muqueuse intestinale est significativement plus élevé que celui des patients avec une maladie inactive ou celui des contrôles sains (104). Les taux plasmatiques d'IL-35 sont significativement plus importants chez les patients avec un purpura thrombopénique immunologique actif ; en présence d'IL-35 soluble on observe une diminution du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> et une augmentation des lymphocytes T régulateurs, suggérant un effet immuno-modulateur de l'IL-35 (105).

#### **1.5.2.4 Autres mécanismes d'action des B régulateurs**

- **FOXP-3**

Plusieurs travaux ont essayé de caractériser, à l'image des lymphocytes T régulateurs, un facteur de transcription spécifique des lymphocytes B régulateurs. Une seule équipe a actuellement comparé l'expression des gènes des cellules B IL-10(+) et IL-10(-), sans avoir pour cela mis en évidence un facteur de transcription spécifique surexprimé dans les lymphocytes B sécrétant l'IL-10 (74). Une équipe a rapporté l'expression de FOXP-3 par les lymphocytes B, en particulier par la sous-population CD5<sup>+</sup> (**Figure 21**). Ainsi, 8,5% des lymphocytes B CD5<sup>+</sup> en l'absence de toute stimulation exprimaient le FOXP3, contre 0,1% des lymphocytes B CD5<sup>-</sup> (106, 107). Les lymphocytes B purifiés CD19<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>, après stimulation par le CPG et le CD40L pendant 48 heures, sont capables d'exprimer le FOXP3, et plus de 85% des CD19<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>hi</sup> étant alors IL-10(+)(108). Le rôle éventuel de cette expression de FOXP3 par le lymphocyte B et ses fonctions régulatrices restent actuellement indéterminées.

**Figure 21. Expression de FOXP3 par les lymphocytes B.**

L'expression de FOXP-3 par les lymphocytes B CD19<sup>+</sup>5<sup>+</sup> et les cellules FOXP-3(+) coïncide souvent avec une expression du marqueur apoptotique annexine V.

Adapté de Noh J et al, *Immunol Network* 2010.

#### ▪ IDO

L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) est une enzyme catabolisant la dégradation du tryptophane et intervient dans l'induction de la tolérance immunitaire. L'expression d'IDO serait augmentée au cours des hémopathies et participerait à l'échappement à la réponse antitumorale par le biais de l'induction de lymphocytes T régulateurs (109). La capacité à exprimer IDO par les lymphocytes B a été précédemment décrite, et l'expression d'IDO permettrait d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (110).

#### ▪ Interaction cellulaire

En plus de l'interaction des lymphocytes B avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, plusieurs études ont évalué l'interaction des lymphocytes B régulateurs avec d'autres populations, telles que les monocytes, les cellules dendritiques et plus récemment les lymphocytes T<sub>FH</sub>.

La coculture des lymphocytes B avec les cellules plasmacytoïdes dendritiques (pDC) permet d'augmenter le niveau d'expression de l'IL-10 par les lymphocytes B, cette augmentation passant par l'intermédiaire du contact cellulaire et n'impliquant pas la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par

les pDC (111). En présence de lymphocytes B, les pDC ont cependant une capacité de sécrétion d'IFN- $\alpha$  plus importante, l'addition de l'anticorps anti-IL-10 diminuant cette sécrétion.

---

## 1.6 Immunorégulation dans la LLC

---

Différents éléments plaident pour une dérégulation du système immunitaire au cours de la LLC, avec d'une part une perturbation des réponses physiologiques, telle que la diminution de la capacité de la réponse anti-infectieuse, à l'origine d'une augmentation du risque infectieux ; la diminution de la tolérance favorisant l'émergence de certaines manifestations auto-immunes, et d'autre part des mécanismes d'adaptation immunitaires pouvant favoriser la prolifération et la survie du clone LLC tout en empêchant la réponse anti-tumorale.

L'augmentation de la fréquence des manifestations auto-immunes est bien établie au cours de la LLC, en particulier celle des cytopénies auto-immunes. Il s'agit d'anémie hémolytique auto-immune, de purpura thrombopénique immunologique et plus rarement de neutropénie auto-immune. Parmi les 1750 patients présentant une LLC suivis à la « Mayo Clinic Rochester » pendant 10 ans, 75 (4,3%) ont présenté une cytopénie auto-immune au cours du suivi (112). Dans la majorité des cas les cytopénies auto-immunes survenaient après le diagnostic de LLC (72%), l'anémie hémolytique auto-immune étant la manifestation la plus fréquente (55%). La survie des patients était similaire en présence ou non de cytopénies auto-immunes, quel que soit le type, à la différence des cytopénies en lien avec une atteinte centrale associées à un mauvais pronostic (113). Shvidel et al. ont montré une survie significativement moindre en présence d'anémie hémolytique auto-immune par rapport à 1264 contrôles LLC sans cytopénies (114). Parmi 378 patients LLC, 56 (14,8%) avaient au moins une positivité de Coombs au cours d'un suivi sans stigmates d'anémie hémolytique, et les patients avec un Coombs (+) avaient plus fréquemment un statut IGHV non-muté que les patients avec un Coombs négatif (77% versus 32% ;  $p < 0.001$ ) (115). En analyse multivariée, un Coombs (+) (HR =3.2 ; CI95% (1,5-6,6) ;  $p = 2.10^{-3}$ ), ainsi que le statut IGHV non-muté et une  $sTK > 10$  sont les seuls paramètres indépendamment associés avec la survie globale. D'autres manifestations auto-immunes sont décrites au cours de la LLC, bien que de façon plus exceptionnelle (116). Les mécanismes à l'origine de ces manifestations auto-immunes restent encore imprécis. En particulier l'origine des autoanticorps anti-globules rouges ou

anti-plaquettes reste controversée : production d'autoanticorps par les lymphocytes B-LLC ou par les lymphocytes B normaux non clonaux ? Parmi les hypothèses évoquées pour expliquer cette auto-immunité exacerbée, le lymphocyte B-LLC pourrait agir comme une cellule présentatrice d'autoantigène activant ainsi une réponse T spécifique et induisant une production d'autoanticorps polyclonaux par les lymphocytes B normaux. Le lymphocyte B-LLC pourrait sécréter également des anticorps monoclonaux ; ce mécanisme étant plus impliqué dans les manifestations de type pemphigus paranéoplasique. Les B-LLC pourraient sécréter également des cytokines, telles que le TGF- $\beta$ 1, l'IL-6 et l'IL-10, en induisant une dérégulation des mécanismes de tolérance périphérique.

La LLC est une hémopathie particulièrement complexe sur le plan de l'interaction avec le système immunitaire. Mis à part l'interaction avec le microenvironnement pour augmenter la prolifération la survie et la migration cellulaire, les cellules B-LCC pourraient moduler les réponses anti-tumorales du système immunitaire. Le nombre des différentes sous-populations NK ne varierait pas au cours de la LLC par comparaison avec des témoins sains (117) (118). En revanche, les capacités cytotoxiques des NK pourraient être réduites au cours de la LLC, en particulier chez les patients avec une maladie progressive (117). L'expression du récepteur NKG2D, un récepteur activateur clé dans la réponse anti-tumorale des NK, serait diminuée dans la LLC, en particulier en cas de maladie évolutive. Les fonctions altérées des NK au cours de la LLC seraient néanmoins réversibles, et le traitement par le lénalidomide permettait de restaurer la fonctionnalité des NK (119). La stimulation par l'IL-21 permettrait d'augmenter la capacité cytotoxique des NK, ainsi que le nombre de NK exprimant l'IFN- $\gamma$  (118). Le pourcentage de NK exprimant l'IFN- $\gamma$  est significativement plus important lorsque ceux-ci sont en culture avec des PBMC dépourvus de cellules B-LLC, à la différence de témoins sains, suggérant ainsi que l'altération de la fonction des cellules NK pourrait être induite par les B-LLC (118).

Une augmentation de la réponse Th-17 est également notée au cours de la LLC, à la fois dans le sang circulant, les ganglions et la rate (120). D'autres cellules non Th-17, exprimant quand même l'IL-17, sont également détectables dans la LLC, et les taux d'IL-17 dans le sang sont plus élevés chez les patients avec des facteurs de bon pronostic associés à une meilleure survie (120). Les niveaux d'IL-17 plasmatiques et de Th-17 circulants seraient plus élevés chez les patients de stade A et les patients CD38(-) et ZAP70(-), alors que le traitement par le lenalidomide permettrait d'augmenter la fréquence des Th-17 (121, 122). De même, les taux de lymphocytes Th-17 plasmatiques sont plus importants chez les patients ayant une

cytopénie auto-immune avec un faible rapport Treg/Th-17, alors qu'un rapport Treg/Th-17 élevé serait observé chez les patients avec une maladie évolutive de stade C (123).

Des données controversées sont disponibles en ce qui concerne les lymphocytes T régulateurs dans la LLC, en particulier leur fréquence selon le stade de Binet et les marqueurs pronostiques. La fréquence des lymphocytes T régulateurs est augmentée chez les patients ayant une LLC ; cette augmentation suit le stade Binet, sans corrélation avec le statut ZAP-70, l'expression de CD38, ni le statut mutationnel (124) (125). Certains marqueurs caractéristiques des T régulateurs, tels que l'expression diminuée du CD127, pourraient être modifiés au cours de la LLC, de même que le pourcentage de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> exprimant le FOXP3 serait significativement augmenté dans la LLC (126). La capacité suppressive des lymphocytes T régulateurs serait similaire pour des patients atteints de LLC par rapport à des sujets témoins ; La fréquence des différentes populations exprimant le FOXP3 étant plus importante chez les patients CD38(-)/ZAP-70(-), alors qu'une autre étude a montré des taux plus importants en cas de stade Rai élevé (126). Des lymphocytes CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> exprimant le FOXP3 ont été également mis en évidence au cours de la LLC, avec une fréquence croissante en cas de maladie progressive (125).

A côté de cette dérégulation des réponses immunitaires physiologiques, il pourrait exister une immunomodulation induite par le clone LLC qui participerait à la survie et la prolifération clonale. Certaines similitudes, telles que l'expression du CD5 et la capacité de production d'IL-10, soulèvent la question des capacités régulatrices des B-LLC clonaux, à l'image de la sous-population B régulatrice non-clonale précédemment décrite. Il a été décrit que les niveaux d'IL-10 sont élevés au cours de la LLC en corrélant avec le stade Rai, les taux de  $\beta$ 2-microglobuline et de LDH. Les taux sériques d'IL-10 sont aussi associés avec une diminution de la survie globale, avec une survie à 2 ans à 62% en cas de taux élevés *versus* 92% en présence de taux normaux (127 , 128). Les taux d'IL-10 élevés sont également associés à des niveaux d'expression de CD38, ZAP-70 et l'état non-muté des gènes IGHV (128). A l'état basal, sans stimulation préalable, 22/24 (91%) patients de stade A montrent une expression d'IL-10 (129). D'autre part, les cellules B1 normales et les cellules B-LLC de la souris transgénique Tc11 (modèle murin principal de la LLC) partagent de nombreuses similitudes. Ainsi, leur capacités d'expression d'IL-10 sont similaires, avec des niveaux plus importants pour les cellules LLC, ainsi que l'augmentation de l'expression d'IL-10 après stimulation du BCR, avec une diminution des niveaux d'expression avec les inhibiteurs de Btk et Syk, confirmant l'implication de la signalisation du BCR des cellules B1 normales et B-LLC pour



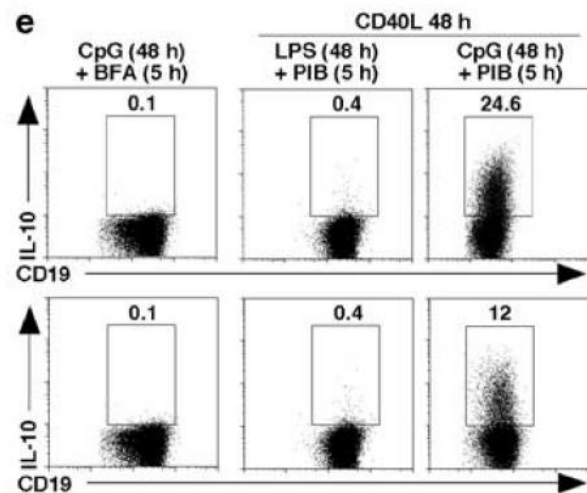
l'expression d'IL-10 (130). L'expression du CD5 est liée à la production d'IL-10 dans les cellules B-LLC. En effet, les médianes de fluorescence du CD5 des cellules IL-10(+), évaluées par cytométrie, sont plus élevées que celles des IL-10 (-) ; l'expression du CD5 étant nécessaire à la production d'IL-10 comme le montre la stimulation du CD5 qui augmente l'expression de l'IL-10 (131, 132). Par ailleurs, l'IL-10 serait nécessaire à la survie des lymphocytes B1. En effet, les souris traitées par un anti-IL-10 montrent une diminution importante des lymphocytes B1, sans modifier le nombre des autres sous-populations B (133).

Chez les patients atteints de LLC, il existe une augmentation de la survie des lymphocytes B leucémiques en culture en présence de BAFF et lorsque ces cellules B de LLC sont cultivées avec des cellules du microenvironnement qui sont capables de sécréter du BAFF (134). Les taux plasmatiques de BAFF sont corrélés aux taux d'IL-10 au cours de la LLC (135). Toujours en présence de BAFF, et après stimulation par le CPG, les lymphocytes B-LLC augmentent leur capacité d'expression d'IL-10 ; cette induction d'expression d'IL-10 étant inhibée par un anticorps anti-BAFF-R (135). Ainsi, au cours de la LLC, BAFF contribuerait également à l'augmentation du niveau d'expression de l'IL-10 par les lymphocytes B-LLC, permettant de moduler l'activité anti-tumorale de ces cellules. La présence de lymphocytes B exprimant le Granzyme B a été montré au niveau de plusieurs tumeurs de façon concomitante aux lymphocytes T exprimant l'IL-21, suggérant ainsi la possibilité d'immunorégulation des réponses tumorales par les lymphocytes B (98).

A l'heure actuelle, très peu d'études ont spécifiquement évalué la sous-population B régulatrices au cours de la LLC (136). Après culture des PBMCs avec une stimulation par le CD40L associée au CPG pendant 48 heures, suivie d'un traitement par le PIB pendant 5 heures, 78 des 91 patients LLC (88%) avaient une expression d'IL-10 ; les B-LLC CD5<sup>+</sup> ayant une expression d'IL-10 significativement plus importante par rapport aux contrôles (**Figure 22**). Seuls 10% des patients n'avaient pas d'expression d'IL-10 dans ce modèle de stimulation. De plus, les cellules B-LLC IL-10(+) présentaient un phénotype similaire aux contrôles, avec un profil CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>. La fréquence des cellules IL-10(+) était plus importante chez les patients dotés d'un statut d'immunoglobulines muté. Cependant ce lien n'est montré qu'après considération des niveaux d'expression après 5 heures de stimulation avec le PIB ; cette différence n'étant pas observée après la culture de 48 heures. Dans ce travail, aucun autre paramètre pronostique de la LLC n'était corrélé à la capacité d'expression d'IL-10 après stimulation. Après culture des PBMCs avec une stimulation par CPG pendant 24 heures, suivie de PIB pendant 5 heures, des niveaux variables de sécrétion d'IL-10 sont

montrés (de 1.1 à 34.4%)(137). Dans cette étude, les fréquences de cellules IL-10(+) sont plus importantes en cas de statu IGVH muté parmi les 27 patients analysés, avec une corrélation avec les taux ARNm et les surnagants de culture.

**Figure 22. Capacité de sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B LLC.**



Les lymphocytes B-LLC ont une capacité d'expression d'IL-10 *in vitro* après stimulation (images représentatives de 2 patients LLC).

Adapté de DiLillo *et al.*, *Leukemia* 2012



---

## 2 OBJECTIFS

---

La LLC est une maladie hématologique caractérisée par la prolifération et la rétention dans les organes lymphoïdes secondaires des lymphocytes B clonaux. Cette expansion clonale se fait au détriment des autres sous-populations B non-clonales, avec la modification par la population B clonale de l'environnement immunologique et stromal induisant un contexte favorable à la survie et à la prolifération maligne. Au sein de cette population clonale, d'autres mutations sous-clonales pourraient expliquer la progression différente et hétérogène parmi les patients atteints de LLC, et les mécanismes d'adaptation immunologique induits par la population clonale pourraient au moins en partie rendre compte de cette différence de survie cellulaire et de prolifération cellulaire clonale. Depuis la description d'une sous-population de lymphocytes B ayant la capacité de sécréter l'IL-10 et de moduler la réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>, plusieurs travaux ont évalué la fréquence et les sous-populations lymphocytaires B avec des capacités immunorégulatrices chez le témoin sain, ainsi que dans différentes situations pathologiques. La majorité des études s'est néanmoins intéressée aux sous-populations lymphocytaires CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> et CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>, des sous-populations sécrétrices d'IL-10 les plus fréquemment étudiées. Peu d'études ont évalué les capacités d'expression d'autres cytokines telles que le facteur de croissance TGF-β1 ou le facteur de transcription FOXP3 dans l'induction des fonctions régulatrices, ainsi que l'existence d'autres sous-populations lymphocytaires B. Une seule étude dans la LLC a montré l'augmentation de l'expression d'IL-10 en ciblant uniquement la sous-population CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>. Cependant, l'existence de similitudes phénotypiques et fonctionnelles tend à indiquer un profil B régulateur pour la cellule B-LLC clonale.

Les objectifs de ce travail ont été:

- D'évaluer les capacités des lymphocytes B-LLC à exprimer les cytokines immunomodulatrices, telles que l'IL-10, le TGF-β1 et le Granzyme B, ainsi que le facteur de transcription FOXP3 ;
- De déterminer les marqueurs d'expression membranaires phénotypiques permettant de définir les sous-populations avec des capacités de sécrétion et d'expression de facteurs immunorégulateurs (cytokines IL-10, TGF-β1 et le facteur de transcription FOXP3) dans la LLC ;

- De déterminer le rôle immunomodulateur potentiel de ces différents facteurs exprimés par le lymphocyte B-LLC et l'impact de leur expression sur les sous-populations lymphocytaires T CD4+ et T régulatrices, et inversement permettant d'expliquer l'expansion clonale
- De valider la corrélation entre la capacité d'expression des facteurs immunorégulateurs et les caractéristiques cliniques et pronostiques de la LLC.



---

### **3 RESULTATS**

---

**Enhanced immune-regulatory B cells function in progressive chronic lymphocytic leukemia patients.**

Arsene Mekinian (1, 2), Anne Quinquenel (1, 2), Marouane Boubaya (4), Maïssa Mhibik (1, 2), Laure Aubard (1, 2), Elisabetta Dondi (1, 2), Noémie Abisror (1, 2), Rémi Letestu (1, 2,3), Vincent Lévy (2, 4), Florence Cymbalista (1, 2, 3), Christine Le Roy\* (1, 2) and Nadine Varin-Blank \*(1, 2).

(1) INSERM, U978, Bobigny, France

(2) Université Paris 13, PRES SPC, Labex INFLAMEX, UFR SMBH, Bobigny, France

(3) Service d'hématologie biologique, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

(4) URC et CRC, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

(5) INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France

(6) Université Paris Descartes, PRES SPC, Labex INFLAMEX, Paris France

\* Co-Senior authors

Correspondence and reprints to: Nadine Varin-Blank and Christine Le Roy

UMR InsermU978/ Université Paris 13

UFR SMBH

74 Rue Marcel cachin

93000 Bobigny

France

Email: [nadine.varin@inserm.fr](mailto:nadine.varin@inserm.fr) and [christine.le-roy@inserm.fr](mailto:christine.le-roy@inserm.fr)



Original article

**Conflicts and findings: none**

**Running title: B regulatory cells function in CLL**

**Words:** abstract (202), manuscript (5460), 2 tables and 6 figures, 7 supplementary figures

## **ABSTRACT**

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a clonal B cell malignancy of the elderly. This neoplasm is characterized by a heterogeneous clinical course from chronic indolent to rapidly progressive disease that escape to tumour clearance. This study presents a comprehensive phenotypic and functional analysis of the CLL B cell subpopulations accountable for their survival advantage. Cytokines profiling of CLL B cells from a cohort of patients evidences the production at various extents of immune-regulatory cytokines, especially IL-10 and TGF $\beta$ 1. Remarkably, CLL cells express also the FOXP3 transcription factor, an original marker of regulatory T cells. The three proteins are produced by subpopulations with specific phenotypic signatures and markers of activated and memory B cells, distinguishable from other regulatory B cells populations and based on the level of expression of CD19 and CD5. Functional studies prove their regulatory capacities targeting T cell differentiation, proliferation and secretion, contributing to the T cell dysfunction and immune survey observed in CLL patients. Combining IL-10, TGF $\beta$ 1 and FOXP3 expressions by these subpopulations in a poly-functional index strongly correlated with major risk factors of progression. Use of combined profile benefits to the prediction of progression and highlights the importance of immune dysfunction in CLL B cell survival and disease.

## Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a prevalent elderly lymphoid malignancy presenting with a heterogeneous clinical course. Some patients experience a progressive disease with rapid poor outcome while others exhibit an indolent leukemia that does not impair life expectancy (138). The disease is due to the clonal expansion of small, mature B lymphocytes, which accumulate in the bone marrow, blood and secondary lymphoid organs. In progressive patients requiring specific treatment, chemoimmunotherapy is not curative and residual clonal cancer cells re-populate both lymphoid organs and peripheral blood with ineffective antitumor immune surveillance. The clinical heterogeneity of CLL has been thoroughly investigated and related to phenotypic features among which CD5, CD19 or CD38 expression. Moreover, genetic studies have pointed out the importance of the mutational status of the immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) genes expressed at the cellular membrane and of the antigen receptor (BCR) – triggered pathways leading to apoptotic defect. Both aspects converge to an active antigen-driven selection in the clonal expansion of the cells. Indeed, both genetic and functional studies have indicated the relevance of signals propagated upon BCR triggering in the heterogeneity of leukemic cell survival *in vitro*. BCR effectors such as Syk kinases, Phospho Lipase C gamma or NFAT transcription factors are often overexpressed and constitutively activated in B-CLL cells and allow the expression of target genes important for cell survival. Moreover expression of additional activators, such as the zeta chain associated protein (ZAP-70) commonly expressed in T and NK cells, is regularly associated with increased cell survival. In addition, the capacity to generate and propagate such activating signals at the cellular level correlates with disease progression.

The important driving force of the BCR initiated signal is especially encountered in lymph nodes, which is an important site for antigen recognition and may account for the accumulation of the malignant cells in synergy with microenvironment factors. Importantly, an imbalance of the immune sub populations present in lymphoid organs of CLL patients is also observed. T cell subsets that

account for immune survey in tumor development encompassing CD4<sup>+</sup> and regulatory T cells (Tregs) have altered ratio in these hematological malignancies. Notably, Tregs are increased in CLL and correlate with several clinical/biological features of a progressive disease while CD8<sup>+</sup> T cells from CLL patients show functional defect in proliferation and cytotoxicity, but preserved cytokine production reflecting T-cell exhaustion (139). Such important signals are also retrieved during normal B cell development with strength of the generated activation being key for peritoneal B1 cell expansion in the mice. Studies unraveling the functional properties of the murine specific B1a (CD5<sup>+</sup>) lineage have uncovered regulatory properties leading to related bias of the immune cells repertoire among which expansion of the T-reg population and suppression of Th1 and Th17 differentiation. Recent data have shown that these B cell subsets play a protective role in various inflammatory animal models such as hypersensitivity, inflammatory bowel disease and lupus through the production of IL10. They are ascribed to regulatory B cells (B regs) and several phenotypes have been reported as progenitor population (140). Among others, murine CD5<sup>+</sup> B1a and CD1d<sup>high</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>high</sup> B10 cells are IL-10 producing cells. Human B reg subsets, based on their capacity to suppress Th1 differentiation and convert CD4<sup>+</sup> T cells into Treg *via* IL10 production, have also been described. In peripheral blood from both healthy individuals and patients with autoimmune diseases or neoplasms, various IL10 producing subtypes have been reported. The latter include CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> immature B cells, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> B10 cells, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD147<sup>+</sup> granzyme B<sup>+</sup> cells and CD27<sup>intermediate</sup>CD38<sup>high</sup> plasmablasts (68) (70) (67) (98). Induction of IL10 in the various subsets seems to require signals from activated CD4<sup>+</sup> T cells with CD40L playing a major stimulatory role while IL21-dependant signals induce granzyme (GrB) producing B cells preferentially (99). Additional induced Bregs can also exert their suppressive mechanism via the production of TGF-β1 and indoleamine-2,3 dioxygenase (IDO) (110).

Remarkably, the majority of these phenotypic features are commonly observed in B-CLL populations irrespective of their IGHV mutational status. Due to the expression of CD5, CLL B cells have been hypothesized for decades as derived from the B1 lineage. At present, CLL B cells are considered as

antigen-experienced B cells with an IGHV mutational status reflecting a T-dependent (mutated IGHV, M-IGHV) or T-independent (unmutated IGHV, UM-IGHV) memory phenotype with expression of CD27 in both cases (138). CLL malignant B cells have a clear survival advantage toward the other normal B cells. Upon CD40 triggering or CpG treatment, CLL B cells, predominantly with mutated IGHV, have been shown to express elevated IL10 and have comparative immunosuppressive capacities to B10 cells (137).

In the present study, we undertook a comprehensive analysis of the capacity for CLL cells to produce in response to BCR triggering important cytokines involved in immune modulation and in remodeling the tumor microenvironment. We evidenced a subset of tumor cells of variable prominence with the capacity to produce both elevated IL10 and inducible TGF- $\beta$ 1. Importantly, the cells also express the transcriptional factor FOXP3 that is a hallmark of regulatory T cells. Cells that produce these three regulatory markers display a specific signature somehow different from the already described B10 cells. Evidently, these cells share the regulatory properties attributed to Breg cells toward both CD4+ T cells. Finally, we provide evidence for an amplification of these phenotypic features between indolent and evolutive disease and along disease progression. These novel findings provide important insights on how CLL cells modify their environment to their advantage and markers for a better care of the patients.

## **Patients and methods**

A cohort of 30 CLL patients was used in this study. CLL diagnosis was confirmed using international guidelines (141) and approved by the local ethic committee (Ile de France X, Aulnay Sous Bois). The clinico-biological parameters (Service d'Hématologie Biologique de l'Hôpital Avicenne) were analyzed for each patient, such as Binet stage, CD38 and ZAP-70 expressions, IGHV gene mutational status and time to treatment (**Table 1 A-B**). All, except 4 patients have no CLL specific treatments at the time of B cells experiments.

## **Human cells isolation and cell culture**

B and T CD4<sup>+</sup> lymphocytes were isolated from total blood using Rosette B and CD4<sup>+</sup> T isolation kits (STEMCELL). Isolated B and T cells subsets purity was assessed by flow cytometry analysis and was typically > 95%. Isolated B and T cells were cultured in RPMI 1640 containing L-glutamine and supplemented with 100 U/mg/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies, USA), and 10% FCS (Biosera, UK) in 48-well plates (Nunc, Langensfeld, Germany) at 37°C in humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub>. MTS was assessed as previously described (39).

## **Cell sorting**

Cell sorting was performed with purified B-CLL peripheral blood cells subsequently labeled with PE-Vio770 anti-CD19, PerCP-Vio700 anti-CD3, APC-Vio770 anti-CD5 and VioBlue anti-CD27 (Miltenyi Biotec). After discrimination on FSC-H/FSC-W and SSC-H/SSC-W parameters, gating on CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD5<sup>+</sup> and CD27<sup>high</sup> cells was performed. Sorted cells were then lysed to perform Western Immunoblotting experiments. Cell-sorting experiments were performed on a FACS ARIA III cell sorter (BD Bioscience).

## **Western blotting**

Sorted cells were lysed in NP40 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 10% Glycerol). Proteins (2 to 20 µg) were separated on a 10% polyacrylamide denaturing gel, transferred on a nitrocellulose membrane and incubated overnight at 4°C with rabbit anti-Foxp3 antibody (Cell Signaling Technologies) and 1 h at room temperature with mouse anti-β actin antibody (Sigma Aldrich), followed by appropriate secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody. Detection was performed using ECL kit (Bio-Rad) and images acquired with a Chemidoc MP (BioRad). Densitometric analysis of immunoblots was performed using the ImageLab software (Bio-Rad).

## **Cytokines detection**

Intracellular cytokine expression was analyzed using  $2 \times 10^6$  CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> B cells that were stimulated or not with a combination of soluble CD40L (1 µg/ml; Miltenyi) and coated anti-IgM (20 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) or a combination of soluble CD40L and IL21 for 72 hours. For B and CD4<sup>+</sup> T co-culture experiments, B and T cells were distributed in different ratios (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10) reaching a maximal cell number of  $2 \times 10^6$  cells. For flow cytometry analysis of T cell division, CD4<sup>+</sup> T cells were labeled with CellTrace Violet (Invitrogen) up to isolation according to the manufactures' recommendation. B cells were stimulated as described above, whereas T cells were stimulated by purified plate-bound CD3 mAb (Hit-3a) (10 µg/ml; Ebioscience) and CD28 mAb (CD28-2) (1 µg/ml; Ebiosciences) for 72 hours. For the last 4 hr of cell culture, Brefeldin A (10 µg/ml; Sigma Aldrich), PMA (500 ng/ml; Sigma Aldrich) and Ionomycin (1 µg/ml ; Sigma Aldrich) were added.

B cells were labeled with anti-CD19 conjugated to V500, CD5/V450, CD24/FITC, CD25/APC-Cy7, CD27/PerCP5.5 and CD38/PE-Cy7 mAbs (BD Biosciences) for 20 min. After washes, cells were fixed (2% PFA in PBS 1X), permeabilized (0.5 % saponin and 1% BSA in PBS 1X) and stained with anti-IL10-APC and -FOXP3-PE or -TGFβ1-PE mAbs or with their respective isotypes (BD Biosciences) for

overnight at 4°C to determine the gates of the cytokine expression. Flow cytometry analysis was performed using the FACS Canto II driven by DIVA software (Becton Dickinson) and analyzed with the FlowJo software (Miltenyi).

For B and T CD4<sup>+</sup> co-cultures, cells were stained with CD19-V500, CD5-FITC, CD25-APC-Cy7, CD127-PE-Cy7 mAbs (BD Biosciences). Then, cells were fixed, permeabilized and stained with anti-IL10-APC, IFN $\gamma$ -V450, TNF $\alpha$ -PE and FOXP3-PerCP5.5 or TGF $\beta$ 1-PE mAbs (BD Biosciences).

Supernatants from B, CD4<sup>+</sup> T and B/ CD4<sup>+</sup> T cell cultures and co-cultures were frozen at -80°C and various cytokines (IL-1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL13, IL17, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ , as well as TGF $\beta$ 1) were quantified by V-plex assays (MSD) according to the manufacturer's protocols.

### **Statistical analysis**

Data are expressed as means with SEM or numbers with frequencies. For the comparison of qualitative values, the parametric chi-square test or Fisher's exact test was used and t-test Student test for the continuous variables. Associations between cytokines were analyzed using Spearman correlation coefficient. Unsupervised hierarchical cluster analysis was performed using IL10, TGF $\beta$ 1 and FOXP3 expression in unstimulated and stimulated state. An index called polyfunctional index was built by combining IL10, TGF $\beta$ 1 and FOXP3 expression in each state (unstimulated or stimulated) using first component of principal components analysis. The assumption of unidimensionality of these three factors was examined based on the eigenvalues plot (**Supplemental Figure 6A**). All tests were two-sided at a 0.05 significance level. Analyses were carried out using R statistical software version 3.1.2.



## Results

### **CLL-B cells show heterogeneous and inducible propensity to express immunoregulatory cytokines.**

We undertook the quantitative and qualitative analysis of CLL-B cells from a cohort of 30 CLL patients displaying variable biological parameters and clinical outcome (**Table 1**). First, purified CLL-B cells were considered for their capacity to express two important immunosuppressive cytokines, IL10 and TGF $\beta$ 1. Flow cytometry analysis of CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cells in culture for 3 days (D3) showed a highly variable proportion of cells expressing IL10 or TGF $\beta$ 1 ranging from 0.11 to 85% and 0 to 71% respectively. Similar IL10<sup>+</sup> and TGF $\beta$ 1<sup>+</sup> subpopulations were evidenced in lymph node punctuate (**Figure 1A-B**). Comparable proportion of IL10<sup>+</sup> cells was assessed at the time of B cells isolation (D0) for several patients indicative of an IL10 constitutive expression (23 $\pm$ 11% at D0 versus 27 $\pm$ 25% at D3) (**Figure 1B**). In contrast, very low levels of TGF $\beta$ 1 expressing cells were observed at isolation time (D0) indicative of a high degree of inducibility in culture (2.8 $\pm$ 4% at D0 versus 22 $\pm$ 4% at D3). In order to estimate the maximum extents of inducibility, engagement of various receptors was applied during the 3 days of culture. For most of the samples, addition of CD40L and anti-IgM followed by Phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin for 4 h before analysis did not modify the proportion of cells expressing IL10 (27 $\pm$ 25% versus 29 $\pm$ 28%), but still allowed a significant increase of TGF $\beta$ 1 expressing cells (22 $\pm$ 4% versus 35 $\pm$ 34%) (**Figure 1A-B**). Examination of individual cases suggested for the latter the presence of two groups: several cases showed further induction of TGF $\beta$ 1 expressing cells upon triggering while others remained with comparable levels (**Figure 1B**). Nonetheless, the median of fluorescence of the cells was not modified upon stimulation and, engagement of IL21R/CD40 instead of BCR/CD40 did not change the proportion of IL10 or TGF $\beta$ 1 producing cells (**sup Figure 1 A-B**).

Quantitation of the cytokines in the supernatant of the CD40L/anti-IgM stimulated cells showed secretion of both IL10 (mean = 0.5pg/ml) and TGF $\beta$ 1 (mean =800 pg/ml). However again, for the latter, two groups were observed with either very low levels secreted as opposed to variable high

amounts of TGF $\beta$ 1, respectively. Moreover, the highest quantities of secreted TGF $\beta$ 1 were correlated to the proportion of expressing cells present (**Figure 1C**).

The capacity of the B-CLL cells to secrete other important immune modulatory cytokines upon stimulation was also evaluated. In several samples, CD40L/anti-IgM stimulation of CLL-B cells increased simultaneously the secretion of TNF $\alpha$ , IL8 and moderately IL6 that were however produced at lower levels than healthy controls (HC). Moreover, for both IL8 and TNF $\alpha$ , two groups of cases were once more observed. In contrast, IL4, IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL2 and IL17 levels were not significantly changed upon triggering and remained equivalent to HC (**Figure 1D, and Sup Figure 2A**). Also, negligible proportions of CLL-B cells in the various samples expressed granzyme B (GrB) that were not significantly enhanced upon triggering as compared to HC (**Sup Figure 2B**). The relative balance of cytokines secreted or not argues for different patterns for IL10 and TGF $\beta$ 1; IL10 corresponding mostly to pro-inflammatory profile while TGF $\beta$ 1 enhance more immune-regulatory mechanisms (**Figure 1E**).

#### **CLL-B cells constitutively express FOXP3.**

Since the pattern of cytokines expressed indicates some similarity between CLL- and regulatory B cells, we assessed whether CLL-B cells could express, like regulatory T cells, the major transcriptional regulator FOXP3. Flow cytometry analysis of viable CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-B cells revealed a rather elevated FOXP3<sup>+</sup> subpopulation present at highly variable extents among patient samples (ranging from 0 to 59,6%, **Figure 2A-B and Sup Figure 3A**). A similar subpopulation was also observed in lymph node punctuate. The subpopulation was not significantly increased upon culture as compared to isolation time. The mean fluorescence intensity of FOXP3 labeling further substantiated its expression in CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> B cells (**Sup Figure 3B**). Furthermore, western blot analysis of CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> sorted cells confirmed the expression of FOXP3 in these cells with a 47KDa protein similar to FOXP3<sup>+</sup> U2OS and FOXP3 transfected cells (**Figure 2C and Sup Figure 3C**). Stimulation for 3 days with either

CD40L/anti-IgM or IL21/anti-IgM did not increase significantly the proportion of the FOXP3<sup>+</sup> subpopulation (**Figure 2A-B and Sup Figure 3D**). Though, a substantial variation of the FOXP3<sup>+</sup> subpopulation was observed in several individual samples upon CD40L/anti-IgM triggering while others remained at comparable proportion (**Figure 2A-B**). Altogether, this analysis demonstrates that CLL-B cells display a constitutive but variable expression of FOXP3.

### **Specific subsets of CLL-B cells express IL-10, TGFβ1 and FOXP3 regulatory factors**

Next, we determined whether a particular CLL-B subtype could account for the expression of IL-10, TGFβ1 and FOXP3. Purified CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> pathological B cells were labeled for phenotypic markers, previously attributed to various regulatory subsets, and their expression was compared between IL-10<sup>+/−</sup>, TGFβ1<sup>+/−</sup> and FOXP3<sup>+/−</sup> B cells. As shown in **Figure 3A**, three phenotypic markers e.g. CD5, CD19 and CD27 presented a significant difference of expression between IL-10<sup>+</sup> and IL10<sup>−</sup> cells. Computation for 16 samples of the differential phenotypic expression indicated comparable results between TGFβ1<sup>+</sup> and TGFβ1<sup>−</sup> cells. These markers confirmed the hallmark of memory CLL-B cells as the IL10 and TGFβ1 producing subset. We also confirmed FOXP3<sup>+</sup> cells as CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> and to a lesser extent CD25<sup>+</sup> cells. Analysis of the differential phenotype upon CD40/BCR triggering confirmed the results obtained with unstimulated cells in spite of a weaker CD5 detection due to its internalization. None of the other phenotypic markers that have been associated to regulatory B cell subsets were found differentially expressed between IL-10<sup>+/−</sup>, TGFβ1<sup>+/−</sup> or FOXP3<sup>+/−</sup> B cells and this hallmark was not influenced by the stimulation (**Figure 3B and supplementary Figure 4**). Indeed, flow cytometry on CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> gated cells revealed a subset of cells co-expressing IL10 and TGFβ1 as well as cells co-expressing IL10 and FoxP3 (**Figure 3C**).

**CD5/CD19 expression levels discriminate an inpatient heterogeneity for regulatory-markers.**

Following the specific signature of the two phenotypic markers CD19 and CD5 for all three regulatory factors IL10, TGFβ1 and FOXP3, two subpopulations of B cells were differentiated based on their CD19 and CD5 expressions at steady state: CD19<sup>high</sup> CD5<sup>high</sup> and CD19<sup>dim</sup> CD5<sup>dim</sup>. Both subsets expressed λ chains as a marker of clonality (**Figure 4A**). Importantly, evaluation of IL10, TGFβ1 and FOXP3 expression showed striking differences for every regulatory factor between the two subpopulations, both in unstimulated or CD40/BCR stimulated cells (**Figure 4B-C**). This analysis defined the CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> subpopulation as the major source of the regulatory factors among CLL B cells and confirmed our initial observation on the overall population. In comparison the CD19<sup>dim</sup> CD5<sup>dim</sup> subset exhibited lower capacity to express IL10, TGFβ1 and FOXP3 and to induce the expression of TGFβ1 (**Figure 4C**). Additionally, the comparison of these populations among the various patients argued for the discrimination of two groups exhibiting or not these differential subsets (**Figure 4C**). Altogether, these results define in CLL a particular subset of CLL-B cells, defined as CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> B cells, that differs from already described regulatory B cells subsets, and shows higher expression of all three regulatory factors IL10, TGFβ1 and FOXP3.

#### **CLL-B cells ensure a regulatory crosstalk with their T cell counterparts**

Next, we examined whether such regulatory networks might influence the balance of immune CLL-B cells counterparts. Purified autologous CD4<sup>+</sup> T cells were cultured for 72 hours separately or altogether with CLL-B cells and their capacity to produce a number of cytokines and regulatory factors were analyzed. The presence of stimulated CLL-B cells diminished the percentage of T CD4<sup>+</sup> cells expressing TNFα or IFNγ with an effect dependent on the T/CLL-B cells ratio present in the coculture (**Figure 5A**). Conversely, coculture between autologous T and CLL-B cells increased the

number of CD4<sup>+</sup> cells expressing FOXP3, arguing for an orientation toward regulatory T cells (**Figure 5B left**). The modulation of FOXP3<sup>+</sup> cells was further substantiated by the estimate of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells, which were significantly enhanced in the presence of CLL-B cells (**Figure 5B right**). Finally, some elevated secretion of IL10 was also observed in the supernatant upon coculture of TCD4<sup>+</sup> with CLL-B cells while a decrease was found for CD4<sup>+</sup>T cells cocultured with healthy control B cells (**Figure 5C**). In contrast, the coculture between T and CLL-B cells did not modify the pattern of secretion of other cytokines including IL1 $\beta$ , IL2, IL4 or IL6, which are indicative of orientation of secretion toward various T cell subpopulations (data not shown).

Furthermore, coculture of CD4<sup>+</sup> T cells with CLL-B cells clearly impacted the proliferation rate of T cells. While several divisions were observed with T cells cultured alone, the presence of CLL-B cells reduced this proliferation rate, dependent on the ratio between B and T cells in the coculture as exemplified in **Figure 5D**. Altogether these results indicate a positive regulatory role of CLL-B cells toward the induction of regulatory T cells and at contrary a negative role toward T helper promotion.

#### **B-CLL expression of IL-10, TGF $\beta$ 1 and FOXP3 correlates with evolutive patients' status.**

Following this characterization of immune regulators, we performed an unsupervised hierarchical cluster analysis of these biomarkers among the various patient samples. First, using the levels of IL10, TGF $\beta$ 1 and FOXP3 expressing cells in unstimulated and stimulated conditions, we confirmed that stimulation did not modify the expression of IL10 and FOXP3 while influencing those of TGF $\beta$ 1 in a number of samples. Next, the hierarchical analysis of the three parameters in both conditions showed a strongly correlated variation for TGF $\beta$ 1 and FOXP3 ( $r=0.8$ ) and to a lesser extent for IL10 ( $r=0.6$ ). Additionally, this cluster analysis allowed discriminating two groups of samples with high

versus low parameters variability. Homogeneity was retrieved among the variables between unstimulated and stimulated conditions with even a larger differentiation of the two major groups for the three parameters upon stimulation (**Figure 6A**). In a statistical analysis, the three factors taken individually did not correlated with known risk factors of progression except for TGFβ1 with the Zap70 kinase expression (**Sup Figure 5**). Using our unidimensional analysis, IL-10, FOXP3 and TGFβ1 expressions were combined in a polyfunctional index, reflecting CLL-B cells capacity to express all 3 immunoregulatory factors. Unidimensionality of polyfunctional index was confirmed with eigenvalues of components 2 and 3 < 1 (**Sup Figure 6A**). Since major differences of the regulatory factors expressions were observed between CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> and CD19<sup>dim</sup>CD5<sup>dim</sup> subpopulations (**Figure 4**), association of both subpopulations with factors of risk of progression was assessed using the polyfunctional index. As shown in **Figure 6B** the score indicated that the CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> subpopulation was correlated to ZAP-70 expression and additionally to IGHV mutational status. Indeed samples where the presence of ZAP-70 was detected had higher values of expression for IL10, TGFβ1 and FOXP3. Likewise, highest association was observed for patient samples with unmutated IGHV clonal expansion. Conversely, Binet staging of the disease, CD38 expression or metabolic activity (MTS  $\geq$ 25%, (39)) of the B-CLL subclone did not correlated with the novel regulatory index (**Figure 6B and data not shown**). For the CD19<sup>dim</sup> CD5<sup>dim</sup> subset as for the global population the correlation was only evidenced with ZAP70 expression (**Sup Figure 6**).

In frame with the strong correlation between markers of an evolutive disease and the identification of a regulatory subpopulation, a two time points analysis was performed for a set of annotated patients to consider the evolution of this subpopulation over a time frame up to two years of follow up. Flow cytometry analysis of the CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> subpopulation clearly differentiated two profiles. In several samples a second population corresponding to an attenuation of CD19 and CD5 expressions (Group 1) appeared while other samples exhibited a remarkably stable CD19<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup> population (Group 2) over a long period of time (1 to two years **Figure 6C**). Moreover, the decrease of CD19 and CD5 expressions in the first group of samples was accompanied by a simultaneous drop of IL10

expression and disappearance of the weak FOXP3 expressing cells to the benefit of the higher expressing ones (group 1). In contrast, the lower levels of expression of the immunoregulatory factors remained equivalent in the group of samples with a stable CD19<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup> subpopulation (group2) (**Figure 6C**). Remarkably, all the patients for whom the CD19<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup> subpopulation remained stable over time presented with an indolent disease (Group 2, **Table 1B**, UPN 4, 13, 14, 30). At the opposite, the capacity to regulate the expression profile of the CD19<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup> subpopulation was characteristic of patients presenting with a progressive disease and need for a therapeutic option (Group 1, **Table 1B**, UPN 2, 8, 22, 25). Altogether the striking correlation between the capacity to detect higher levels of the three immunoregulatory factors in the tumor clone and the progressive profile of the patients argues for the validation of the polyfunctional index as a novel indicator of risk of progression.

## Discussion

Recent advances in understanding the pathophysiology of CLL and related heterogeneity at risk of progression have established the implication of dysregulated immune survey, and the present study reveals important immune modulating functions of a subset of the clonal B-CLL expansion strikingly correlated to disease progression. The analysis of a cohort of more than 30 patients has uncovered the capacity for CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> memory CLL B cells to produce and secrete not only constitutive IL10 but also inducible TGFβ1. An important correlation between the level of expression of the phenotypic markers and the highly heterogeneous production of the cytokines allowed us to define two subpopulations and evolution of these subpopulations is clearly evidenced for patients encountering disease progression. Interestingly, CD19<sup>hi</sup> CD5<sup>hi</sup> CLL-B cells produce also constitutively and highly differentially the transcription factor FOXP3, a hallmark of regulatory T cells. Co-cultures with autologous T cells have proved the functional regulatory implication of CLL-B cells in the induction of regulatory T cells, the negative regulation of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation, altogether with a modulation of their pattern of secretion toward deficiency of tumor clearance. Importantly, computation of the expression of the three regulatory factors in a polyfunctional index argues for the validation of such a score as a predictive marker of disease progression.

Several reports have suggested implication of IL10 producing CLL-B cells in the immune deficit in CD4<sup>+</sup>T cells observed along disease progression (136) (137) (70). The major population characterized in the initial study had phenotypic features resembling those of CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> B10 cells, the human counterpart of murine CD19<sup>hi</sup>CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> B10 cells (70). CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cells formed a relevant subset in the CLL-B cells of our cohort (7±8 % at baseline and 4±8% upon stimulation)(**Sup Figure 7**). However, the proportions of IL-10<sup>+</sup> (20±28% versus 19±27% upon stimulation), TGFβ1<sup>+</sup> (23±28% versus 31±29% upon stimulation) and FOXP3<sup>+</sup> cells (22±35% versus 27±30% upon stimulation) in this subset were not significantly different from those found in CD24<sup>inter</sup>CD27<sup>+</sup> or CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> cells (data not show). Both CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> subsets



were able to produce IL-10 and TGFβ1 cytokines (**Sup Figure 7**). Several other subtypes such as immature CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD147<sup>+</sup>GrB<sup>+</sup> or CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells have also been described as IL10 competent cells (68) (70) (67) (30, 98). The frequency of CD11b<sup>+</sup> and CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> cells among CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-B cells was less than 1% and could not account for the IL-10, TGFβ1 and FOXP3 expressions observed (**Sup Figure 7**). Also GrB<sup>+</sup> cells did not represent significant proportion of CLL-B cells and GrB expression was only slightly induced upon IL21/CD40L triggering as compared to healthy controls. Finally, mechanisms of suppression *via* IL10 production have also been ascribed to mature B cells that do not express characteristic phenotypic markers of CLL-B cells such as plasmablasts or Br1 cells (67). Our results indicate that the major IL10<sup>+</sup>/TGFβ1<sup>+</sup> producing cells are memory CD27<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> that differ from the other described regulatory subtypes with markers such as CD25, CD24 and CD38. CLL-B cells showed also important and differential propensity to induce expression of TGFβ1, an immunoregulatory factor for regulatory T cells induction and CD8<sup>+</sup> T cell anergy, two roles that have been documented in CLL (96). Moreover, TGFβ1 expression, when not already at the highest levels, was induced in a BCR/CD40 dependent manner and we have previously shown that establishment of a threshold response is mandatory for CLL-B cell heterogeneous survival (142). This result places the signal emanating from antigenic stimulation and crosstalk with the surrounding T cells at the center of the mechanisms responsible for a specific cytokine pattern with regulatory properties. In agreement with this central role of the BCR, we observed induction of several other cytokines involved in the remodeling of the immune response in a pathological environment such as IL6, IL8 or TNFα while other cytokines promoting specific Th responses and pro-inflammatory signals were not induced and produced at very low levels such as IL1β, IL2, IL4 or IFNγ. Of note, similar IL10<sup>+</sup> TGFβ1<sup>+</sup> subtype was observed in lymph node punctuates from CLL patients suggesting similar modulatory mechanisms in secondary lymphoid organs.

Interestingly, CLL-B cells and mainly CD19<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup> cells expressed also the transcription factor FOXP3 regardless of stimulation. Given that this factor is a major indicator of Tregs and of their immunomodulatory functions, our results demonstrated that FOXP3 is a novel indicator in CLL-B

cells. A previous report described FOXP3 has present only in pre-apoptotic B cells in healthy controls (106). Therefore, we comforted our finding using different approaches including viability marker in flow cytometry and cell sorting to exclude any apoptotic cells or Tregs contamination that could account for FOXP3 expression. Phenotypically, FOXP3<sup>+</sup> B cells also expressed CD25, another key marker of T regs, which has been observed in IL10<sup>+</sup> Br1 cells with antigen specific suppressive functions (108). Whether some coordinated regulation of CD25 and FOXP3 expressions might occur in B cell subtypes remains to be determined. Also, our results describe another set of important markers shared with T regulators among which are IL10, TGFβ1 and CD5, an essential marker of CLL B cells. Moreover, flow cytometry analysis revealed subpopulations expressing both IL10 and TGFβ1 or IL10 and FOXP3. Indeed, FOXP3 and STAT3 that is constitutively phosphorylated in CLL are interacting partners for the expression of IL10 in a subset of regulatory T cells and a common regulation of the various proteins could be hypothesized (143).

The regulatory function of such CLL-B cells was demonstrated in co-culture experiments with autologous T cells. First, we observed a strong orientation of T cells toward a regulatory profile with the expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FOXP3<sup>+</sup> Tregs and increase of IL10 production by CD4<sup>+</sup> T cells. This orientation might result from secretion of both IL10 and TGFβ1 inducing in turn the expansion and the regulatory functions of Tregs targeting both other non-tumor B cells and helper T cell subtypes. This induction was complemented by a reduction, dependent on the ratio between T and B cells, of two major CD4<sup>+</sup> T cell populations, *e.g.* expressing TNF-α and IFNγ, targets of regulatory B cells and tumor clearance and cytotoxic response (67) (71) (68). Several other cytokines profiles accounting for altered immune tumor suppression were modulated along the co-culture (data not shown). Finally, CLL-B cells hindered or suppress, in a T/B ratio dependent manner, CD4<sup>+</sup> T cells division, a major and initial hallmark of B regs. Importantly, our study highlights the differential evolution of the CD19<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup> subpopulation between patients with indolent *versus* progressive disease. Analysis of this subset and its production of IL10, TGFβ1 and FOXP3 at two dates of follow up clearly showed a marked differential evolution between the two groups of patients. A reasonable

interpretation of this finding is that, the lower levels produced and the absence of induction of regulatory factors in CLL-B cells from patients with indolent disease, do not generate warning signals toward tumor survey. At the opposite, high levels of regulatory factors produced by CLL-B cells of patients with progressive disease provoke exhaustion of several survey mechanisms and tumor escape.

Recent studies have interestingly reported that a combinatorial analysis of various cytokines or factors might be better indicators of a functional subset than those elements taken individually. For instance, the balance between IL10 and TNF $\alpha$  expression in CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> regulatory B cells was better associated with renal allograft rejection than individual evaluation (144). Similarly, a polyfunctionality Index for T cells grouping expression of various cytokines has been shown efficient for an infectious disease response (145). Our analysis proved the benefit of using such a combinatorial index for its possible association with indicators at risk of progression of CLL patients. Individually, the various factors did not correlate or only partly with a number of these indicators. However, computation of the three factors allowed better understanding of CLL-B cell activation and more importantly of the induction of its regulatory functions. When faced to the cohort of patient biological annotations, the polyfunctional index clearly correlated with two major indicators of B cell activation and antigenic recognition, *e.g.* IGHV mutational status and ZAP70 expression; both involved in the regulation of cytokine secretory pattern. Using this score allowed also a strict discrimination of the cases in two groups, with indication during our follow up analysis of a differential progression. The additional information given by the polyfunctional index, with a measure of three different regulatory factors, might become a better orientation indicator of disease progression and lack of tumor clearance.

## **Aknowledgments**

AM was the recipient of a Poste d'accueil INSERM. AQ was the recipient of a Jansen fellowship. This work benefits from the financial support of the Labex INFLAMEX, contract ANR11 IDEX00502 and from the Fondation Laurette Fugain. MM is the recipient of a MRT fellowship. LA was under contract of the Labex INFLAMEX. NA was the recipient of a SNFMI fellowship. We thank the FLAP13 cytometry and cell sorting facilities for assistance in cell sorting and C. Cymbalista for technical help for patient data management.

## Figure legends

### Figure 1 : expression of immune regulatory cytokines

A-B : Analysis of purified CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-B cells from blood or lymph nodes for IL10 and TGFβ1 production by flow cytometry. (A) representative dot plots showing the positive populations , (B) IL10 and TGFβ1 producing cells among the CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cells at the time of isolation (D0, n=3) or after three days of culture (3, n=16) in the presence (+) or not (-) of stimulatory CD40L and anti-IgM. Dotted lines indicate similar patient samples. Means +/- SEM are indicated. \*P<0.01, \*\* p<0.001; *ns*, not significant. C-D Levels of the indicated cytokines secreted in the culture supernatant were evaluated by MSD technology. A correlation diagram between levels of TGFβ1 in the culture supernatant and the percentage of TGFβ1 expressing cells is presented. E Supernatants from B cells culture have been analyzed by MSD technology for indicated cytokines. Correlations between cytokines levels have been analyzed using Spearman correlation test.

### Figure 2 : Expression of FOXP3

A-B : Analysis of purified CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-B cells from blood or lymph nodes for FOXP3 expression by flow cytometry. (A) representative dot plots showing the positive populations, (B) FOXP3 expressing cells among the CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cells at the time of isolation (D0, n=3) or after three days of culture (3, n=16) in the presence (+) or not (-) of stimulatory CD40L and anti-IgM. Dotted lines indicate similar patient samples. Means +/- SEM are indicated. *ns*, not significant. C. Western blot analysis for the expression of FOXP3. U2OS and HEK293T cells transfected with FOXP3 or mock expressing vectors were used as control. CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> patient cells were either purified or sorted as described in Supplementary Figure 3 before western blot analysis with the indicated antibodies. The line indicates that both sides are obtained from the same western blot.

### Figure 3 : Phenotypic Characterization of CLL-B cells.

A-B : Isolated B cells were cultured for 72 hours and stained with the indicated membrane markers, and for IL-10, TGF $\beta$ 1 and FOXP3. Mean fluorescence intensities of CD19, CD5, CD25, CD27 were compared between IL10+ and IL10-, TGF- $\beta$ 1+/- and FOXP3+/- cells in unstimulated condition (A) and stimulated conditions (B). C Representative dot blots of IL-10/TGF $\beta$ 1 and IL-10/FOXP3 coexpression by B cells after 72 hours of culture in stimulated conditions.

#### **Figure 4 : Expression of regulatory factors in CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cells**

A Isolated B cells were stained with CD19, CD5. Representative dot plots of the two subset of B cells considering CD19 and CD5 expression is shown. B cells were stained for  $\kappa$  and  $\lambda$  chains of immunoglobulin. B Isolated B cells cultured for 72 hours, were stained with CD19 and CD5 and for IL10, TGF $\beta$ 1 and FOXP3. Dot plots are representative of IL10, TGF $\beta$ 1 and FOXP3 expression in CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> and CD19<sup>dim</sup>CD5<sup>dim</sup> B cells upon CD40L+anti-IgM stimulation. C : Cumulative results of IL10, TGF $\beta$ 1 and FOXP3 expression in CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> (H) and CD19<sup>dim</sup>CD5<sup>dim</sup> (D) B cells stimulated (+) or not (-), compared with two-tailed t test, \* p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.0001.

#### **Figure 5 : regulatory functions of CLL B cells**

A : Negatively purified TCD4+ and CLL-B cells were cocultured for 48 hours with coated anti-CD3, anti-CD28 or not, B cells were activated with CD40L and anti-IgM. PMA+ionomycin+brefeldin were added in the last 4 hr of culture. Bar graphs show the frequency of TNF $\alpha$ <sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup>T cells after coculture with B cells at various B:T cells ratio as indicated (n=5). The results were compared with ANOVA test analysis,\*p < 0.01; \*\* p<0.001. B : Bar graphs show the frequency of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells upon coculture with B cells (1:1 ratio; n=5) in comparison to T cells culture alone. Cumulative results expressed as mean  $\pm$  SEM. The results were compared with two-tailed t test analysis,\* p< 0.01\*\*\*p < 0.0001. C: Graph indicate the quantities of IL10 present in the coculture supernatants with CD4+ T cells and CLL-B cells or Healthy control B cells. D: Flow cytometry analysis of T cells division cycles using cell trace violet. T cells were in coculture with CLL B cells in the indicated ratio. Plot representative of 4 experiments is depicted.

**Figure 6:** A : Hierarchical cluster analysis of expression of IL-10, TGFβ1 and FOXP3. Cytokine levels are depicted in shades of red (higher) and green (lower). B: Distribution of polyfunctional index according to major risk factors of progression of CLL in the CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> subpopulation. Asterisk indicates significant difference (p<0.05). C Isolated B cells for the same patients at two different times cultured for 72 hours, were stained with CD19 and CD5, then fixed and permeabilized and stained with IL10, TGFβ1, FOXP3

### **Supplementary Figure 1: expression of immune regulatory cytokines**

A Analysis of purified CD19+CD5+ CLL-B cells, stimulated or not, for IL10 and TGFβ1 by flow cytometry. Median of fluorescence is presented. *ns*, not significant. B. IL10 and TGFβ1 production was evaluated after stimulation by CD40L/IL21 as compared to CD40L/ anti-IgM. Ratio between cytokines producing cells in the two conditions is indicated.

### **Supplementary Figure 2 : expression of cytokines**

A: Analysis of purified CD19+CD5+ CLL-B cells, stimulated or not using CD40L and anti-IgM ; the levels of the indicated cytokines secreted in the culture supernatant were evaluated by MSD technology. B. Purified CD19+CD5+ CLL-B cells or healthy control B cells stimulated or not as indicated were analyzed by flow cytometry for granzyme B (GrB) production (Top) representative dot plots showing the positive populations , (Bottom) GrB producing cells among the CD19+CD5+ cells are presented. Means +/- SEM are indicated. P\* < 0.01, \*\* p < 0.001.

### **Supplementary Figure 3 : expression of FOXP3**

A : Gating strategy with a viability marker excluding apoptotic cells B: Analysis of purified CD19+CD5+ CLL-B cells, stimulated or not using CD40L and anti-IgM ; Median of fluorescence are presented. *ns*, not significant. C: Gating strategy during cell sorting showing that the sorted cells were CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>

CD27<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup>. D : FOXP3 expression was evaluated after stimulation by CD40L/IL21 as compared to CD40L/ anti-IgM. Ratio between FOXP3 expressing cells in the two conditions is indicated.

#### **Supplementary Figure 4 : Phenotypic Characterization of CLL-B cells.**

Isolated B cells were cultured for 72 hours and stained with the indicated membrane markers, and for IL-10, TGFβ1 and FOXP3. Mean fluorescence intensities of CD24, CD25, CD27 and CD38 were compared between IL10<sup>+</sup> and IL10<sup>-</sup>, TGF-β1<sup>+/-</sup> and FOXP3<sup>+/-</sup> cells in unstimulated condition (A) and stimulated conditions (B) by two-tailed t test. *ns*, not significant.

#### **Supplementary Figure 5 : Correlation between regulatory factors expression and clinical annotation**

Purified B cells were cultured for 72 hours with CD40L and anti-IgM. PMA+ionomycin+brefeldin were added in the last 4 hrs of culture.

Cells were stained for CD5, CD19, IL-10, TGFβ1 and FOXP3 expression. The frequencies of IL10<sup>+</sup> cells (A), TGFβ1<sup>+</sup> cells (B) and FOXP3<sup>+</sup> cells (C) were compared according to IGVH status (unmutated, UM or mutated, M IGVH and ZAP70 expression (positive or negative ZAP70 cells) by two-tailed t test, \**p* < 0.05.

#### **Supplementary Figure 6:**

**A : Scree plot showing eigenvalues for components with a reference line at eigenvalue of 1.**

B-C : Distribution of polyfunctional index according to major risk factors of progression of CLL in the CD19<sup>dim</sup>CD5<sup>dim</sup> and the global populations. Asterisk indicates significant difference (*p*<0.05)

#### **Supplementary Figure 7 : Correlation between regulatory factors expression and clinical annotation**

Purified B cells were culture for 72 hours with CD40L and anti-IgM. PMA+ionomycin+brefeldin were added in the last 4 hrs of culture. Cells were stained with CD5, CD19, CD24, CD38 and CD27 and CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> and CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> cells frequencies were compared by t test. Expression of IL10 and



TGF  $\beta$ 1 by CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> and CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> cells (stimulated condition). Means +/- SEM are indicated.

**Table 1. CLL Patients characteristics.**

**A Patients characteristics at the CLL diagnosis.**

<b>Characteristics</b>	<b>N=30</b>
<b>Age (years)</b>	62±10
<b>Sexe (female/male ratio)</b>	10/20
<b>Binet at diagnosis / at experiment</b>	
<b>A</b>	26 (87%) / 19 (66%)
<b>B</b>	3 (10%) / 5 (17%)
<b>C</b>	1 (3%) / 5 (17%)
<b>ZAP70 (+)</b>	9/20 (45%)
<b>IGHV mutated</b>	14/28 (50%)
<b>CD38 (+)</b>	12/25 (48%)
<b>β2microglobuline (mg/l)</b>	2.6±1.2
<b>MTS at diagnosis / at experiments (%)</b>	41±48% / 39±47
<b>Progressive disease</b>	12/30 (40%)
<b>Time to progression (years)</b>	3.8±5

**B UPN CLL patients' characteristics.**

Patients	Age (years)	Sexe	Binet stage	Lymphocytes (n/mm3)	ZAP 70 expression	IGVH status	CD38 expression	$\beta$ 2M (mg/l)	MTS (%)
1	60	F	A	19000		M	-	2.06	
2	72	F	A	31000		M	-	2.49	34.33
3	68	F	A	9000	+	UM	+	1.87	8.89
4	78	F	A	10450	-	UM		2.70	34.83
5	45	M	A	57250		M	+	2.38	33.3
6	48	M	C	57000		M	+	2.76	234.59
7	59	M	A	13000			-	1.10	7.24
8	70	F	A	13880	+	M		2.72	45.55
9	71	F	A	56430	-	UM	-		32.9
10	64	M	A	14000	-	UM		3.13	
11	49	M	A	11940	+	M	+	2.40	9.87
12	66	M	B	90950	-	UM	+	4.00	97.34
13	55	M	A	5830		M	+	2.31	73.27
14	56	F	A	36620	-	UM	+	2.00	25.38
15	59	F	A	11310	-	M	-	2.00	20.4
16	48	M	A	11000	+	UM	-	1.29	45.67
17	74	F	A	13000	+	M	+	3.47	5.89
18	61	M	A	28350	+	M	+	5	14.94
19	58	M	A	25000		M	+	7.00	69.11

20	56	M	A	139970	-		-	3.31	17.76
21	75	M	A	9250	-	UM		2.25	
22	53	M	A	12000	+	UM	-	1.76	4.3
23	63	M	A	14900	+	M	+	3.66	74.69
24	85	F	A	8000	-	UM	-		
25	53	M	A	21000		UM		3.00	7.22
26	55	M	A	41500	-	UM	-	1.54	62.51
27	49	M	B	39930	+	M	-	2.00	42.47
28	64	M	A	4000	-	UM	-	2.13	
29	65	M	B	24980		M	+	2.02	14.25
30	62	M	A	8580		UM	-	1.8	17.12

UM : unmutatated IGVH status ; M : mutated IGVH status; F: female; M: male.

## References

1. Fabbri, G., and Dalla-Favera, R. (2016) The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **16**, 145-162
2. Jitschin, R., Braun, M., Buttner, M., Dettmer-Wilde, K., Bricks, J., Berger, J., Eckart, M. J., Krause, S. W., Oefner, P. J., Le Blanc, K., Mackensen, A., and Mougiakakos, D. (2014) CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood* **124**, 750-760
3. Rosser, E. C., and Mauri, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* **42**, 607-612
4. Blair, P. A., Norena, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., and Mauri, C. (2010) CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* **32**, 129-140
5. Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M., Szabolcs, P. M., Bernstein, S. H., Magro, C. M., Williams, A. D., Hall, R. P., St Clair, E. W., and Tedder, T. F. (2011) Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **117**, 530-541
6. Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S. L., Sakaguchi, S., Takeda, K., Kurosaki, T., and Baba, Y. (2014) Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* **41**, 1040-1051
7. Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T. F., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., Lunov, O., Nienhaus, G. U., Simmet, T., Kreienberg, R., Moller, P., Schrezenmeier, H., and Jahrsdorfer, B. (2013) Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res* **73**, 2468-2479
8. Hagn, M., Blackwell, S. E., Beyer, T., Ebel, V., Fabricius, D., Lindner, S., Stilgenbauer, S., Simmet, T., Tam, C., Neeson, P., Trapani, J. A., Schrezenmeier, H., Weiner, G. J., and Jahrsdorfer, B. (2014) B-CLL cells acquire APC- and CTL-like phenotypic characteristics after stimulation with CpG ODN and IL-21. *Int Immunol* **26**, 383-395

9. Nouel, A., Pochard, P., Simon, Q., Segalen, I., Le Meur, Y., Pers, J. O., and Hillion, S. (2015) B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun* **59**, 53-60
10. Drennan, S., D'Avola, A., Gao, Y., Weigel, C., Chrysostomou, E., Steele, A. J., Zenz, T., Plass, C., Johnson, P. W., Williams, A. P., Packham, G., Stevenson, F. K., Oakes, C. C., and Forconi, F. (2016) IL-10 production by CLL cells is enhanced in the anergic IGHV mutated subset and associates with reduced DNA methylation of the IL10 locus. *Leukemia*
11. Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., Hillmen, P., Keating, M. J., Montserrat, E., Rai, K. R., and Kipps, T. J. (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* **111**, 5446-5456
12. Le Roy, C., Deglesne, P. A., Chevallier, N., Beitar, T., Eclache, V., Quettier, M., Boubaya, M., Letestu, R., Levy, V., Ajchenbaum-Cymbalista, F., and Varin-Blank, N. (2015) The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356-365
13. DiLillo, D. J., Weinberg, J. B., Yoshizaki, A., Horikawa, M., Bryant, J. M., Iwata, Y., Matsushita, T., Matta, K. M., Chen, Y., Venturi, G. M., Russo, G., Gockerman, J. P., Moore, J. O., Diehl, L. F., Volkheimer, A. D., Friedman, D. R., Lanasa, M. C., Hall, R. P., and Tedder, T. F. (2013) Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia* **27**, 170-182
14. Griffin, D. O., Holodick, N. E., and Rothstein, T. L. (2011) Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med* **208**, 67-80
15. Parekh, V. V., Prasad, D. V., Banerjee, P. P., Joshi, B. N., Kumar, A., and Mishra, G. C. (2003) B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol* **170**, 5897-5911
16. Le Roy, C., Deglesne, P. A., Chevallier, N., Beitar, T., Eclache, V., Quettier, M., Boubaya, M., Letestu, R., Levy, V., Ajchenbaum-Cymbalista, F., and Varin-Blank, N. (2012) The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356-365

17. Noh, J., Choi, W. S., Noh, G., and Lee, J. H. (2010) Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune Netw* **10**, 247-249
18. Vadasz, Z., Peri, R., Eiza, N., Slobodin, G., Balbir-Gurman, A., and Toubi, E. (2015) The Expansion of CD25(high)IL-10(high)FoxP3(high) B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *J Immunol Res* **2015**, 254245
19. Hossain, D. M., Panda, A. K., Manna, A., Mohanty, S., Bhattacharjee, P., Bhattacharyya, S., Saha, T., Chakraborty, S., Kar, R. K., Das, T., Chatterjee, S., and Sa, G. (2013) FoxP3 acts as a cotranscription factor with STAT3 in tumor-induced regulatory T cells. *Immunity* **39**, 1057-1069
20. Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2011) Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* **36**, 228-238
21. Cherukuri, A., Rothstein, D. M., Clark, B., Carter, C. R., Davison, A., Hernandez-Fuentes, M., Hewitt, E., Salama, A. D., and Baker, R. J. (2014) Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF-alpha expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol* **25**, 1575-1585
22. Larsen, M., Arnaud, L., Hie, M., Parizot, C., Dorgham, K., Shoukry, M., Kemula, M., Barete, S., Derai, D., Sauce, D., Amoura, Z., Pene, J., Yssel, H., and Gorochoy, G. (2011) Multiparameter grouping delineates heterogeneous populations of human IL-17 and/or IL-22 T-cell producers that share antigen specificities with other T-cell subsets. *Eur J Immunol* **41**, 2596-2605

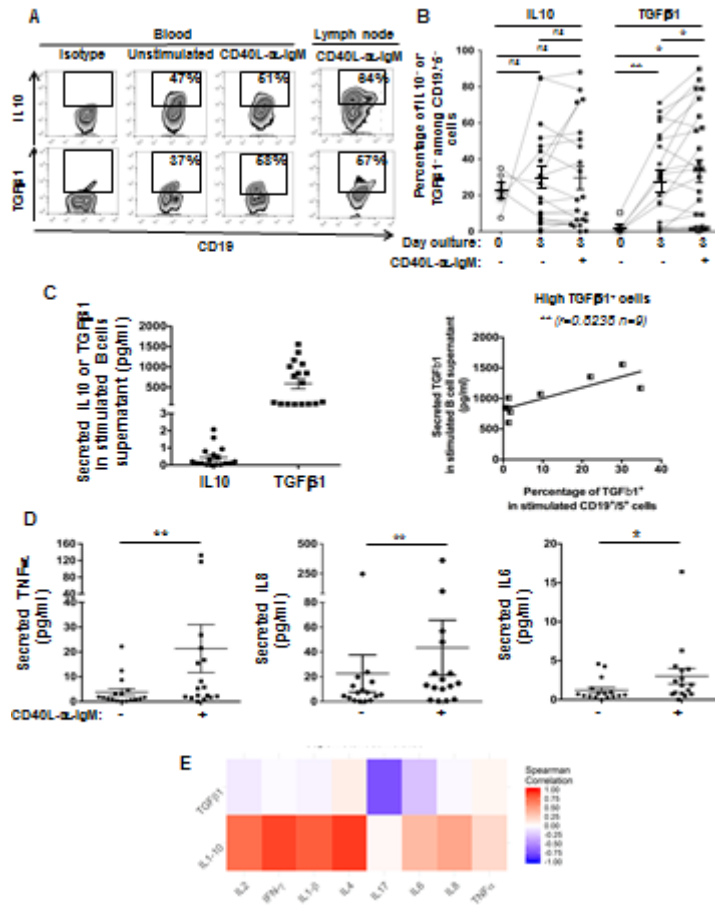


Figure 1



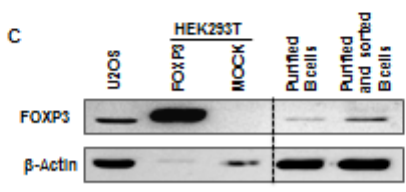
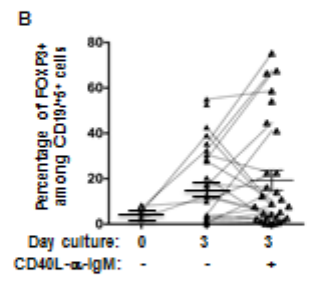
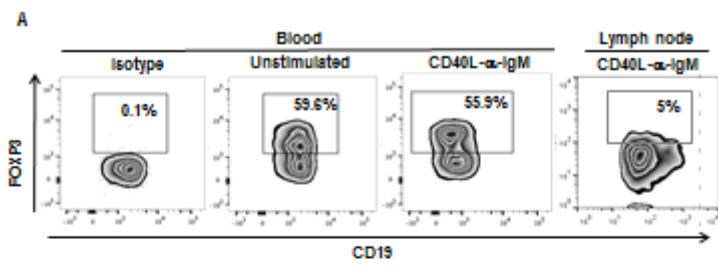


Figure 2

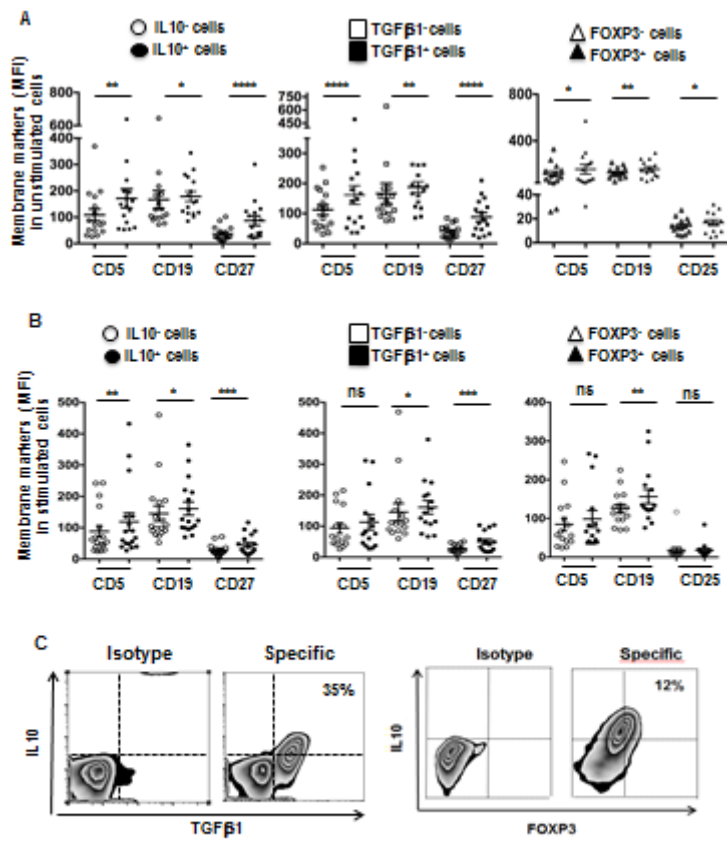


Figure 3

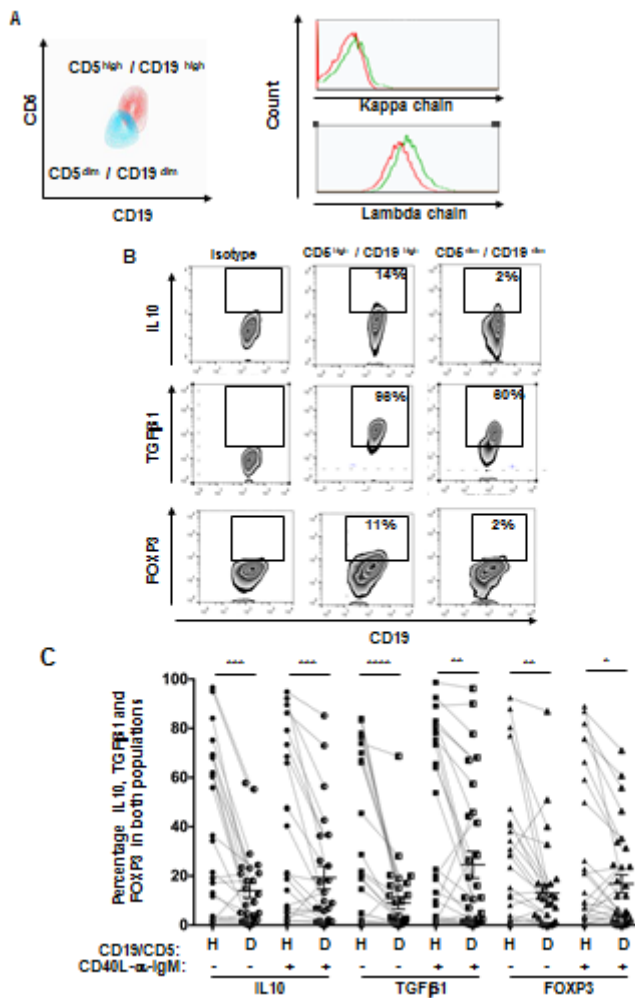


Figure 4

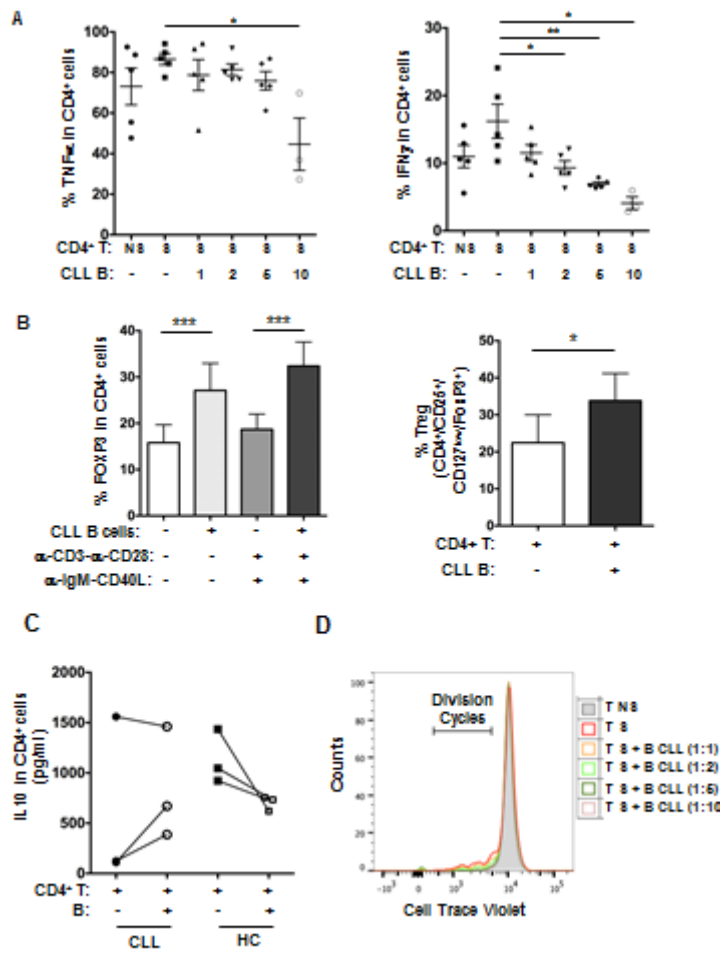


Figure 5

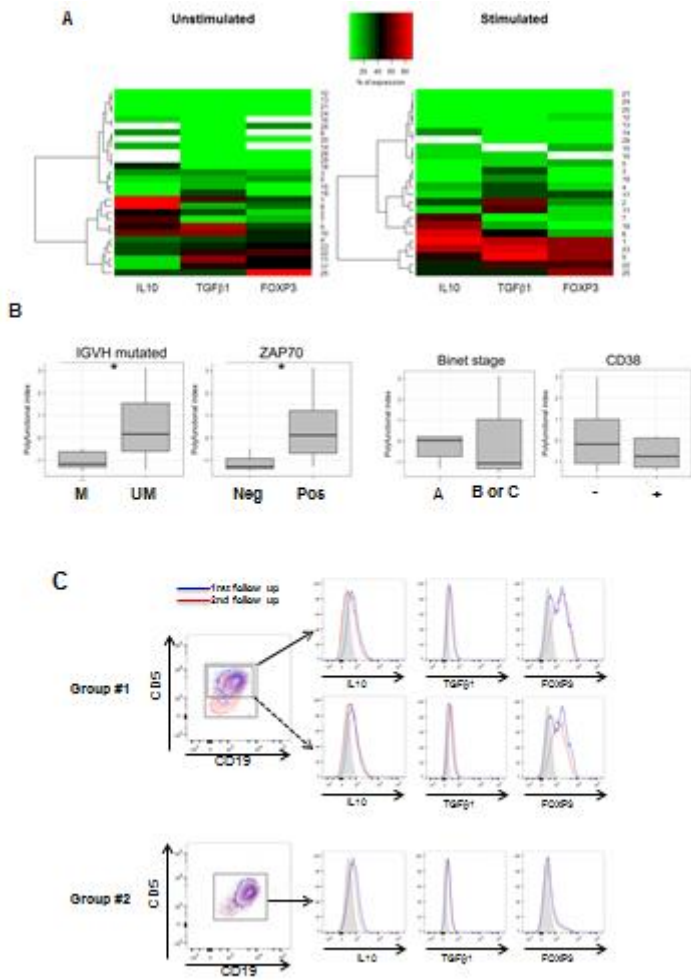
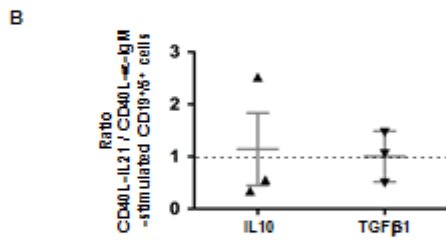
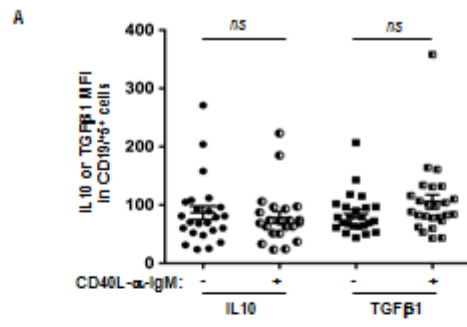
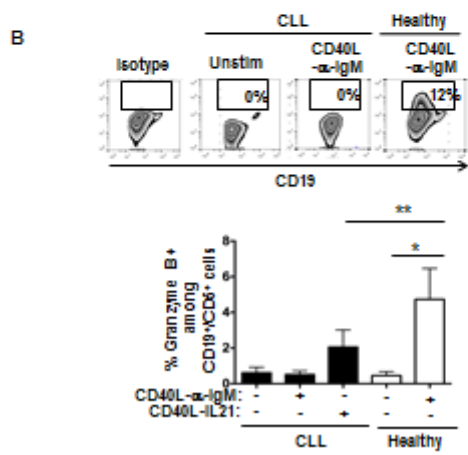
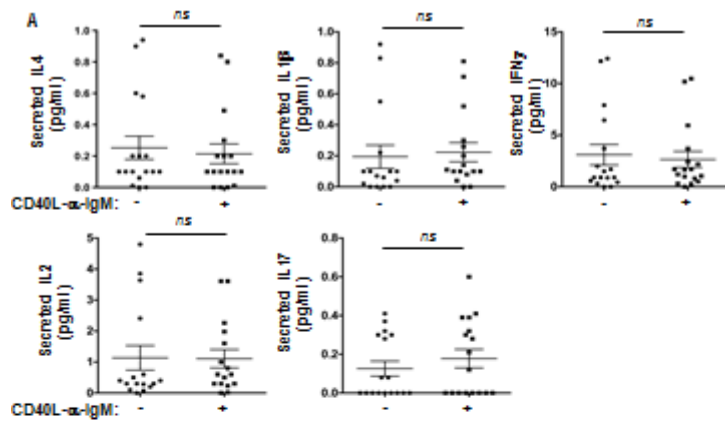


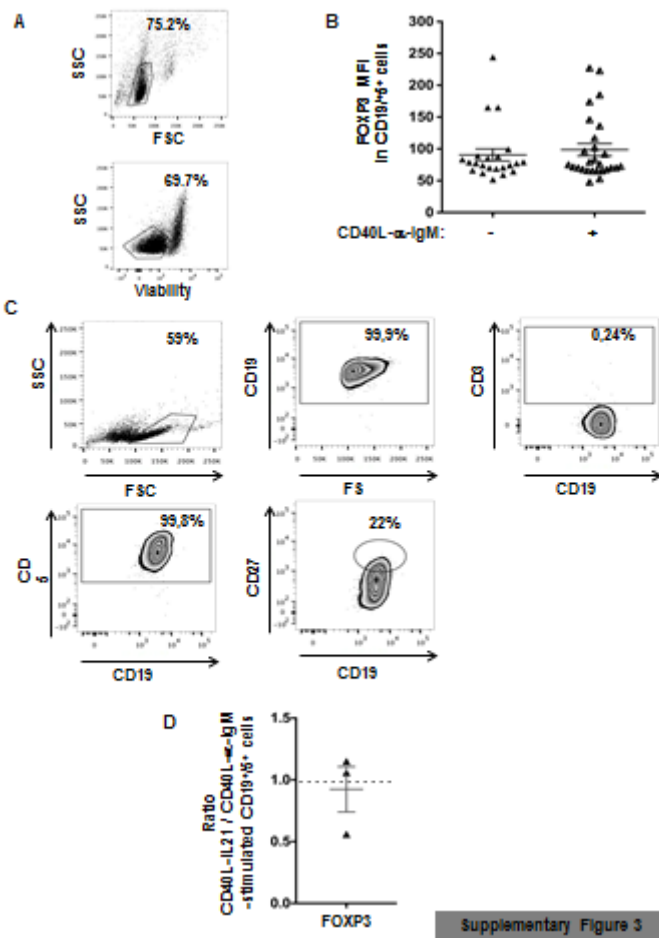
Figure 6



Supplementary Figure 1

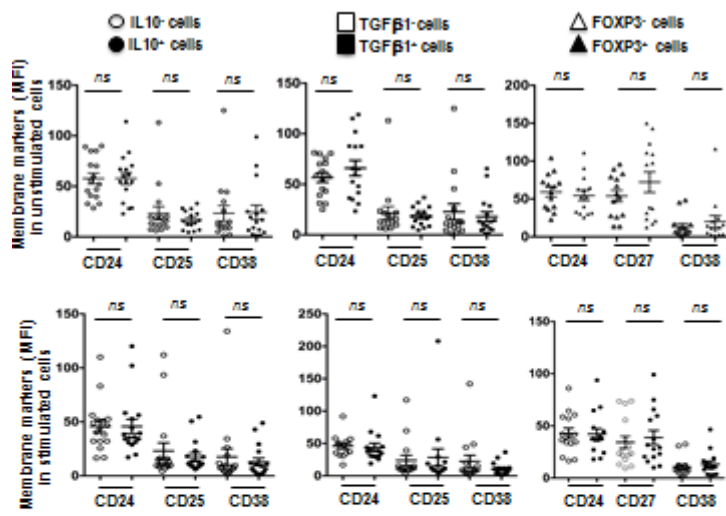


Supplementary Figure 2

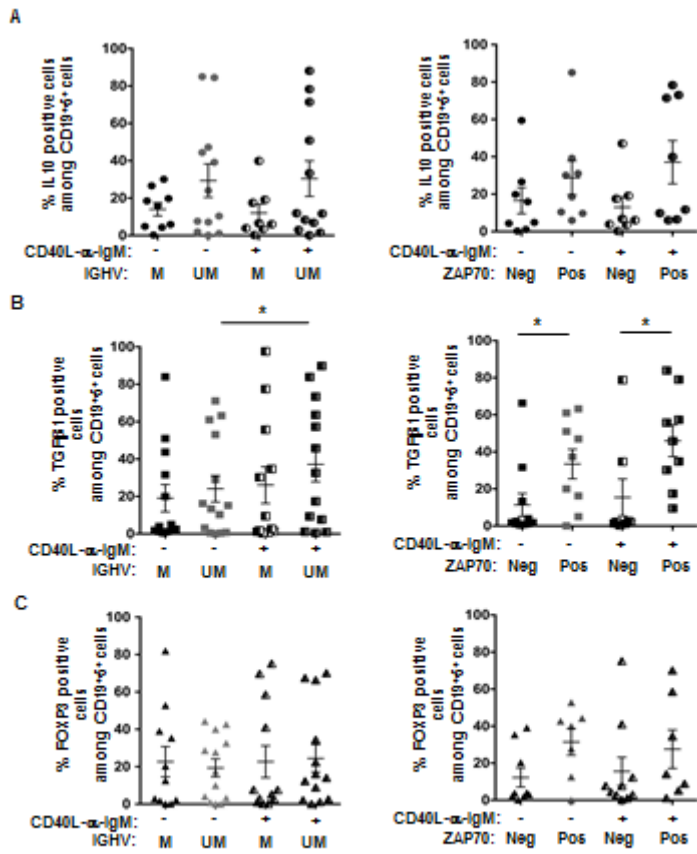


Supplementary Figure 3

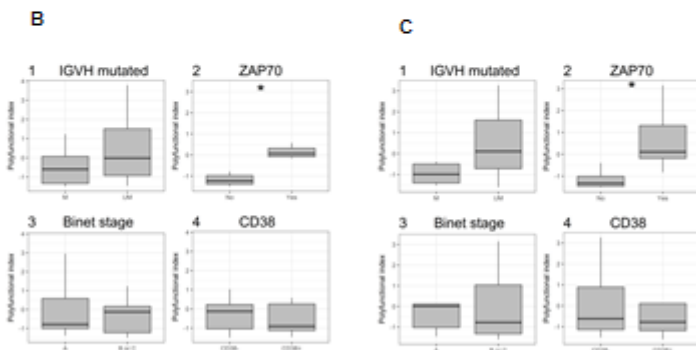
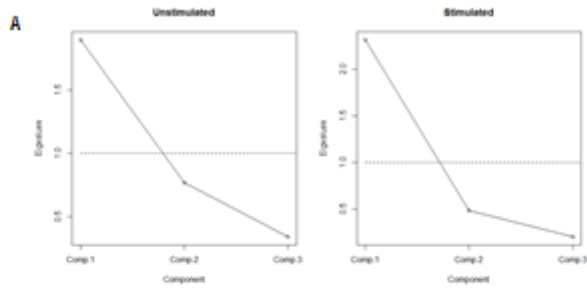




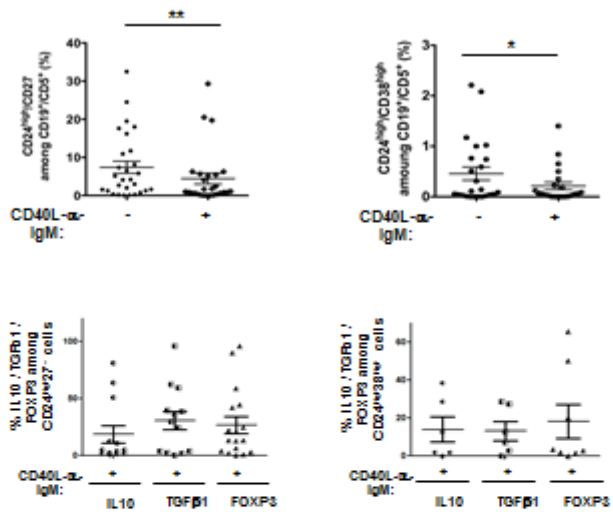
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



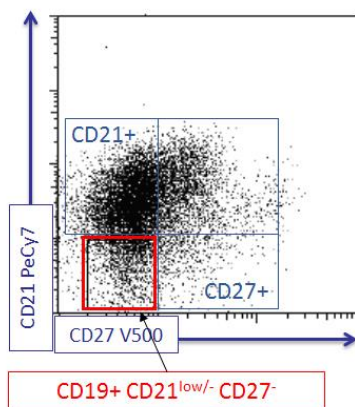
Supplementary Figure 7

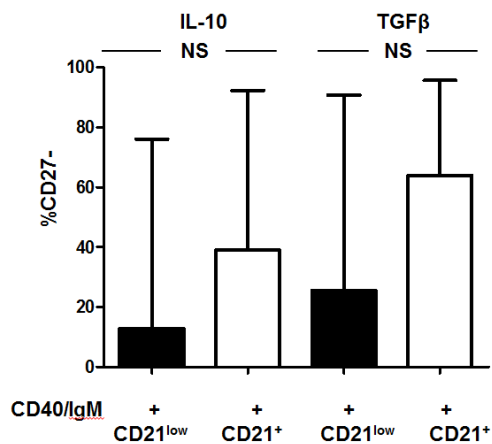
## RESULTATS COMPLEMENTAIRES :

### I. Lymphocytes B autoréactifs dans la LLC.

Au cours de mon travail de thèse, nous avons également analysé la fréquence et la capacité de sécrétion de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ 1 par la sous-population des lymphocytes B auto-réactifs. Bien que s'agissant d'une population peu étudiée, plusieurs auteurs ont défini une sous-population B CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>low</sup> qui est capable de produire des auto-anticorps et qui est enrichie en lymphocytes clonaux. Du fait de l'existence non négligeable de manifestations auto-immunes au cours de la LLC, en particulier de cytopénies auto-immunes, nous avons analysé la fréquence et la capacité de sécrétion de différents facteurs régulateurs dans cette sous-population. La population B auto-réactive ainsi définie a été analysée chez 5 patients atteints de LLC. La fréquence moyenne de la sous-population après 3 jours de culture était de 22,4 % (12-24) en absence de stimulation et diminuait à 14% (12-22) en réponse à une stimulation par le CD40L associée à l'anti-IgM suivi d'un traitement par le PIB. Malgré une possible diminution de la capacité des lymphocytes CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>low</sup> à sécréter de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ 1 par rapport aux lymphocytes B CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>, le faible nombre d'échantillons analysés n'a pas permis de montrer une différence statistique (**Figure 23**). La population auto-réactive est cependant différente de celle principalement productrice des facteurs régulateurs IL-10 et TGF- $\beta$ 1, puisqu'elle n'exprime pas le marqueur CD27 des cellules mémoires.

**Figure 23.** Stratégie d'analyse par cytométrie en flux des lymphocytes B CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>low</sup> et B CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>





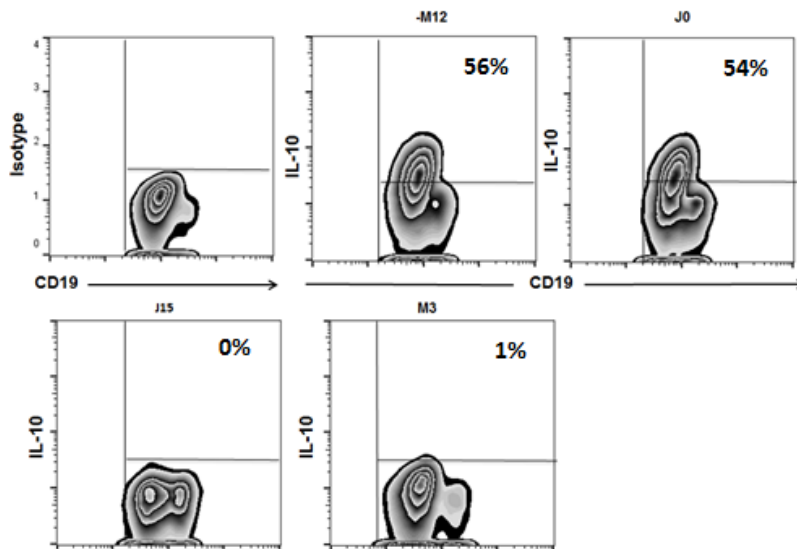
Analyse comparative des sécrétions de l'IL-10 et du TGF-β1 dans les deux populations (n=5). Le pourcentage de cellules exprimant l'IL10 ou le TGF-β1 est analysé au sein de la population CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>.

## II. Evolution des populations lymphocytaires B et de la sécrétion de l'IL-10 et du TGF-β1 ainsi que de l'expression de FOXP-3 chez des patients soumis à un traitement par l'ibrutinib (inhibiteur de la kinase Btk).

Nous avons analysé au cours du traitement d'un patient atteint de LLC par l'ibrutinib, l'effet de l'inhibiteur sur les fréquences des sous-populations caractérisées précédemment et sur leur capacité de production des facteurs immunorégulateurs. Les lymphocytes B ont été purifiés à partir de prélèvements effectués soit 12 mois avant traitement, au jour précédent le traitement, puis à 2 semaines ou à 3 mois après le début du traitement par l'ibrutinib. L'expression intracellulaire de l'IL-10, du TGF-β1 et de FOXP-3 a été analysée en absence ou après stimulation par du CD40L associée à de l'anti-IgM suivie d'un traitement par le PIB. Une diminution importante de la sécrétion de tous les facteurs régulateurs a été constatée dès la 2<sup>e</sup> semaine de traitement par l'ibrutinib, persistante à 3 mois pour l'IL-10 et le TGF-β1, alors qu'une expression de FOXP-3 était de nouveau observée à 3 mois (**Figure 24**).

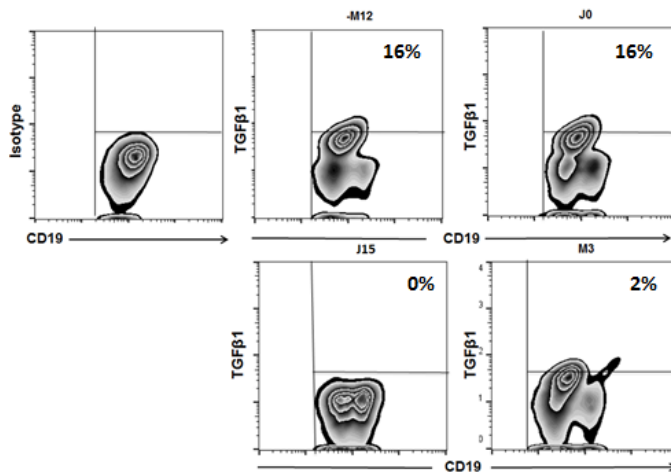
**Figure 24.** Evolution de la production de l'IL-10, du TGF- $\beta$ 1 et de FOXP3 dans des cellules de LLC chez les patients en cours de traitement par l'ibrutinib.

A. Secrétion de l'IL-10



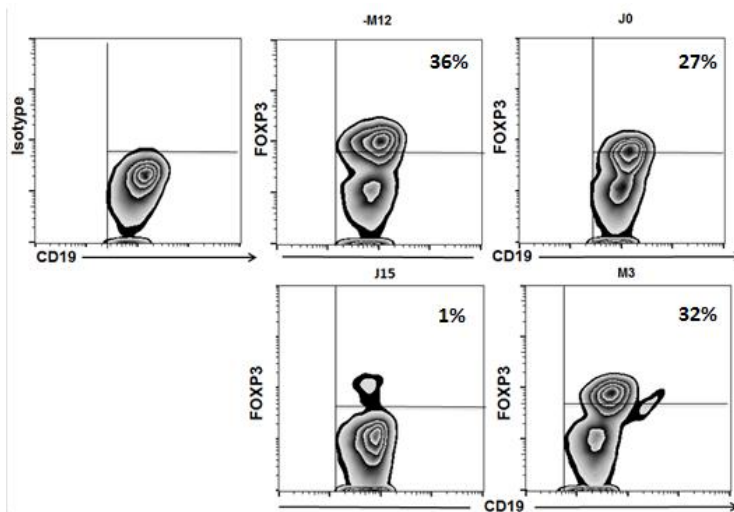
Diminution de la production d'IL-10 par les B-LLC stimulés dès la 2<sup>e</sup> semaine de traitement par l'ibrutinib et persistante à 3 mois.

B. Secrétion du TGF- $\beta$ 1



Diminution de la production de TGF- $\beta$ 1 par les B-LLC dès la 2<sup>e</sup> semaine de traitement par l'ibrutinib et persistante à 3 mois.

### C. Expression du facteur FOXP-3



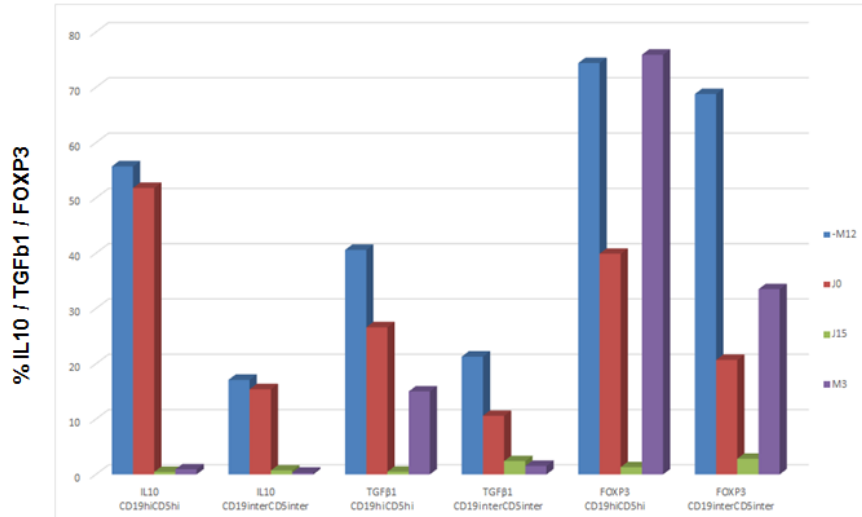
Diminution de l'expression de FOXP3 par les B-LLC dès la 2<sup>e</sup> semaine de traitement par l'ibrutinib et une réapparition de son expression à partir du 3<sup>e</sup> mois.

Les variations de production des facteurs immunorégulateurs ont également été observées dans les sous-populations exprimant majoritairement ces facteurs. Les deux sous-populations  $CD19^{high}CD5^{high}$  et  $CD19^{interm}CD5^{interm}$  ont montré une diminution similaire de l'expression de tous les facteurs immunorégulateurs après deux semaines de traitement du patient. En revanche, une forte réexpression de FOXP3 est observée trois mois après le début du traitement, notamment dans la sous-population exprimant le plus les facteurs immunorégulateurs ; une possible réexpression du TGF- $\beta$ 1 est également observée (**Figure 25**).

Ces résultats prometteurs font actuellement l'objet d'un projet de thèse de l'Unité qui permettra de déterminer l'impact du traitement par l'ibrutinib des patients LLC sur les sous-populations régulatrices.



**Figure 25.** Evolution de la sécrétion de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ 1, ainsi que l'expression de FOXP3, au cours du traitement des patients LLC par l'ibrutinib : comparaison des sous-populations CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> et CD19<sup>interm</sup>CD5<sup>interm</sup>.





### 1. L'expression des facteurs immunorégulateurs par les lymphocytes B-LLC

Les lymphocytes B régulateurs et les lymphocytes B-LLC partagent des caractéristiques phénotypiques communes, plusieurs fois relevées dans la littérature, raison pour laquelle la question de la capacité immunorégulatrice des lymphocytes B-LLC a été plus récemment envisagée. L'objectif de mon doctorat a été de caractériser et d'évaluer la capacité régulatrice des lymphocytes B-LLC qui permettrait à ces cellules de moduler la surveillance anti-tumorale du système immunitaire et de favoriser leur prolifération. Pour cela, j'ai tout d'abord analysé la capacité des lymphocytes B-LLC à exprimer certains facteurs immunorégulateurs, tels l'IL-10, le TGF- $\beta$ 1, le facteur FOXP-3 ou le Granzyme B ; ces facteurs ayant été décrits dans différentes populations lymphocytaires dotées de propriétés immunorégulatrices. Nos résultats démontrent cette capacité des cellules tumorales de LLC à exprimer certains de ces facteurs immunorégulateurs, dont l'IL-10, le TGF- $\beta$ 1 et le FOXP-3, tout en démontrant un défaut d'expression du Granzyme B. Alors que l'expression de l'IL-10 est constitutive car ses taux sont similaires dans des lymphocytes B-LLC stimulés ou non, nous avons observé une induction de l'expression du TGF- $\beta$ 1 après stimulation des lymphocytes leucémiques par le BCR et le CD40. Ces résultats démontrent ainsi que les lymphocytes B-LLC présentent des caractéristiques fonctionnelles de lymphocytes B régulateurs, principalement définis dans la littérature par leur capacité à exprimer l'IL-10. Nos résultats corroborent les données de l'étude de DiLillo et al, ayant analysé pour la première fois la capacité des lymphocytes B-LLC à exprimer l'IL-10 à des niveaux variables, avec jusqu'à plus de 86% des cellules exprimant la cytokine, et ce de façon significativement plus importante en comparaison à des témoins sains (136). Chez des patients présentant une LLC, des taux sériques plus importants d'IL-10 ont été associés avec l'expression du CD38, de ZAP-70 et l'absence de mutations somatiques (128), ainsi qu'avec une diminution de la survie globale des patients (127, 128). Ainsi, l'expression de l'IL-10 pourrait jouer un rôle clé dans l'augmentation de la survie de la cellule B-LLC, mais également dans l'inhibition des réponses anti-tumorales.

Les lymphocytes B régulateurs sont principalement caractérisés par l'expression de l'IL-10, mais une expression du TGF- $\beta$ 1 par ces lymphocytes a été également mise en évidence dans certaines pathologies. L'immunorégulation par le biais de TGF- $\beta$ 1 comporte l'induction des lymphocytes T régulateurs, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques et

de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (95). Au cours de la LLC, les lymphocytes B expriment le TGF- $\beta$ 1. Nos résultats montrant une expression en cytométrie en flux du TGF- $\beta$ 1 sont concordants avec les données antérieures montrant à la fois une augmentation de la cytokine dans le sérum et des ARNm à l'état basal et une augmentation de l'expression après stimulation du BCR (146) (147). Le TGF- $\beta$ 1 inhibe habituellement la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, et des données discordantes ont été montrées au cours de la LLC. Lotz *et al.*, montrent une capacité inchangée du TGF- $\beta$ 1 à inhiber la prolifération des lymphocytes B-LLC, suggérant l'existence d'un mécanisme autocrine participant au faible taux de prolifération de certaines LLC. Néanmoins cette inhibition reste variable parmi les patients étudiés. D'autres équipes, en revanche, mettent en évidence une résistance à cet effet du TGF- $\beta$ 1 au cours de la LLC (148). En effet, en présence de TGF- $\beta$ 1, les B-LLC avaient dans cette étude une apoptose diminuée par comparaison aux témoins, mais qui pouvait être en partie expliquée par une diminution de l'expression du récepteur au TGF- $\beta$ 1 (148) (149). Quelle pourrait-elle ainsi la signification de cette augmentation de l'expression de TGF- $\beta$ 1 par les lymphocytes B-LLC, puisqu'il semble que les cellules échappent à l'action autocrine habituelle du contrôle de la survie cellulaire par cette cytokine? Dans notre étude, nous montrons que les B-LLC ont la capacité d'induire l'augmentation de lymphocytes T régulateurs et l'expression de FOXP3 par ces lymphocytes T ; le TGF- $\beta$ 1 produit par les B-LLC pourrait ainsi jouer un rôle dans l'induction de la conversion des T effecteurs vers cette sous-population suppressive, à l'image du rôle du TGF- $\beta$ 1 secrété par les T régulateurs ou décrit dans certains modèles murins d'allergie avec des cellules B CD5<sup>+</sup> (150). Le TGF- $\beta$ 1 a également été montré impliqué dans la suppression des cellules T cytotoxiques et dans la diminution de la présentation antigénique, deux mécanismes qui pourraient aussi participer à l'augmentation de la population tumorale dans la LLC et sont en accord avec les défauts de toxicité décrits pour les cellules CD8<sup>+</sup> dans la pathologie (96).

La capacité des lymphocytes B régulateurs à exprimer FOXP-3, un facteur de transcription caractéristique des lymphocytes T régulateurs, a été récemment montrée sur des populations lymphocytaires de sujets sains exprimant le CD5 (106, 107). Dans notre étude nous mettons en évidence pour la première fois la capacité des lymphocytes B-LLC à exprimer FOXP-3, de manière constitutive et hétérogène là encore entre les différents patients. L'expression de FOXP3 pourrait jouer un rôle similaire à celui observé dans les lymphocytes T, et permettre une régulation de l'induction de la tolérance des différentes cellules immunitaires, bien que nous n'ayons pas analysé dans ce travail les mécanismes impliqués et démontré son rôle fonctionnel possible sur la tolérance.

Une équipe a montré au cours de l'infection par le VIH que les lymphocytes B CD5<sup>+</sup> avaient une expression augmentée de Granzyme B, mais pas de l'IL-10. Ces lymphocytes avaient également une capacité immunorégulatrice avec une inhibition de la prolifération des lymphocytes T pouvant constituer un autre mécanisme immunorégulateur (87). Des études antérieures à la nôtre avaient montré la capacité des B-LLC à exprimer le Granzyme B après stimulation par l'IL-21, pouvant induire la mort cellulaire et l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (99, 100). Nous avons également analysé l'expression du Granzyme B par les B-LLC. Nos résultats montrent une expression faible de cette protéine par les lymphocytes B-LLC que ce soit en conditions basales ou stimulées suite à l'engagement du BCR et du CD40. En revanche, l'engagement des récepteurs à l'IL-21 et du CD40L des cellules B de LLC entraîne une induction modérée du Granzyme B par comparaison aux cellules B de témoins, concordant avec les données de Hagn *et al.*, (151) (99). Ce très faible niveau d'expression, voire indétectable chez certains patients, pourrait indiquer qu'en présence de stimulation du BCR et du CD40, les B-LLC acquièrent des fonctions régulatrices, plutôt que la capacité d'induction des mécanismes d'apoptose ou encore d'effets cytotoxiques.

Nos résultats montrent, à la fois, une expression constitutive de ces facteurs immunorégulateurs, et une capacité d'induction plus importante de l'expression du TGF- $\beta$ 1 après une stimulation avec un anti-IgM et du CD40L. Nos données montrent également l'hétérogénéité importante de l'expression de ces facteurs entre les différents patients. Ces résultats sont concordants avec ceux habituellement rapportés au cours de la LLC et déjà décrits par l'équipe, avec une surexpression basale de certains facteurs et de molécules effectrices de signalisation. En effet, les niveaux de Syk, NFAT et STAT3 et leurs taux de phosphorylation, sont plus importants chez les patients présentant une LLC par rapport aux témoins, bien que leur expressions restent très hétérogènes parmi les différents types de LLC (152) (39).

En ce qui concerne les lymphocytes B régulateurs, l'existence d'une sous-population B avec des capacités régulatrices mais aussi, l'induction des capacités régulatrices de sous-populations de lymphocytes B dans un contexte de stimulation particulière, font encore débat. Différents modèles de stimulation ont montré des phénotypes différents de lymphocytes B capables de sécréter l'IL-10. Du fait de l'importance de la stimulation de la voie du BCR dans la LLC, nous avons utilisé la co-stimulation anti-IgM/CD40L. Il est à noter que nos résultats suggèrent une capacité d'expression des facteurs immunorégulateurs similaire lors des stimulations par anti-IgM/CD40L et IL-21/CD40L ; cette dernière co-stimulation étant aussi

importante pour ces inductions (64). Récemment, il a été montré que la co-stimulation par le BAFF en combinaison avec le CPG dans un modèle murin de lymphocytes B-LLC et chez certains patients permettait également d'induire l'expression de l'IL-10 de façon significativement plus importante en comparaison avec des témoins sains (135). D'autres voies de stimulation sont possibles pour induire l'expression de l'IL-10 au cours de la LLC, telles que celle de BAFF seul par le biais de BAFF-R ou celle de l'IL-35 ou encore par les CPG et les récepteurs TLR (135 {Drennan, 2016 #448}).

Au cours de la LLC, les modifications de signaux effecteurs et de l'expression de chimiokines rendent compte de la rétention ganglionnaire des lymphocytes B-LLC clonaux et de leur prolifération au sein des organes lymphoïdes secondaires. Du fait de la difficulté d'obtenir des prélèvements de ganglions de patients LLC, le profil d'expression des facteurs immunorégulateurs au sein des ganglions pathologiques n'a pu être effectué que chez quelques patients. L'analyse de la capacité d'expression de ces facteurs par les lymphocytes B-LLC ganglionnaires a montré des résultats similaires à ceux observés pour les lymphocytes B circulants.

La population B-LLC exprimant ces différents facteurs d'immunorégulation correspond bien à la population clonale LLC, caractérisée par l'expression majoritaire d'une des chaînes kappa ou lambda. En effet, le rôle éventuel de la capacité immunomodulatrice au cours de la LLC pourrait être très différent, selon que l'on considère l'expression des facteurs immunomodulateurs par la cellule B clonale ou par la population restante de B normaux (non tumoraux) et non clonaux. Telle qu'habituellement décrite au cours de maladies auto-immunes et chez les personnes saines, les populations B régulatrices semblent jouer un rôle d'induction de la tolérance et d'inhibition de la cytotoxicité, en particulier pour éviter l'émergence de maladies auto-immunes au cours desquelles cette population semble déficitaire ou moins fonctionnelle. De façon très différente, l'expression de facteurs immunorégulateurs par la cellule clonale suggère un rôle prépondérant pour favoriser l'effet anti-tumoral et de survie, en induisant une tolérance des cellules immunitaires vis à vis de la cellule leucémique.

Nous avons analysé l'expression de plusieurs facteurs immunorégulateurs, et non pas seulement un facteur prépondérant habituellement étudié telle que l'IL-10. Récemment, plusieurs équipes ont utilisé un indice polyfonctionnel, afin de rendre compte de la capacité d'une sous-population cellulaire à exprimer plusieurs cytokines ou divers facteurs et ceci de manière hétérogène (153). Ainsi, en considérant l'expression des cytokines de lymphocytes T, dont les niveaux d'expression peuvent être variables selon le contexte et le type de stimulation

considérés, les auteurs ont montré qu'un indice regroupant cette variabilité pourrait être plus adapté en reflétant une capacité d'expression d'un ensemble de cytokines par un type de cellules. Afin d'exprimer la variabilité de l'expression des différents facteurs immunorégulateurs par les cellules B-LLC, nous avons utilisé un indice regroupant les niveaux d'expression des cytokines IL-10 et TGF- $\beta$ 1 et le facteur FOXP-3. Nos résultats montrent un profil d'expression des facteurs immunorégulateurs regroupés dans l'indice polyfonctionnel qui corrèle avec les marqueurs LLC de mauvais pronostic, tels que l'expression de ZAP-70 ou le profil IGVH non-muté. Bien que l'expression de l'IL-10 n'ait pas été corrélée à elle seule aux marqueurs pronostiques, et les autres facteurs immunorégulateurs n'ayant pas été étudiés, il semblerait que les taux d'IL-10 secrétés soient plus importants en cas de LLC progressive (135). Cependant, une nouvelle étude récente indiquerait que les taux les plus hauts d'IL10 secrétée soient retrouvés dans les cellules présentant une mutation des gènes d'immunoglobulines (137) laissant donc ouverte la signification de l'analyse unique de l'IL10 dans ces cellules. Aucune corrélation de l'expression de l'IL-10 avec d'autres marqueurs pronostiques n'a été mise en évidence dans ces études (136) ou de façon similaire, lorsque l'IL-10 a été analysée isolément dans notre travail, mettant en évidence l'intérêt de mesurer la capacité d'expression de plusieurs facteurs regroupés à l'aide d'un indice composite. A l'image des marqueurs pronostiques tels que le statut IGVH ou l'expression de ZAP-70, la capacité d'expression des facteurs immunorégulateurs pourrait être un marqueur du caractère d'évolutivité de la LLC sous-jacente, rendant compte de la possibilité par ces cellules de moduler l'environnement immunitaire et de favoriser leur propre capacité de prolifération et ainsi de déterminer un profil progressif de la maladie.

## 2. Phénotype des lymphocytes B-LLC exprimant les facteurs immunorégulateurs

Après avoir démontré la capacité des B-LLC à exprimer divers facteurs immunorégulateurs, mon objectif a été de déterminer le phénotype des cellules exprimant ces facteurs. Nous avons utilisé plusieurs approches afin de déterminer un phénotype de B-LLC avec une expression augmentée des facteurs immunorégulateurs:

- d'une part, en analysant l'expression des facteurs immunorégulateurs dans les sous-populations précédemment décrites comme à l'origine d'une surexpression d'IL-10 (les lymphocytes B régulateurs, tels que les CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> ou CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>);
- en comparant l'expression des différents marqueurs membranaires des cellules exprimant ou non chacun des facteurs étudiés IL-10, TGF-β1 et FOXP-3;
- enfin, en analysant l'expression des facteurs immunorégulateurs par les sous-populations définies selon le niveau d'expression du CD5 et CD19.

Les phénotypes des lymphocytes B régulateurs restent controversés, plus particulièrement chez l'homme, et plusieurs sous-populations avec des phénotypes différents sont capables d'exprimer l'IL-10. Parmi les différents phénotypes, les plus étudiés sont les lymphocytes B CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> et CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>. Bien que nous ayons trouvé ces sous-populations également présentes au cours de la LLC, la capacité d'expression de l'IL-10 et de TGF-1 était montrée pour les deux populations, avec une capacité similaire en comparaison aux CD24<sup>inter</sup>. De même, l'expression du CD11b, également décrite dans les populations IL10+ était faible dans les B-LLC, ne pouvant rendre compte de la capacité importante d'expression d'IL-10 observée pour ces cellules. Nous avons donc, par la suite, comparé l'expression des différents marqueurs membranaires par les lymphocytes B LLC selon l'expression d'IL-10, de TGF-β1 et de FOXP-3. De manière similaire, les cellules positives pour l'expression de ces facteurs avaient des niveaux d'expression membranaire du CD5, CD19 et CD27 significativement différents de celles ne les exprimant pas, en dehors du CD25 pour le FOXP3. Du fait de l'importance des marqueurs CD5 et CD19 au cours de la LLC, nous avons choisi par la suite d'analyser les sous-populations définies à l'aide de ces 2 marqueurs. La comparaison des sous-populations B CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> et CD19<sup>interm</sup>CD5<sup>interm</sup> a confirmé ces données, montrant une expression très différente d'IL-10, de TGF-β1 et de FOXP-3 par ces deux sous-populations clonales de LLC. L'expression d'IL-10, de TGF-β1 et de FOXP-3 par la sous-population CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> était proche de celle de la population lymphocytaire B totale, rendant compte de l'expression de ces facteurs majoritairement par cette sous-population. L'expression du CD5 a déjà été associée dans d'autres travaux avec celle de l'IL-10, à la fois



chez des sujets sains et dans les B-LLC, en accord avec les données trouvées dans notre analyse. La surexpression d'IL-10 dans les cellules CD5<sup>+</sup> apparaît être en lien avec une hyper-phosphorylation des protéines STAT3, dont la surexpression a été également montrée au cours de la LLC (131). En effet, cette hyper-phosphorylation est favorisée par l'expression membranaire du CD5 et la réduction d'expression de CD5 par siRNA est associée avec une diminution de l'IL-10 produite et de la phosphorylation des protéines STAT (131).

La corrélation entre la capacité d'expression des différents facteurs immunorégulateurs par les deux sous-populations et les marqueurs pronostiques de la LLC a permis de montrer que l'expression des facteurs par les CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup> était non seulement associée à la présence de ZAP-70 mais aussi au statut mutationnel IGVH défavorable, renforçant avec notre indice polyfonctionnel ce qui avait été trouvé suite à l'analyse de la population B-LLC totale.

Une autre stratégie récemment mise au point pour déterminer le phénotype des sous-populations exprimant l'IL-10 consiste à isoler les cellules IL-10 (+) de celles IL-10 (-) et ensuite de comparer l'expression de leurs marqueurs membranaires (74). Ainsi, les lymphocytes CD25<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> ont été décrits comme la principale sous-population exprimant l'IL-10 (+), chez des témoins sains ou après stimulation par le CPG. Cette population correspondait également à la principale population capable d'inhiber les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, bien que de manière partiellement indépendante de l'IL-10. Cette stratégie intéressante, en particulier pour l'analyse de l'expression d'une cytokine spécifique, ne rend pas compte de l'expression de plusieurs facteurs ; cependant, il serait intéressant de confirmer avec cette stratégie la sous-population prédominante de notre étude comme étant CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup>.

Récemment, l'analyse par séquençage de l'exome entier a mis en évidence l'apparition de nouvelles mutations en cas de rechute ou de maladie progressive, montrant l'importance de l'évolution clonale dans la progression de la LLC (11) (154, 155). Ainsi, l'existence d'une hétérogénéité sous-clonale au cours de la LLC et l'émergence de certains sous-clones au profit d'autres chez le même patient, seraient particulièrement intéressantes à corréler à ces capacités d'immunorégulation et au profil d'expression membranaire de CD19 et CD5, tels que nous l'avons analysé dans ce travail. La différence d'évolution du profil d'expression CD19 et CD5 au cours du temps et leur capacité à exprimer les facteurs régulateurs pourrait présager d'une capacité d'évolution clonale au cours de certaines LLC.

Comme précédemment souligné dans notre étude, les sous-populations exprimant les facteurs immunorégulateurs avaient les caractéristiques des cellules B-LLC clonales. Du fait de l'importance des niveaux d'expression de ces facteurs par les B-LLC, l'existence et le rôle de

lymphocytes B non-clonaux aux capacités immunorégulatrices ne peuvent pas être formellement exclus ; leur analyse est rendue difficile du fait de la faible représentation des lymphocytes B normaux et des taux de cytokines exprimées. En particulier, en extrapolant ce qui est observé dans les maladies auto-immunes, une diminution de ces sous-populations B non-clonales et/ou de leur niveaux d'expression de facteurs régulateurs pourrait être observée au cours de la LLC en particulier en présence de cytopénies auto-immunes. Cependant, ce phénomène reste difficile à mettre en évidence dans le contexte de la sécrétion plus importante de ces facteurs par les B LLC.

### 3. Interaction des lymphocytes B LLC avec des lymphocytes T autologues

En dehors de leur capacité à sécréter de l'IL-10, les lymphocytes B régulateurs sont essentiellement définis par leur capacité à dialoguer avec les lymphocytes T, en inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et en induisant la production de lymphocytes T régulateurs. Après avoir démontré la capacité des lymphocytes B-LLC à exprimer les facteurs immunorégulateurs, nous avons analysé leur effet sur les lymphocytes T autologues en termes de capacité de sécrétion de différentes cytokines et d'expression de FOXP-3. En accord avec les données de la littérature rapportées sur les lymphocytes B régulateurs non-clonaux, nous avons constaté une modification d'expression du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T LLC en co-culture avec les B-LLC. Cet effet a été vu en fonction du rapport quantitatif entre les cellules B et T présentes en co-culture, ce qui renforce la notion importante du rôle de l'accumulation leucémique dans l'altération des différentes populations immunitaires au cours de la progression de la maladie. Par ailleurs, en présence de B-LLC, le pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD27<sup>low</sup> régulateurs exprimant FOXP-3 a été significativement augmenté, suggérant la capacité des B-LLC à induire la population T régulatrice, à l'image encore une fois de ce qui a été décrit pour les lymphocytes B régulateurs non-clonaux. De manière intéressante, la population qui exprime à un plus fort niveau des marqueurs CD19 et CD5, CD19<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup>, et qui exprime majoritairement les facteurs immunorégulateurs, avait également une capacité plus importante à induire des lymphocytes T régulateurs, confirmant qu'il s'agit d'une population aux capacités immunorégulatrices.

Afin de confirmer la capacité des B-LLC à induire des lymphocytes T régulateurs fonctionnels, il serait nécessaire de compléter notre travail par des expériences démontrant la capacité suppressive de ces lymphocytes T régulateurs induits. D'autre part, nous n'avons pas analysé dans cette étude les mécanismes d'induction de ces T régulateurs, en particulier l'effet dépendant des cytokines IL-10 et /ou TGF-  $\beta$ 1.

La capacité de l'interaction des lymphocytes B-LLC avec le microenvironnement et la modification des cellules non-clonales pour favoriser leur migration, leur prolifération et la survie sont des mécanismes rendant compte des formes prolifératives de la maladie. L'existence d'une sous-population de lymphocytes B-LLC, avec des capacités d'immunorégulation, permettant la surexpression de facteurs d'immunorégulation et l'induction de sous-populations T régulatrices, pourrait constituer une autre facette de l'interaction des B-LLC avec le microenvironnement. Peu de données sont actuellement

disponibles sur l'interaction des lymphocytes T régulateurs avec les B-LLC. En présence d'IL-10 sécrétée par les CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> dans la souris EμTCL-1, l'expression de FOXP-3 par les lymphocytes T régulateurs est augmentée, avec en même temps, une augmentation de leur capacité suppressive, suggérant une régulation de son expression concomitante à celle de l'IL-10 (135). Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purifiés en co-culture avec des B-LLC ont une capacité conservée et similaire à celles de témoins sains à réduire la prolifération des lymphocytes B (125). Des lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> non autologues auraient une capacité à supprimer la prolifération et la survie des lymphocytes B de différents lymphomes dont la LLC, avec néanmoins une capacité suppressive hétérogène en particulier chez les patients avec une LLC (156). Nous avons analysé l'interaction des lymphocytes B-LLC avec des T CD4<sup>+</sup> autologues en montrant la capacité des B-LLC à induire l'expression de lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FOXP-3<sup>+</sup>. La capacité de suppression de ces lymphocytes T régulateurs induits par les B-LLC pourrait être différente de celle des T régulateurs polyclonaux. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour montrer une capacité réduite par ces T régulateurs des B-LLC dans l'inhibition de prolifération et de survie tout en maintenant un potentiel suppressif sur les T cytotoxiques antitumoraux, participant ainsi à l'échappement des B-LLC de la réponse anti-tumorale. Par ailleurs, l'analyse du profil de sécrétion de cytokines par les lymphocytes B-LLC après stimulation a montré un profil particulier, avec une induction des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8, mais pas celles de l'IFN $\gamma$ , l'IL2, l'IL-4 et l'IL-1 $\beta$ . Certaines de ces cytokines jouent un rôle important dans la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, comme l'IL-4 et l'IL-6 dans la différenciation respective des Th1 ou Th17 (149). La capacité des lymphocytes B-LLC à sécréter sélectivement certaines cytokines pourrait ainsi être un autre élément participant dans la capacité de ces cellules de moduler leur environnement. Là encore des analyses avec l'utilisation de différents modèles d'inactivation seront nécessaires à la démonstration de ce rôle.

---

## 5 CONCLUSIONS

---

Ce travail avait pour objectif d'analyser les capacités d'immunorégulation des lymphocytes B-LLC.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression des facteurs immunorégulateurs, tels que l'IL-10, le TGF- $\beta$ 1, le Granzyme B et le facteur FOXP-3, par les lymphocytes B clonaux. Nos données ont montré une grande capacité à exprimer de l'IL-10, du TGF- $\beta$ 1 et du FOXP-3 et une plus faible capacité dans l'expression du Granzyme B. Plusieurs voies de stimulation, telles que celle du BCR et du CD40, mais aussi de l'IL-21, pourraient induire l'expression de ces facteurs par les B-LLC.

Nous avons par la suite analysé le phénotype des B-LLC qui sont capables d'exprimer les facteurs d'immunorégulation IL-10, TGF- $\beta$ 1 et FOXP-3. En utilisant les marqueurs membranaires des lymphocytes B régulateurs habituellement décrits et ceux des marqueurs définis dans la LLC, l'expression du CD19 et CD5 s'est montrée particulièrement discriminante pour caractériser une sous-population dotée d'une capacité d'expression des facteurs IL-10, TGF- $\beta$ 1 et FOXP-3.

L'analyse de l'interaction des lymphocytes B-LLC avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a montré la capacité des lymphocytes B à induire l'expression de lymphocytes T régulateurs FOXP-3<sup>+</sup> mais également à avoir un impact sur l'expression des facteurs TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ . La sous-population ayant une forte capacité d'expression des facteurs d'immunorégulation semble avoir également la capacité de modulation des lymphocytes T régulateurs la plus importante.

L'index polyfonctionnel récapitulant l'expression des différents facteurs immunorégulateurs rend compte de l'hétérogénéité d'évolution des patients et pourrait intégrer un score prédictif de progression. Par ailleurs, l'importance de l'IL-10, à la fois pour les lymphocytes B-LLC et les lymphocytes T de l'environnement, soulève la question de l'importance de développement de thérapies telles que celles des CAR T cells, avec un ciblage spécifique des lymphocytes B-LLC par les cellules T autologues. Les données préliminaires de l'effet de l'ibrutinib sur la capacité de sécrétion des facteurs immunorégulateurs ouvrent une autre perspective sur les cibles thérapeutiques utilisées dans la LLC ; l'inhibition de la capacité immunorégulatrice des lymphocytes B-LLC pouvant permettre d'empêcher la progression de la maladie.



---

## 6 BIBLIOGRAPHIE

---

1. Chiorazzi, N., Rai, K. R., and Ferrarini, M. (2005) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **352**, 804-815
2. Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T. S., Wright, G., Davis, R. E., Henrickson, S. E., Zhao, H., Ibbotson, R. E., Orchard, J. A., Davis, Z., Stetler-Stevenson, M., Raffeld, M., Arthur, D. C., Marti, G. E., Wilson, W. H., Hamblin, T. J., Oscier, D. G., and Staudt, L. M. (2003) ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* **101**, 4944-4951
3. Morabito, F., Cutrona, G., Gentile, M., Fabris, S., Matis, S., Vigna, E., Todoerti, K., Colombo, M., Recchia, A. G., Bossio, S., De Stefano, L., Ilariucci, F., Cortelezzi, A., Consoli, U., Vincelli, I., Pesce, E. A., Musolino, C., Molica, S., Di Raimondo, F., Neri, A., and Ferrarini, M. (2015) Is ZAP70 still a key prognostic factor in early stage chronic lymphocytic leukaemia? Results of the analysis from a prospective multicentre observational study. *Br J Haematol* **168**, 455-459
4. Zilber, M. T., Gregory, S., Mallone, R., Deaglio, S., Malavasi, F., Charron, D., and Gelin, C. (2000) CD38 expressed on human monocytes: a coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2840-2845
5. Hamblin, T. J., Orchard, J. A., Gardiner, A., Oscier, D. G., Davis, Z., and Stevenson, F. K. (2000) Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* **95**, 2455-2457
6. Hamblin, T. J., Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Thomas, P. W., Stevenson, F. K., and Oscier, D. G. (2002) CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* **99**, 1023-1029
7. Krober, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Bruckle, E., Lichter, P., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2002) V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 1410-1416
8. Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **343**, 1910-1916
9. Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Bruscaggin, A., Monti, S., Ciardullo, C., Deambrogi, C., Khiabani, H., Serra, R., Bertoni, F., Forconi, F., Laurenti, L., Marasca, R., Dal-Bo, M., Rossi, F. M., Bulian, P., Nomdedeu, J., Del Poeta, G., Gattei, V., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Foa, R., Dalla-Favera, R., and Gaidano, G. (2013) Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 1403-1412
10. Rossi, D., Spina, V., Bomben, R., Rasi, S., Dal-Bo, M., Bruscaggin, A., Rossi, F. M., Monti, S., Degan, M., Ciardullo, C., Serra, R., Zucchetto, A., Nomdedeu, J., Bulian, P., Grossi, A., Zaja, F., Pozzato, G., Laurenti, L., Efremov, D. G., Di-Raimondo, F., Marasca, R., Forconi, F., Del Poeta, G., Gaidano, G., and Gattei, V. (2013) Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 4902-4905
11. Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Bottcher, S., Carter, S. L., Cibulskis, K., Mertens, D., Sougnez, C. L., Rosenberg, M., Hess, J. M., Edelman, J., Kless, S., Kneba, M., Ritgen, M., Fink, A., Fischer, K., Gabriel, S., Lander, E. S., Nowak, M. A., Dohner, H., Hallek, M., Neuberg, D., Getz, G., Stilgenbauer, S., and Wu, C. J. (2015) Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **526**, 525-530
12. Bo, M. D., Del Principe, M. I., Pozzo, F., Ragusa, D., Bulian, P., Rossi, D., Capelli, G., Rossi, F. M., Niscola, P., Buccisano, F., Bomben, R., Zucchetto, A., Maurillo, L., de Fabritiis, P., Amadori, S., Gaidano, G., Gattei, V., and Del Poeta, G. (2014) NOTCH1 mutations identify a chronic

- lymphocytic leukemia patient subset with worse prognosis in the setting of a rituximab-based induction and consolidation treatment. *Ann Hematol* **93**, 1765-1774
13. Guieze, R., Robbe, P., Clifford, R., de Guibert, S., Pereira, B., Timbs, A., Dilhuydy, M. S., Cabes, M., Ysebaert, L., Burns, A., Nguyen-Khac, F., Davi, F., Veronese, L., Combes, P., Le Garff-Tavernier, M., Leblond, V., Merle-Beral, H., Alsolami, R., Hamblin, A., Mason, J., Pettitt, A., Hillmen, P., Taylor, J., Knight, S. J., Tournilhac, O., and Schuh, A. (2015) Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood*. 2015 Oct 29;126(18):2110-7. doi: 10.1182/blood-2015-05-647578. Epub 2015 Aug 27.
  14. Hallek, M., Wanders, L., Ostwald, M., Busch, R., Senekowitsch, R., Stern, S., Schick, H. D., Kuhn-Hallek, I., and Emmerich, B. (1996) Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* **22**, 439-447
  15. Montillo, M., Hamblin, T., Hallek, M., Montserrat, E., and Morra, E. (2005) Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* **90**, 391-399
  16. Keating, M. J. (1998) Chronic lymphocytic leukemia in the next decade: where do we go from here? *Semin Hematol* **35**, 27-33
  17. Molica, S. (1991) Progression and survival studies in early chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **78**, 895-899
  18. Pepper, C., Majid, A., Lin, T. T., Hewamana, S., Pratt, G., Walewska, R., Gesk, S., Siebert, R., Wagner, S., Kennedy, B., Miall, F., Davis, Z. A., Tracy, I., Gardiner, A. C., Brennan, P., Hills, R. K., Dyer, M. J., Oscier, D., and Fegan, C. (2012) Defining the prognosis of early stage chronic lymphocytic leukaemia patients. *Br J Haematol* **156**, 499-507
  19. Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M., and Buske, C. (2015) Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **26 Suppl 5**, v78-84
  20. Woyach, J. A., and Johnson, A. J. (2015) Targeted therapies in CLL: mechanisms of resistance and strategies for management. *Blood* **126**, 471-477
  21. Byrd, J. C., Furman, R. R., Coutre, S. E., Flinn, I. W., Burger, J. A., Blum, K. A., Grant, B., Sharman, J. P., Coleman, M., Wierda, W. G., Jones, J. A., Zhao, W., Heerema, N. A., Johnson, A. J., Sukbuntherng, J., Chang, B. Y., Clow, F., Hedrick, E., Buggy, J. J., James, D. F., and O'Brien, S. (2013) Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **369**, 32-42
  22. Brown, J. R., Barrientos, J. C., Barr, P. M., Flinn, I. W., Burger, J. A., Tran, A., Clow, F., James, D. F., Graef, T., Friedberg, J. W., Rai, K., and O'Brien, S. (2015) The Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib with chemoimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **125**, 2915-2922
  23. Brown, J. R., O'Brien, S., Kingsley, C. D., Eradat, H., Pagel, J. M., Lymp, J., Hirata, J., and Kipps, T. J. (2015) Obinutuzumab plus fludarabine/cyclophosphamide or bendamustine in the initial therapy of CLL patients: the phase 1b GALTON trial. *Blood* **125**, 2779-2785
  24. Jaglowski, S. M., Jones, J. A., Nagar, V., Flynn, J. M., Andritsos, L. A., Maddocks, K. J., Woyach, J. A., Blum, K. A., Grever, M. R., Smucker, K., Ruppert, A. S., Heerema, N. A., Lozanski, G., Stefanos, M., Munneke, B., West, J. S., Neuenburg, J. K., James, D. F., Hall, N., Johnson, A. J., and Byrd, J. C. (2015) Safety and activity of BTK inhibitor ibrutinib combined with ofatumumab in chronic lymphocytic leukemia: a phase 1b/2 study. *Blood* **126**, 842-850
  25. Schwarzbich, M. A., McClanahan, F., and Gribben, J. (2016) Allogeneic Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukemia in the Age of Novel Treatment Strategies. *Oncology (Williston Park)* **30**, 526-533, 540
  26. Mato, A., and Porter, D. L. (2015) A drive through cellular therapy for CLL in 2015: allogeneic cell transplantation and CARs. *Blood* **126**, 478-485
  27. Baumgarth, N. (2011) The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* **11**, 34-46



28. Savage, H. P., and Baumgarth, N. (2015) Characteristics of natural antibody-secreting cells. *Ann N Y Acad Sci* **1362**, 132-142
29. Aziz, M., Holodick, N. E., Rothstein, T. L., and Wang, P. (2015) The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol Res* **63**, 153-166
30. Griffin, D. O., Holodick, N. E., and Rothstein, T. L. (2011) Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med* **208**, 67-80
31. Covens, K., Verbinnen, B., Geukens, N., Meyts, I., Schuit, F., Van Lommel, L., Jacquemin, M., and Bossuyt, X. (2013) Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood* **121**, 5176-5183
32. Kikushige, Y., Ishikawa, F., Miyamoto, T., Shima, T., Urata, S., Yoshimoto, G., Mori, Y., Iino, T., Yamauchi, T., Eto, T., Niino, H., Iwasaki, H., Takenaka, K., and Akashi, K. (2011) Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* **20**, 246-259
33. Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M. R., Byrd, J. C., Botstein, D., Brown, P. O., and Staudt, L. M. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511
34. Rosenwald, A., Alizadeh, A. A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R. E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O. K., Rassenti, L. Z., Powell, J., Botstein, D., Byrd, J. C., Grever, M. R., Cheson, B. D., Chiorazzi, N., Wilson, W. H., Kipps, T. J., Brown, P. O., and Staudt, L. M. (2001) Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* **194**, 1639-1647
35. Casola, S., Otipoby, K. L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J. L., Carroll, M. C., and Rajewsky, K. (2004) B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* **5**, 317-327
36. Diamant, E., Keren, Z., and Melamed, D. (2005) CD19 regulates positive selection and maturation in B lymphopoiesis: lack of CD19 imposes developmental arrest of immature B cells and consequential stimulation of receptor editing. *Blood* **105**, 3247-3254
37. Khan, W. N., Alt, F. W., Gerstein, R. M., Malynn, B. A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A. B., Herzenberg, L. A., and et al. (1995) Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* **3**, 283-299
38. Deglesne, P. A., Chevallier, N., Letestu, R., Baran-Marszak, F., Beitar, T., Salanoubat, C., Sanhes, L., Nataf, J., Roger, C., Varin-Blank, N., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (2006) Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* **66**, 7158-7166
39. Le Roy, C., Deglesne, P. A., Chevallier, N., Beitar, T., Eclache, V., Quettier, M., Boubaya, M., Letestu, R., Levy, V., Ajchenbaum-Cymbalista, F., and Varin-Blank, N. (2015) The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356-365
40. Messmer, B. T., Messmer, D., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E. J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R. N., Wasil, T., Rai, K. R., Hellerstein, M. K., and Chiorazzi, N. (2005) In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* **115**, 755-764
41. Burger, J. A., Quiroga, M. P., Hartmann, E., Burkle, A., Wierda, W. G., Keating, M. J., and Rosenwald, A. (2009) High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* **113**, 3050-3058
42. Nishio, M., Endo, T., Tsukada, N., Ohata, J., Kitada, S., Reed, J. C., Zvaifler, N. J., and Kipps, T. J. (2005) Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic

- lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* **106**, 1012-1020
43. Ferretti, E., Bertolotto, M., Deaglio, S., Tripodo, C., Ribatti, D., Audrito, V., Blengio, F., Matis, S., Zupo, S., Rossi, D., Ottonello, L., Gaidano, G., Malavasi, F., Pistoia, V., and Corcione, A. (2011) A novel role of the CX3CR1/CX3CL1 system in the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and tumor microenvironment. *Leukemia* **25**, 1268-1277
  44. Tsukada, N., Burger, J. A., Zvaifler, N. J., and Kipps, T. J. (2002) Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **99**, 1030-1037
  45. Okkenhaug, K., and Burger, J. A. (2016) PI3K Signaling in Normal B Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Curr Top Microbiol Immunol* **393**, 123-142
  46. Deaglio, S., Vaisitti, T., Bergui, L., Bonello, L., Horenstein, A. L., Tamagnone, L., Boumsell, L., and Malavasi, F. (2005) CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* **105**, 3042-3050
  47. Ghobrial, I. M., Bone, N. D., Stenson, M. J., Novak, A., Hedin, K. E., Kay, N. E., and Ansell, S. M. (2004) Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clin Proc* **79**, 318-325
  48. Burkle, A., Niedermeier, M., Schmitt-Graff, A., Wierda, W. G., Keating, M. J., and Burger, J. A. (2007) Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **110**, 3316-3325
  49. Heinig, K., Gatjen, M., Grau, M., Stache, V., Anagnostopoulos, I., Gerlach, K., Niesner, R. A., Cseresnyes, Z., Hauser, A. E., Lenz, P., Hehlhans, T., Brink, R., Westermann, J., Dorken, B., Lipp, M., Lenz, G., Rehm, A., and Hopken, U. E. (2014) Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer Discov* **4**, 1448-1465
  50. Vlad, A., Deglesne, P. A., Letestu, R., Saint-Georges, S., Chevallier, N., Baran-Marszak, F., Varin-Blank, N., Ajchenbaum-Cymbalista, F., and Ledoux, D. (2009) Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res* **69**, 6387-6395
  51. Saint Georges, S., Quettier, M., Bouyaba, M., Le Coquil, S., Lauriente, V., Guittat, L., Levy, V., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Varin-Blank, N., Le Roy, C., and Ledoux, D. (2016) Protein kinase D-dependent CXCR4 down-regulation upon BCR triggering is linked to lymphadenopathy in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget*
  52. Mauri, C., and Blair, P. A. (2010) Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 636-643
  53. Wolf, S. D., Dittel, B. N., Hardardottir, F., and Janeway, C. A., Jr. (1996) Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* **184**, 2271-2278
  54. Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D., and Anderton, S. M. (2002) B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* **3**, 944-950
  55. Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., and Londei, M. (2003) Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* **197**, 489-501
  56. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S., and Bhan, A. K. (2002) Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* **16**, 219-230
  57. Carter, N. A., Vasconcellos, R., Rosser, E. C., Tulone, C., Munoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M. R., Flavell, R. A., and Mauri, C. (2011) Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol* **186**, 5569-5579
  58. Evans, J. G., Chavez-Rueda, K. A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D. J., Ehrenstein, M. R., and Mauri, C. (2007) Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* **178**, 7868-7878

59. Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M., and Tedder, T. F. (2008) A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* **28**, 639-650
60. Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Matsushita, T., Tsubata, T., and Tedder, T. F. (2009) The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol* **182**, 7459-7472
61. Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M., and Tedder, T. F. (2008) Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest* **118**, 3420-3430
62. Xiao, S., Najafian, N., Reddy, J., Albin, M., Zhu, C., Jensen, E., Imitola, J., Korn, T., Anderson, A. C., Zhang, Z., Gutierrez, C., Moll, T., Sobel, R. A., Umetsu, D. T., Yagita, H., Akiba, H., Strom, T., Sayegh, M. H., DeKruyff, R. H., Khoury, S. J., and Kuchroo, V. K. (2007) Differential engagement of Tim-1 during activation can positively or negatively costimulate T cell expansion and effector function. *J Exp Med* **204**, 1691-1702
63. Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M. H., Najafian, N., and Rothstein, D. M. (2011) Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J Clin Invest* **121**, 3645-3656
64. Mauri, C., and Menon, M. (2015) The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol* **27**, 479-486
65. Qian, L., Qian, C., Chen, Y., Bai, Y., Bao, Y., Lu, L., and Cao, X. (2012) Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcγRIIbhi regulatory B cells through IFN-β and CD40L. *Blood* **120**, 581-591
66. Khan, A. R., Hams, E., Floudas, A., Sparwasser, T., Weaver, C. T., and Fallon, P. G. (2015) PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun* **6**, 5997
67. Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S. L., Sakaguchi, S., Takeda, K., Kurosaki, T., and Baba, Y. (2014) Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* **41**, 1040-1051
68. Blair, P. A., Norena, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., and Mauri, C. (2010) CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* **32**, 129-140
69. Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M. R., Isenberg, D. A., and Mauri, C. (2013) CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med* **5**, 173ra123
70. Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M., Szabolcs, P. M., Bernstein, S. H., Magro, C. M., Williams, A. D., Hall, R. P., St Clair, E. W., and Tedder, T. F. (2011) Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **117**, 530-541
71. Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2011) Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* **36**, 228-238
72. Griffin, D. O., and Rothstein, T. L. (2012) Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. *Mol Med* **18**, 1003-1008
73. Lin, W., Cerny, D., Chua, E., Duan, K., Yi, J. T., Shadan, N. B., Lum, J., Maho-Vaillant, M., Zolezzi, F., Wong, S. C., Larbi, A., Fink, K., Musette, P., Poidinger, M., and Calbo, S. (2014) Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate. *J Immunol* **193**, 2258-2266
74. van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Sollner, S., Akdis, D. G., Ruckert, B., Akdis, C. A., and Akdis, M. (2013) IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 1204-1212

75. Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, A. R., Khanna, P., Peppas, D., Chen, A., Blair, P., Dusheiko, G., Gill, U., Kennedy, P. T., Brunetto, M., Lampertico, P., Mauri, C., and Maini, M. K. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* **189**, 3925-3935
76. Tretter, T., Venigalla, R. K., Eckstein, V., Saffrich, R., Sertel, S., Ho, A. D., and Lorenz, H. M. (2008) Induction of CD4+ T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells. *Blood* **112**, 4555-4564
77. Yoshizaki, A., Miyagaki, T., DiLillo, D. J., Matsushita, T., Horikawa, M., Kountikov, E. I., Spolski, R., Poe, J. C., Leonard, W. J., and Tedder, T. F. (2012) Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* **491**, 264-268
78. Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Preffer, F. I., and Bhan, A. K. (2000) Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int Immunol* **12**, 597-605
79. Matsumoto, M., Fujii, Y., Baba, A., Hikida, M., Kurosaki, T., and Baba, Y. (2011) The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity* **34**, 703-714
80. Jin, G., Hamaguchi, Y., Matsushita, T., Hasegawa, M., Le Huu, D., Ishiura, N., Naka, K., Hirao, A., Takehara, K., and Fujimoto, M. (2013) B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 1674-1682
81. Bouaziz, J. D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., and Musette, P. (2010) IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol* **40**, 2686-2691
82. Ziegler, S., Gartner, K., Scheuermann, U., Zoeller, T., Hantzschmann, J., Over, B., Foermer, S., Heeg, K., and Bekeredjian-Ding, I. (2014) Ca<sup>2+</sup>-related signaling events influence TLR9-induced IL-10 secretion in human B cells. *Eur J Immunol* **44**, 1285-1298
83. Niino, H., and Clark, E. A. (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* **2**, 945-956
84. Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D. L. (2001) Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* **167**, 1081-1089
85. Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderon Gomez, E., Sweenie, C. H., Hao, Y., Freitas, A. A., Steinhoff, U., Anderton, S. M., and Fillatreau, S. (2008) TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* **180**, 4763-4773
86. Isaza-Correa, J. M., Liang, Z., van den Berg, A., Diepstra, A., and Visser, L. (2014) Toll-like receptors in the pathogenesis of human B cell malignancies. *J Hematol Oncol* **7**, 57
87. Kaltenmeier, C., Gawanbacht, A., Beyer, T., Lindner, S., Trzaska, T., van der Merwe, J. A., Harter, G., Gruner, B., Fabricius, D., Lotfi, R., Schwarz, K., Schutz, C., Honig, M., Schulz, A., Kern, P., Bommer, M., Schrezenmeier, H., Kirchhoff, F., and Jahrsdorfer, B. (2015) CD4+ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients. *J Immunol* **194**, 3768-3777
88. Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G. P., Sheng, C., Phillips, T. M., Lipsky, P. E., and Ettinger, R. (2007) Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J Immunol* **179**, 5886-5896
89. Yehudai, D., Snir, A., Peri, R., Halasz, K., Haj, T., Odeh, M., and Kessel, A. (2012) B cell-activating factor enhances interleukin-6 and interleukin-10 production by ODN-activated human B cells. *Scand J Immunol* **76**, 371-377
90. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765
91. Stanic, B., van de Veen, W., Wirz, O. F., Ruckert, B., Morita, H., Sollner, S., Akdis, C. A., and Akdis, M. (2015) IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* **135**, 771-780.e778

92. Mocellin, S., Marincola, F. M., and Young, H. A. (2005) Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol* **78**, 1043-1051
93. Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Eberhardt, B., Platzer, C., Schoning, B., Glockner, F., Lanksch, W. R., Volk, H. D., and Docke, W. D. (1998) Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med* **4**, 808-813
94. Oberholzer, A., Oberholzer, C., and Moldawer, L. L. (2002) Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med* **30**, S58-s63
95. Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., and Mori, T. (2010) Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem* **147**, 781-792
96. Parekh, V. V., Prasad, D. V., Banerjee, P. P., Joshi, B. N., Kumar, A., and Mishra, G. C. (2003) B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol* **170**, 5897-5911
97. Hagn, M., and Jahrsdorfer, B. (2012) Why do human B cells secrete granzyme B? Insights into a novel B-cell differentiation pathway. *Oncoimmunology* **1**, 1368-1375
98. Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T. F., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., Lunov, O., Nienhaus, G. U., Simmet, T., Kreienberg, R., Moller, P., Schrezenmeier, H., and Jahrsdorfer, B. (2013) Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res* **73**, 2468-2479
99. Hagn, M., Blackwell, S. E., Beyer, T., Ebel, V., Fabricius, D., Lindner, S., Stilgenbauer, S., Simmet, T., Tam, C., Neeson, P., Trapani, J. A., Schrezenmeier, H., Weiner, G. J., and Jahrsdorfer, B. (2014) B-CLL cells acquire APC- and CTL-like phenotypic characteristics after stimulation with CpG ODN and IL-21. *Int Immunol* **26**, 383-395
100. Jahrsdorfer, B., Blackwell, S. E., Wooldridge, J. E., Huang, J., Andreski, M. W., Jacobus, L. S., Taylor, C. M., and Weiner, G. J. (2006) B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood* **108**, 2712-2719
101. Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R. A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V. D., Jaimes, Y., Daridon, C., Li, R., Jouneau, L., Boudinot, P., Wilantri, S., Sakwa, I., Miyazaki, Y., Leech, M. D., McPherson, R. C., Wirtz, S., Neurath, M., Hoehlig, K., Meinl, E., Grutzkau, A., Grun, J. R., Horn, K., Kuhl, A. A., Dorner, T., Bar-Or, A., Kaufmann, S. H., Anderton, S. M., and Fillatreau, S. (2014) IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* **507**, 366-370
102. Wang, R. X., Yu, C. R., Dambuza, I. M., Mahdi, R. M., Dolinska, M. B., Sergeev, Y. V., Wingfield, P. T., Kim, S. H., and Egwuagu, C. E. (2014) Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* **20**, 633-641
103. Mauri, C., and Nistala, K. (2015) Interleukin-35 takes the 'B' line. *Nat Med* **20**, 580-581
104. Fonseca-Camarillo, G., Furuzawa-Carballeda, J., and Yamamoto-Furusho, J. K. (2015) Interleukin 35 (IL-35) and IL-37: Intestinal and peripheral expression by T and B regulatory cells in patients with Inflammatory Bowel Disease. *Cytokine* **75**, 389-402
105. Sun, T., Zhang, D., Yang, Y., Zhang, X., Lv, C., Fu, R., Lv, M., Liu, W., Chen, Y., Huang, Y., Xue, F., Liu, X., Zhang, L., Li, H., and Yang, R. (2015) Interleukin 35 may contribute to the loss of immunological self-tolerance in patients with primary immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* **169**, 278-285
106. Noh, J., Choi, W. S., Noh, G., and Lee, J. H. (2010) Presence of Foxp3-expressing CD19(+)/CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)/CD5(+)/Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune Netw* **10**, 247-249
107. Noh, J., Noh, G., Kim, H. S., Kim, A. R., and Choi, W. S. (2012) Allergen-specific responses of CD19(+)/CD5(+)/Foxp3(+) regulatory B cells (Bregs) and CD4(+)/Foxp3(+) regulatory T cell (Tregs) in immune tolerance of cow milk allergy of late eczematous reactions. *Cell Immunol* **274**, 109-114

108. Vadasz, Z., Peri, R., Eiza, N., Slobodin, G., Balbir-Gurman, A., and Toubi, E. (2015) The Expansion of CD25(high)IL-10(high)FoxP3(high) B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *J Immunol Res* **2015**, 254245
109. Curti, A., Trabanelli, S., Salvestrini, V., Baccarani, M., and Lemoli, R. M. (2009) The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* **113**, 2394-2401
110. Nouel, A., Pochard, P., Simon, Q., Segalen, I., Le Meur, Y., Pers, J. O., and Hillion, S. (2015) B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in a CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun* **59**, 53-60
111. Georg, P., and Bekeredjian-Ding, I. (2012) Plasmacytoid dendritic cells control B cell-derived IL-10 production. *Autoimmunity* **45**, 579-583
112. Zent, C. S., Ding, W., Reinalda, M. S., Schwager, S. M., Hoyer, J. D., Bowen, D. A., Jelinek, D. F., Tschumper, R. C., Call, T. G., Shanafelt, T. D., Kay, N. E., and Slager, S. L. (2009) Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: changes in clinical presentation and prognosis. *Leuk Lymphoma* **50**, 1261-1268
113. Zent, C. S., Ding, W., Schwager, S. M., Reinalda, M. S., Hoyer, J. D., Jelinek, D. F., Tschumper, R. C., Bowen, D. A., Call, T. G., Shanafelt, T. D., Kay, N. E., and Slager, S. L. (2008) The prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. *Br J Haematol* **141**, 615-621
114. Shvidel, L., Tadmor, T., Braester, A., Bairey, O., Rahimi-Levene, N., Herishanu, Y., Klepfish, A., Shtalrid, M., Berrebi, A., and Polliack, A. (2013) Pathogenesis, prevalence, and prognostic significance of cytopenias in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a retrospective comparative study of 213 patients from a national CLL database of 1,518 cases. *Ann Hematol* **92**, 661-667
115. Quinquenel, A., Al Nawakil, C., Baran-Marszak, F., Eclache, V., Letestu, R., Khalloufi, M., Boubaya, M., Le Roy, C., Varin-Blank, N., Delmer, A., Levy, V., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (2015) Old DAT and new data: positive direct antiglobulin test identifies a subgroup with poor outcome among chronic lymphocytic leukemia stage A patients. *Am J Hematol* **90**, E5-8
116. Grignano, E., Mekinian, A., Caux, F., Soussan, M., Cymbalista, F., and Fain, O. (2015) Systemic granulomatosis and polyarthritis with pitting edema in B-chronic lymphocytic leukemia. *Joint Bone Spine* **82**, 294-295
117. Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., Gonzalez-Rodriguez, A. P., Contesti, J., Gonzalez-Garcia, E., Payer, A. R., Villa-Alvarez, M., Fernandez-Guizan, A., Lopez-Soto, A., and Gonzalez, S. (2014) Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. *PLoS One* **9**, e108326
118. Eskelund, C. W., Nederby, L., Thysen, A. H., Skovbo, A., Roug, A. S., and Hokland, M. E. (2011) Interleukin-21 and rituximab enhance NK cell functionality in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* **35**, 914-920
119. Acebes-Huerta, A., Huergo-Zapico, L., Gonzalez-Rodriguez, A. P., Fernandez-Guizan, A., Payer, A. R., and Lopez-Soto, A. (2014) Lenalidomide induces immunomodulation in chronic lymphocytic leukemia and enhances antitumor immune responses mediated by NK and CD4 T cells. **2014**, 265840
120. Jain, P., Javdan, M., Feger, F. K., Chiu, P. Y., Sison, C., Damle, R. N., Bhuiya, T. A., Sen, F., Abruzzo, L. V., Burger, J. A., Rosenwald, A., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Rai, K. R., Chiorazzi, N., and Sherry, B. (2012) Th17 and non-Th17 interleukin-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia: delineation, distribution, and clinical relevance. *Haematologica* **97**, 599-607
121. Hus, I., Bojarska-Junak, A., Chocholska, S., Tomczak, W., Wos, J., Dmoszynska, A., and Rolinski, J. (2013) Th17/IL-17A might play a protective role in chronic lymphocytic leukemia immunity. *PLoS One* **8**, e78091
122. Idler, I., Giannopoulos, K., Zenz, T., Bhattacharya, N., Nothing, M., Dohner, H., Stilgenbauer, S., and Mertens, D. (2010) Lenalidomide treatment of chronic lymphocytic leukaemia patients reduces regulatory T cells and induces Th17 T helper cells. *Br J Haematol* **148**, 948-950

123. Lad, D. P., Varma, S., Varma, N., Sachdeva, M. U., Bose, P., and Malhotra, P. (2015) Regulatory T-cell and T-helper 17 balance in chronic lymphocytic leukemia progression and autoimmune cytopenias. *Leuk Lymphoma* **56**, 2424-2428
124. Giannopoulos, K., Schmitt, M., Kowal, M., Wlasiuk, P., Bojarska-Junak, A., Chen, J., Rolinski, J., and Dmoszynska, A. (2008) Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep* **20**, 677-682
125. Jadidi-Niaragh, F., Yousefi, M., Memarian, A., Hojjat-Farsangi, M., Khoshnoodi, J., Razavi, S. M., Jeddi-Tehrani, M., and Shokri, F. (2013) Increased frequency of CD8+ and CD4+ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. *Cancer Invest* **31**, 121-131
126. Biancotto, A., Dagur, P. K., Fuchs, J. C., Wiestner, A., Bagwell, C. B., and McCoy, J. P., Jr. (2012) Phenotypic complexity of T regulatory subsets in patients with B-chronic lymphocytic leukemia. *Mod Pathol* **25**, 246-259
127. Fayad, L., Keating, M. J., Reuben, J. M., O'Brien, S., Lee, B. N., Lerner, S., and Kurzrock, R. (2001) Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* **97**, 256-263
128. Lech-Maranda, E., Grzybowska-Izydorczyk, O., Wyka, K., Mlynarski, W., Borowiec, M., Antosik, K., Cebula-Obrzut, B., Makuch-Lasica, H., Nowak, G., Klimkiewicz-Wojciechowska, G., Wawrzyniak, E., Bilinski, P., Robak, T., and Warzocha, K. (2012) Serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 levels as markers to predict outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia in different risk groups defined by the IGHV mutation status. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **60**, 477-486
129. Rossi, M., Gentile, M., Toscano, R., Recchia, A. G., Bossio, S., Caruso, N., De Stefano, L., Granata, T., Pellicano, M., Vigna, E., Tagliaferri, P., Tassone, P., and Morabito, F. (2014) Enumeration of interleukin-10-positive B cells from peripheral blood of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **55**, 1394-1396
130. Alhakeem, S. S., Sindhava, V. J., McKenna, M. K., Gachuki, B. W., Byrd, J. C., Muthusamy, N., and Bondada, S. (2015) Role of B cell receptor signaling in IL-10 production by normal and malignant B-1 cells. *Ann N Y Acad Sci* **1362**, 239-249
131. Garaud, S., Morva, A., Lemoine, S., Hillion, S., Bordron, A., Pers, J. O., Berthou, C., Mageed, R. A., Renaudineau, Y., and Youinou, P. (2011) CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol* **186**, 4835-4844
132. Perez-Chacon, G., Vargas, J. A., Jorda, J., Morado, M., Rosado, S., Martin-Donaire, T., Losada-Fernandez, I., Rebolleda, N., and Perez-Aciego, P. (2007) CD5 provides viability signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC. *Leuk Res* **31**, 183-193
133. Ishida, H., Hastings, R., Kearney, J., and Howard, M. (1992) Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* **175**, 1213-1220
134. Endo, T., Nishio, M., Enzler, T., Cottam, H. B., Fukuda, T., James, D. F., Karin, M., and Kipps, T. J. (2007) BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood* **109**, 703-710
135. Saulep-Easton, D., Vincent, F. B., Quah, P. S., Wei, A., Ting, S. B., Croce, C. M., Tam, C., and Mackay, F. The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. *Leukemia*
136. DiLillo, D. J., Weinberg, J. B., Yoshizaki, A., Horikawa, M., Bryant, J. M., Iwata, Y., Matsushita, T., Matta, K. M., Chen, Y., Venturi, G. M., Russo, G., Gockerman, J. P., Moore, J. O., Diehl, L. F., Volkheimer, A. D., Friedman, D. R., Lanasa, M. C., Hall, R. P., and Tedder, T. F. (2013) Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia* **27**, 170-182
137. Drennan, S., D'Avola, A., Gao, Y., Weigel, C., Chrysostomou, E., Steele, A. J., Zenz, T., Plass, C., Johnson, P. W., Williams, A. P., Packham, G., Stevenson, F. K., Oakes, C. C., and Forconi, F.

- (2016) IL-10 production by CLL cells is enhanced in the anergic IGHV mutated subset and associates with reduced DNA methylation of the IL10 locus. *Leukemia*
138. Fabbri, G., and Dalla-Favera, R. (2016) The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **16**, 145-162
  139. Jitschin, R., Braun, M., Buttner, M., Dettmer-Wilde, K., Bricks, J., Berger, J., Eckart, M. J., Krause, S. W., Oefner, P. J., Le Blanc, K., Mackensen, A., and Mougiakakos, D. (2014) CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood* **124**, 750-760
  140. Rosser, E. C., and Mauri, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* **42**, 607-612
  141. Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., Hillmen, P., Keating, M. J., Montserrat, E., Rai, K. R., and Kipps, T. J. (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* **111**, 5446-5456
  142. Le Roy, C., Deglesne, P. A., Chevallier, N., Beitar, T., Eclache, V., Quettier, M., Boubaya, M., Letestu, R., Levy, V., Ajchenbaum-Cymbalista, F., and Varin-Blank, N. (2012) The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356-365
  143. Hossain, D. M., Panda, A. K., Manna, A., Mohanty, S., Bhattacharjee, P., Bhattacharyya, S., Saha, T., Chakraborty, S., Kar, R. K., Das, T., Chatterjee, S., and Sa, G. (2013) FoxP3 acts as a cotranscription factor with STAT3 in tumor-induced regulatory T cells. *Immunity* **39**, 1057-1069
  144. Cherukuri, A., Rothstein, D. M., Clark, B., Carter, C. R., Davison, A., Hernandez-Fuentes, M., Hewitt, E., Salama, A. D., and Baker, R. J. (2014) Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF-alpha expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol* **25**, 1575-1585
  145. Larsen, M., Arnaud, L., Hie, M., Parizot, C., Dorgham, K., Shoukry, M., Kemula, M., Barete, S., Derai, D., Sauce, D., Amoura, Z., Pene, J., Yssel, H., and Gorochov, G. (2011) Multiparameter grouping delineates heterogeneous populations of human IL-17 and/or IL-22 T-cell producers that share antigen specificities with other T-cell subsets. *Eur J Immunol* **41**, 2596-2605
  146. Lotz, M., Ranheim, E., and Kipps, T. J. (1994) Transforming growth factor beta as endogenous growth inhibitor of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med* **179**, 999-1004
  147. Kremer, J. P., Reisbach, G., Nerl, C., and Dormer, P. (1992) B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells express and release transforming growth factor-beta. *Br J Haematol* **80**, 480-487
  148. Douglas, R. S., Capocasale, R. J., Lamb, R. J., Nowell, P. C., and Moore, J. S. (1997) Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta. *Blood* **89**, 941-947
  149. DeCoteau, J. F., Knaus, P. I., Yankelev, H., Reis, M. D., Lowsky, R., Lodish, H. F., and Kadin, M. E. (1997) Loss of functional cell surface transforming growth factor beta (TGF-beta) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF-beta in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5877-5881
  150. Natarajan, P., Singh, A., McNamara, J. T., Secor, E. R., Jr., Guernsey, L. A., Thrall, R. S., and Schramm, C. M. (2012) Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5+, express TGF-beta, and co-localize with CD4+Foxp3+ T cells. *Mucosal immunology* **5**, 691-701
  151. Hagn, M., Ebel, V., Sontheimer, K., Schwesinger, E., Lunov, O., Beyer, T., Fabricius, D., Barth, T. F., Viardot, A., Stilgenbauer, S., Hepp, J., Scharffetter-Kochanek, K., Simmet, T., and Jahrsdorfer, B. (2010) CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B. *Eur J Immunol* **40**, 2060-2069



152. Frank, D. A., Mahajan, S., and Ritz, J. (1997) B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest* **100**, 3140-3148
153. Boyd, A., Almeida, J. R., Darrah, P. A., Sauce, D., Seder, R. A., Appay, V., Gorochov, G., and Larsen, M. (2015) Pathogen-Specific T Cell Polyfunctionality Is a Correlate of T Cell Efficacy and Immune Protection. *PLoS One* **10**, e0128714
154. Calissano, C., Damle, R. N., Marsilio, S., Yan, X. J., Yancopoulos, S., Hayes, G., Emson, C., Murphy, E. J., Hellerstein, M. K., Sison, C., Kaufman, M. S., Kolitz, J. E., Allen, S. L., Rai, K. R., Ivanovic, I., Dozmorov, I. M., Roa, S., Scharff, M. D., Li, W., and Chiorazzi, N. (2011) Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med* **17**, 1374-1382
155. Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., Hacohen, N., Meyerson, M., Lander, E. S., Neubergh, D., Brown, J. R., Getz, G., and Wu, C. J. (2013) Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* **152**, 714-726
156. Grygorowicz, M. A., Biernacka, M., Bujko, M., Nowak, E., Rymkiewicz, G., Paszkiewicz-Kozik, E., Borycka, I. S., Bystydziński, Z., Walewski, J., and Markowicz, S. (2016) Human regulatory T cells suppress proliferation of B lymphoma cells. *Leuk Lymphoma* **57**, 1903-1920