

UNIVERSITE PARIS 13
UFR de SANTÉ, MÉDECINE et BIOLOGIE HUMAINE

ÉCOLE DOCTORALE GALILÉE

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13
Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Relevance physiopathologique des productions cytokiniques dans la
Leucémie Lymphoïde Chronique**

Présentée et soutenue publiquement par

Maïssa MHIBIK

Le 19 mars 2018

Directrice de thèse : Dr Nadine VARIN-BLANK

Co-Directeur de thèse : Dr Denis LESAGE

MEMBRES DU JURY :

Dr Valérie LALLEMAND

Dr Karen LEROY

Dr Fabrice GOUYEUX

Dr Mikael ROUSSEL

Dr Nadine VARIN-BLANK

Dr Denis LESAGE

Présidente du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de Thèse

Co-Directeur de Thèse

Remerciements

Aux membres du jury

*Vous nous faites l'honneur d'examiner et de juger ce travail.
Je vous prie de trouver ici l'expression de toute ma gratitude.*

À ma directrice de thèse

Nadine, je me souviens encore de notre premier échange par skype alors que j'étais à Londres. À ce moment-là je n'imaginais pas que j'allais vivre une telle aventure. Je te suis très reconnaissante de m'avoir permis la vivre au sein de ton équipe. Je te remercie pour tous tes conseils et d'avoir partagé ton expérience avec moi.

À mon co-directeur de thèse

Denis, je suis heureuse d'avoir été ta première, et d'avoir vécu cette aventure à tes cotés. Je te remercie pour ton aide, tes conseils et d'avoir toujours gardé ce côté humain. J'espère t'avoir apporté autant que tu as pu m'apporter. Je te souhaite une très bonne continuation.

Aux membres de l'équipe U978

À notre « Monsieur » Ledoux, tu as été un véritable mentor depuis mon master 1. Ma présence dans l'équipe je te la dois et t'en remercie. Je te remercie pour tes conseils, ta gentillesse et espère rencontrer des personnes aussi bienveillantes que toi sur mon chemin.

Ma chère Christine, ta générosité, ta gentillesse et ton soutien m'ont tellement touché. En plus de ta grande expérience, ton sourire et ta joie de vivre font de chacun de nos échanges, une véritable source de motivation qui nous donne envie d'aller toujours plus loin. Merci d'avoir été là, merci d'avoir été toi et merci de m'avoir tant apporté.

À Lionel, Je te remercie d'avoir accepté de partager ton expérience, de m'avoir soutenu et écouté. Pour toutes nos longues discussions sérieuses et surtout nos délires, Merci.

Laura.G, Je te remercie pour tes conseils et d'avoir toujours été d'attaque pour nos fameux sushis party. Je prendrais soin de notre cher David. Gracie Mille.

Remerciements

Betty, ta bonne énergie m'a toujours impressionné. Nos conversations qui me font voyager ou revivre mon enfance dans le quartier de Paris Commerce vont me manquer. Arrivederci !

Bella, merci pour tes conseils et ton aide. Te trouver au labo les soirées et les week-ends, nous rassurais beaucoup et je n'oublierais pas ton amour pour le poisson.

Laura.V, je suis contente d'avoir pu travailler à tes côtés, depuis ton départ, je ne vais plus au fitness ! Bon, c'est vrai, j'y allais déjà plus avant. Merci pour tout ce peps et bonne continuation.

Ma chère Stéphanie, j'ai découvert en toi une si belle personne, pleine de joie de vivre et tu as su me surprendre avec tes talents d'actrice, de danseuse et de coureuse de fond (pour le bus). Je suis ravie d'avoir fait ta connaissance et te souhaite le meilleur.

Rim, Je te remercie de ta gentillesse et de toutes tes petites attentions, je te souhaite bon courage pour cette dernière ligne droite.

Rofia, encore toute fraîche ! Le fait que tu me demande conseils et me prenne au sérieux (ce qui est rare pour moi) me touche. Je sais que tu peux être une véritable warrior, je crois en toi et te souhaite pleins de courage.

Souhaïl, Merci pour ta gentillesse et pour les boîtes de chocolats que j'ai pu dévorer. Je sais que ça n'a pas dû être facile de supporter mes grosses humeurs. Bon courage à toi.

Shayan, J'ai une question ! Je suis heureuse d'avoir pu travailler avec toi. J'ai beaucoup appris et espère avoir réussi à te transmettre mon amour pour FOX. Garde cette curiosité et cette motivation.

À Antonin, Il y a plus de 3 ans on s'était parlé par mail mais il a fallu que tu intègres l'équipe pour qu'on puisse se rencontrer. J'ai beaucoup apprécié nos pauses café et nos discussions philosophiques sur la science, la musique ou la paix dans le monde. À bientôt

À Anne, ou devrais-je dire « Ana », je suis ravie de t'avoir rencontré et d'avoir pu partager de beaux instants. On a passé notre mois de décembre à rédiger mais pour le mois de février, je voudrais juste un bonhomme de neige. Désolée, mais avec le second épisode de la reine des neiges, qui sort bientôt, j'étais obligée ! Très bonne continuation.

Aux anciens stagiaires M2,

Hugo, j'ai juste adoré partager mon bureau avec toi, unis par notre amour du café, de la bonne musique mais surtout par notre folie. Je te souhaite le meilleur.

Sophie, une spontanéité et un naturel qui font de toi une personne juste géniale et montrent que les médecins sont humains (They are real !)

Remerciements

Les Chloés je vous souhaite une bonne continuation et du courage pour la suite.

Aux anciens anciens,

Hajer, Maude, Elodie, Stéphane et Max, je suis heureuse d'avoir fait votre connaissance et vous souhaite le meilleur.

Au reste de l'équipe et aux membres du service d'hématologie de l'hôpital Avicenne, Au Pr Florence Cymbalista, Emmanuelle, Olivier, Fanny.

À Valérie et Jean-François, je vous remercie de m'avoir initié au séquençage et à l'utilisation du NGS.

Les filles ! Nos pauses Café/Clope me manqueront...

Amel !

Tu as été un véritable pilier pour moi durant cette fin de thèse et un vrai psy aussi. Je te suis tellement reconnaissante et si heureuse de t'avoir rencontré. Malgré ton semblant de fragilité, tu es avant tout une personne honnête et avec un très grand cœur. Je ne sais pas pour toi, mais pour moi ça ressemble à un début d'une grande amitié... To be continued...

Ma belle Laure,

La belle gosse, j'aurais pu te mettre avec les batatas parce que franchement il y a du level ! On a passé tellement de bons moments que j'ai l'impression qu'on se connaît depuis plusieurs années et ce n'est pas fini ! Ne change rien ! Même quand tu râles. Essaie juste d'arrêter de faire des Laures, c'est pour toi que je dis ça. J'espère que Pakito et toi me rendrez visite à DC. « Est-ce que tu m'entends ? Hé ho ! »

Aux membres de la Team Mouthon (&Co)

Claire et Chaïne, un duo de choc ! L'une Rouquine avec une énergie flippante, l'autre médecin qui m'as toujours bien rappelé qui j'étais et surtout, d'où je venais. Même si on ne fait pas la même science, je suis contente d'avoir pu échanger sciences et bêtises avec vous. « Et mes yeux dans vos yeux ...entre vous et l'eau bleue ».

Les &Co : Mathieu, heureuse d'avoir partagé mes talents de chorégraphes avec toi, Sothea, la plus adulte du groupe mais je n'oublie pas ton amour pour les belles chansons de Disney que je partage. Merci à vous deux, de constamment essayer de relever le niveau avec tous ces « Cassos ».

À Bientôt les fous !!

Remerciements

À mon TAC

Mon frère de thèse, mon coffee mate, mon maître Yoda... bref t'as compris ! Je ne comprends toujours pas comment on s'est retrouvé à bosser ensemble et surtout pourquoi ?! Mais tout ce que je sais c'est que sans ton soutien, tes conseils, nos vraies réflexions scientifiques, nos manips du vendredi à ..h, motivés comme jamais ... cette thèse n'aurait pas été la même. Je te remercie pour tout. À cette nouvelle amitié.

À mes Batatas

Il était une fois ... cinq drôles de dames, aussi différentes l'une que l'autre mais ayant un point en commun : leur amour pour la nourriture. De cet amour naquit un noyau dur qui lié par une grande et belle amitié fut nommé Batata.

La première Batata, c'est toi ma Vaness, un physique et une personnalité, au départ, presque intimidants mais j'ai vite compris qu'on avait en réalité beaucoup de choses en communs. Bon ! Copine ! Tu es quand même un sacré phénomène ! Un phénomène que j'adore et avec un grand cœur. Je crois en toi et sais que tu n'as pas fini de montrer au monde qui tu étais ! La distance n'a pas réussi et ne réussira pas à nous séparer ma Vinissa.

Mon second phénomène, c'est toi Lamia ! Ton fameux « Eh les filles ! » restera gravé dans le livre des Batatas. Merci de nous avoir à toutes rappelé ce qu'étais la vraie vie. Lamia te voir traverser toutes les épreuves que tu as traversé m'a juste montré à quel point tu étais forte et déterminée, une vraie guerrière. Résultat : la naissance d'un Damdoum, le fils des Batatas (Bah ouiii on partage!). Je suis si fière de toi et sait qu'avec toutes tes résolutions tu continueras à m'impressionner.

Ma NouchNouch, la plus gentille, celle à qui on a dû apprendre à dire « non ». Oui oui, je m'en souviens ! Tu n'hésites pas à rendre service et prendre soin des autres (c'est moi : les autres). Maintenant, profite de la vie, tu l'as bien mérité ! Tu as su rebondir quand il le fallait et je suis fière d'avoir découvert une femme aussi déterminée et ambitieuse que toi. Ton nom ne restera pas juste gravé sur les règles, les stylos ou les ciseaux du labo mais restera aussi gravé dans mon cœur.

Neshou, la vraie fille du groupe, j'ignore encore à quel moment j'ai réalisé à quel point on pouvait se ressembler (pas physiquement !). Notre road trip nous l'a confirmé et m'a juste donné envie de partager plus d'aventures aussi folles avec toi. Ensemble, plus rien ne nous arrête. Tu m'as permis de réaliser qui j'étais, de quoi j'étais capable et qui je voulais être. Je remercie la puissance qui a décidé de te mettre sur mon chemin. Merci.

Remerciements

La nouvelle recrue du groupe, ma chère Myriam, on te surnomme Mimi et ça te va vraiment bien. Tu as un si grand cœur, toujours à me répéter que tu es fière de nous, à nous rassurer tu me pousses à devenir une personne meilleure. Je suis heureuse que tu es pu intégrer le groupe des Batatas. Emma et Enzo ont beaucoup de chance d'avoir une maman aussi cool et aussi humaine que toi.

Mes Batatas je vous aime fort... Batatas 4 ever !

À mes Batatos

Bibi, notre rayon de soleil, toujours avec le sourire, la pêche, Merciiii ! Notre délire musical à Center Park restera dans mon esprit tout comme ton aide pour escalader la montagne les yeux bandés hahaha. Entre deux postes, pense à prendre un billet d'avion pour rendre visite à ta pote !

Kris, mon sos ! Le seul à être tombé sous le charme fatal de mes pieds de Gollum. Au départ je te voyais juste comme un joueur (surtout quand tu triches au loup-garou), en réalité, tu es vraiment quelqu'un de bien, qui sait écouter, être là quand il le faut ... tu me fatigues mais je te kiffe fréro !

Ramdhan, notre dan, j'admire ta zénitude, les batatas se sont juste pointées chez toi au jour et depuis ... bah, c'est chez elles aussi et on ne t'a pas trop laissé le choix. Tu incarnes pour nous le mari presque parfait (faut pas que tu prennes trop la confiance non plus). J'ai juste adoré jouer avec toi et surtout gagner ! C'est ça la famille !

Plaplaplouloum, notre champion, je n'oublierais jamais le cochon pendu à Marseille, un très grand moment. Tu m'as offert des moments tellement délirants et une vraie leçon de danse (dour dour), tu es un vrai ! Garde ce sang froid et se calme, que seul un vrai champion peut avoir. Tu resteras toujours mon Plapla.

Sidney, notre Doudou, toujours opérationnel quel que soit le délire. Tu as été d'un vrai soutien pour moi, j'admire ta force et ton courage et ta maman doit être fière de l'homme que tu es. Merci pour tous ces moments, et surtout n'arrêtes pas la photo, tu es bon ! Par contre stp arrêtes les karaokés. Merci Sidou !

Remerciements

À mes Amis

Manel, Sourour, les filles merci d'avoir été là pour écouter mes histoires de labo, pour avoir proposé votre aide durant l'écriture de ce manuscrit. Vos paroles ont été pour moi une des plus grandes sources de motivation.

Mes ingénieurs des Mines : Mathieu (le frère), Benji (le beaugoss), Kevin (le zen), Yacine (pfff, next), Brahim (le pote), Nadia et Doudou (Les batatas Junior). Que ce soit à Gardanne, à Aix ou Paris, vous avez juste été tops. Merci pour tous ces bons moments. Bon j'arrêtes sinon Oums va encore me dire que je lui volé ces potes.

Marine, Shyam, Made in Paris 13, mais c'est une fois que vous avez quitté la fac que nos liens se sont renforcé. Je vous remercie pour toutes vos petites intentions pendant cette période. Ma petite femme, tu vas beaucoup me manquez et j'espère que tu vas me rendre visite à DC, ça nous rappellera Londres.

Nico, Merci d'avoir été là pour cette fin de thèse, tu as pris le temps de tout relire, de comprendre et même de me faire à manger. Je suis heureuse que nos chemins se soient croisés à Londres (dans le quartier d'Angel).

Lydia, Jen, je suis trop heureuse d'avoir partagé des moments si importants tels que votre moment où le concert de Ed Sheeran. Vous avez été une vraie source d'énergie pour moi. Je vous kiffe.

À ma famille

Petit frère, Yassine ! Tu peux faire trois fois ma taille mais tu resteras ma petite boule. Je sais que tu en eu marre de moi et que tu n'attends qu'une chose, c'est que je parte. Mais tkt pas je serais toujours là pour veiller à ce que tu travailles et réalise tes rêves.

Mouna, je suis tellement fière de la femme que tu es devenue, tu as été aux petits soins pour moi pendant cette thèse et un vrai pilier pour toute la famille. Merciii ! Je crois vraiment en toi, n'aies pas peur d'être ambitieuse, fonces. Le bac c'est juste une étape.

Fifi, ça n'a pas toujours été facile entre nous, mais on a quand même eu nos bons moments, merci de nous faire toujours autant rire avec tes bêtises, on s'en lasse pas. Je suis fière de voir que tu as trouvé ta voie et je te souhaite de réussir.

Oums, ma moitié, cette thèse je te la dédie, tu es peut-être ma petite sœur mais j'ai tellement appris de toi. Ambitieuse et rêveuse depuis que tu as 3 ou 4 ans te voilà aujourd'hui en train de réaliser ton rêve de travailler dans le Spatial. Tu m'as donné beaucoup de force et de courage. Grâce à toi j'ai maintenant envie de décrocher les étoiles et sis, c'est ensemble qu'on les décrochera, on est des warriors en costard !

Remerciements

À mes tantes, oncles et grands-parents qui depuis toute petite ont cru en moi et m'ont toujours soutenu.

À ma sœur, le Dr Sonia Mhibik qui m'a transmis cet amour pour la science, je me souviens encore de lorsque j'essayais de déchiffrer tes cours de médecine alors que j'avais juste 10 ans.

À mes parents

Maman, l'amour de ma vie, une mère, une sœur, une amie. Tu nous as donné la vie, l'éducation et cette volonté de réussir. Tu as dû subir tous mes caprices de fille unique et je veux que maintenant tu penses plus à toi. Tu es et seras toujours la personne la plus importante pour moi, je te dois toutes mes réussites. La distance ne changera jamais le lien qui nous unit.

Papou, tu nous as donné cette sagesse et belle éducation, en nous montrant comment on pouvait être de bonnes personnes, la vie n'a pas toujours été simple pour toi et ce chemin on l'a parcouru pour toi, pour te rendre fière et te voir avoir ces petites larmes aux yeux quand tu parles de nous. Tu nous as fait confiance et je t'en remercie. Merci pour cette patience, cette sagesse et cet amour.

Les étoiles que l'on décrochera seront pour vous. Maman, Papa je vous aime.

UNIVERSITE PARIS 13
UFR de SANTÉ, MÉDECINE et BIOLOGIE HUMAINE

ÉCOLE DOCTORALE GALILÉE

**Relevance physiopathologique des productions cytokiniques dans
la Leucémie Lymphoïde Chronique**

Présentée et soutenue publiquement par

Maïssa MHIBIK

Le 19 mars 2018

Directrice de thèse : Dr Nadine VARIN-BLANK

Co-Directeur de thèse : Dr Denis LESAGE

A

ADAM17	ADAM metallopeptidase domain 17
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Ag	Antigène
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
ANAs	Antigènes nucléaires
AP-1	Activator protein 1
APRIL	A proliferation-inducing ligand

B

BAFF	B-cell activating factor
BAFF-R	B cell-activating factor belonging to the TNF family Receptor
Bax	Bcl-2-associated X
BCL-XL	B-cell lymphoma extra large
BCL1	B-cell lymphoma 1
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCR	Récepteur de cellule B (B-cell receptor)
Be1	B effecteur 1
Be2	B effecteur 2
BLNK	B cell linker
Breg	Lymphocyte B régulateurs
BSF-2	B cell stimulatory factor-2
BTK	Bruton Tyrosine Kinase

C

C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
CAR T-cells	Cellules T porteuses de récepteur chimériques
CD	Cluster de différenciation
CDK	Cyclin dependent kinase
CG	Centres Germinatifs
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CREB	Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein
CRM1	Chromosomal maintenance 1
CRP	Protéine C réactive
CSIF	Cytokine Synthesis Inhibitor Factor
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes

CXCL12	Chimiokine à motif C-X-C
CXCR4	Récepteur de chimiokine à motif C-X-C
D	
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DD	Dead domain
E	
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
ERK	Extra-Cellular Signal-Regulated
F	
Fc	Récepteur Fc
FCγRIIB	FC gamma receptor IIB
FDC	Cellules dendritiques folliculaires
Foxp3	Forkhead box P3
G	
GDP	Guanosine diphosphate
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRB2	Growth-factor receptor-bound protein-2
GTP	Guanosine triphosphate
H	
hi	High pour les CD
I	
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobine
IGHV	Chaînes lourdes des immunoglobulines
IKK	Inhibitory kappa B kinase
IL	Interleukine
IL-10	Interleukine 10
IL-6	Interleukine 6
IRAK	IL-1 Receptor-Associated Kinase
IRF	Interferon regulatory factor
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
ITIMs	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
J	
JAK	Janus kinase
JNK	C-JUN N-terminal kinase
L	
LAL-B	Leucémie Aigüe Lymphoblastique B

LCK	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LCM	Lymphomes à cellules du manteau
LDGCB	Lymphome diffus à grandes cellules b
LDT	Temps de doublement des lymphocytes
LES	Lupus érythémateux systémique
LLC	Leucemie lymphoïde chronique
LLC-M	Patients LLC à IgHV mutée
LLC-NM	Patients LLC à IgHV non mutée
M	
MALT	Lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
MCP	Monocytes Chemo attractant Protein
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
mIL-6R	Membran interleukin 6 receptor
MIP	Macrophages Inflammatory Protein
miR	microARN
miRNAs	microARN
MSC	Cellules stromales de la moelle
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
Myd88	Myeloid differentiation primary response 88
N	
NF-κB	Nuclear factor-κB
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NK	Natural Killers
NLCs	Nurse Like Cells
P	
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKC	Protein kinase C
PLCγ2	Phospholipase C gamma 2
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
Pré-B	Précurseur des cellules B
Pro-B	Progéniteur des cellules B
PRR	Pattern recognition Receptor

PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22
R	
RAG	Recombination activating gene
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RTK	Receptor tyrosine kinase
S	
SAA	Sérum amyloïde A
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal cell Derived factor
SHIP	SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase
SHP-1	SH2 domain-containing phosphatase
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling 3
SOS	Son of sevenless
SSc	Sclérodémie systémique
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
T	
TACI	Tansmembrane activator and CAML interactor
TAM	Tumor associated macrophages
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
Tfh	T helper folliculaires
Th	T helper
TIRAP	TIR domain containing adaptator protein inducing IFN β
TK	Thymidine kinase
TLR	Toll-like receptor (récepteurs Toll Like)
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TP53	Tumor protein 53
Treg	Lymphocyte T régulateurs
TYK	Tyrosine kinase
U2OS	Lignée cellulaire d'Ostéosarcome
V	
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VH	Domaine variable des chaînes lourdes
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VL	Domaine variable des chaînes légères

Z

ZAP-70	Zeta chain-associated protein 70
ZM	Zone marginale
β2M	β-2 microglobuline

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. Les lymphocytes B : Origine et développement	1
1. Ontogenèse des lymphocytes B	1
a. <i>La lymphopoïèse, le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse</i>	2
b. <i>L'immunopoïèse, phase d'activation du lymphocyte B</i>	4
c. <i>La voie de signalisation du BCR dans l'activation des cellules B</i>	8
2. Contextes pathologiques : altérations de l'ontogenèse	10
a. <i>Les altérations conduisant aux pathologies auto-immunes</i>	10
b. <i>Les altérations conduisant aux lymphomes et leucémies chroniques</i>	11
3. Les différentes fonctions des lymphocytes B	13
a. <i>Des cellules productrices d'anticorps</i>	14
b. <i>Des cellules présentatrices d'antigène</i>	14
c. <i>Production de cytokines</i>	15
II. Les lymphocytes B régulateurs	18
1. Les différentes cellules régulatrices du système immunitaire.....	18
a. <i>Les lymphocytes T régulateurs</i>	18
b. <i>Autres cellules régulatrices</i>	21
2. Les lymphocytes B régulateurs.....	21
a. <i>Mise en évidence des lymphocytes B régulateurs</i>	21
b. <i>Induction des Bregs</i>	22
c. <i>L'immunosuppression par la sécrétion de protéines</i>	26
d. <i>Immuno-régulation par des interaction cellulaires</i>	29
3. Implications des cellules régulatrices dans les pathologies	31
a. <i>Lymphocytes B régulateurs dans les pathologies immunes</i>	32
b. <i>Lymphocytes B régulateurs dans les cancers</i>	33
III. La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)	34
1. Caractéristiques cliniques et biologiques.....	34
a. <i>Présentation Clinique</i>	34
b. <i>Facteurs pronostiques</i>	37
c. <i>Traitements de la LLC</i>	39
2. Les lymphocytes B dans la LLC	41
a. <i>Origine cellulaire de la LLC</i>	41
b. <i>Fonction du BCR dans la LLC</i>	42
c. <i>Les facteurs anti-apoptotiques dans la LLC</i>	45
3. La LLC : une pathologie hétérogène	46
a. <i>L'hétérogénéité inter-patients</i>	46
b. <i>L'hétérogénéité intra-patients</i>	49
IV. Les interleukines 6 et 10, facteurs clés de l'immunorégulation	50
1. Implications physiopathologiques de cytokines pro- ou anti- inflammatoires	50
a. <i>Une cytokine pro-inflammatoire : l'IL-6</i>	50
b. <i>Une cytokine anti-inflammatoire : l'IL-10</i>	55
c. <i>Un équilibre IL-6/ IL-10 ?</i>	58
2. Les facteurs et voies de signalisation activés	60
a. <i>Facteurs impliqués dans la régulation de ces cytokines</i>	60
b. <i>Voies activées par ces cytokines</i>	62
3. La voie JAK/STAT3 au centre de la régulation.....	63

a. <i>La voie JAK/STAT3</i>	64
b. <i>STAT3 dans les cancers</i>	70
c. <i>STAT3 dans la LLC</i>	71
OBJECTIFS	74
RÉSULTATS	76
I. Caractérisation de facteurs immunorégulateurs dans la LLC	77
Article 1.....	78
II. Régulation de l'IL-10 et de l'IL-6 dans la LLC et relevance physiopathologique	128
Article 2.....	129
III. Une signature cytokinique comparée à celle de cellules de SSc	157
Article 3.....	159
IV. FOXP3 impliqué dans la production d'IL-10 ?	172
CONCLUSIONS ET DISCUSSION	175
1. Une balance cytokinique en faveur de l'immunorégulation	176
2. Effets de l'IL-10 et l'IL-6 sur les cellules B de LLC: implication physiopathologique	182
3. Effet Autocrine ou Paracrine de l'IL-10 sur les cellules de LLC	186
4. Des cellules B exprimant Foxp3.....	188
Conclusion	190
RÉFÉRENCES	192

Table des figures et tableaux

Figure 1 : Développement et différenciation des lymphocytes B.....	1
Figure 2 : Réarrangement des Immunoglobulines.....	3
Figure 3 : Les différents types de réponses thymodépendantes ou non.....	5
Figure 4 : Réactions au sein des Centres Germinatifs.....	7
Figure 5 : Le BCR dans l'activation des lymphocytes B.....	8
Figure 6 : Signalisation du BCR et régulation.....	10
Figure 7 : Syndromes lymphoprolifératifs issus des différents stades de l'ontogénèse.....	12
Figure 8 : Les différentes fonctions des lymphocytes B.....	15
Figure 9 : Production de cytokines et régulation de la réponse immune par les lymphocytes B.....	17
Figure 10 : Principales fonctions des lymphocytes T régulateurs.....	20
Figure 11 : Modèle de développement des cellules B régulatrices.....	22
Figure 12 : Induction des cellules B régulatrices.....	26
Figure 13 : Bregs et immunosuppression par la production de cytokines.....	29
Figure 14 : Bregs et immunosuppression par contacts cellulaires.....	30
Figure 15 : Symptômes classiques de la Leucémie Lymphoïde chronique.....	36
Figure 16 : Origine cellulaire de la LLC.....	42
Figure 17 : La voie du BCR dans les LLC évolutives et indolentes.....	43
Figure 18 : La cellule de LLC et le microenvironnement.....	45
Figure 19 : Identification de 2 groupes de patients en fonction de la réponse à la stimulation du BCR.....	48
Figure 20 : L'IL-6, une cytokine aux multiples fonctions biologiques.....	51
Figure 21 : Signalisation classique ou trans-signalisation de l'IL6.....	52
Figure 22 : L'IL-10 et son récepteur.....	55
Figure 23 : IL-6 et IL-10 : Un facteur activé, deux types de réponses.....	59
Figure 24 : Voies impliquées dans la production de l'IL-6 et l'IL-10.....	62
Figure 25 : Voies de signalisation activées par l'IL-6 et l'IL-10.....	64
Figure 26 : Les différents domaines de la protéine STAT3.....	65
Figure 27 : Activation de STAT3.....	67
Figure 28 : Régulation de la voie JAKs/STAT3.....	69
Figure 29 : Activation de STAT3 dans les cellules B de LLC suite à l'activation du BCR et du CD40.....	173
Figure 30 : Un potentiel complexe STAT3-FOXP3.....	173
Figure 31 : Des Lymphocytes B de LLC aux propriétés régulatrices.....	179
Figure 32 : Une balance cytokinique en faveur de l'IL-10 dans la LLC.....	182
Figure 33 : Régulation autocrine de l'IL-10 en faveur de la survie, via STAT3.....	188
Figure 34 : Un complexe STAT3-FOXP3 dans la régulation de l'IL-10 ?.....	189
Figure 35 : L'IL-10 dans le maintien et la progression de la LLC.....	191
Tableau 1 : Familles de cytokines pouvant être produites par les lymphocytes B.....	15
Tableau 2 : Différentes populations de Bregs chez l'Homme et la Souris.....	31
Tableau 3 : Classifications de Rai et Binet.....	36
Tableau 4 : Anticorps utilisés dans les expériences de Co-Immuno-précipitation.....	130

INTRODUCTION

I. Les lymphocytes B : Origine et développement

Les lymphocytes B, acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative, représentent 10 à 15 % des lymphocytes circulants. Générées en continu dans la moelle osseuse sous forme de précurseurs, ces cellules ont de multiples fonctions telle que la production d'anticorps, la présentation d'antigène ou encore la sécrétion de cytokines qui leur permet de jouer un rôle dans l'immunorégulation. Ces fonctions sont acquises au cours de leur développement.

1. Ontogenèse des lymphocytes B

Au cours de l'ontogenèse, les lymphocytes B se différencient dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques, jusqu'au stade de cellules B immatures exprimant une immunoglobuline de surface capable de reconnaître l'antigène. Ces lymphocytes B immatures migrent ensuite, dans les organes lymphoïdes secondaires pour terminer leur différenciation. Ainsi, on peut séparer l'ontogénèse en deux principales étapes, la lymphopoïèse, une phase de différenciation et de maturation, indépendante de l'antigène, qui se déroule dans la moelle. Une seconde étape d'activation et de différenciation post-médullaire, l'immunopoïèse, dépendante de l'antigène s'effectue dans les organes lymphoïdes secondaires (**Figure 1**).

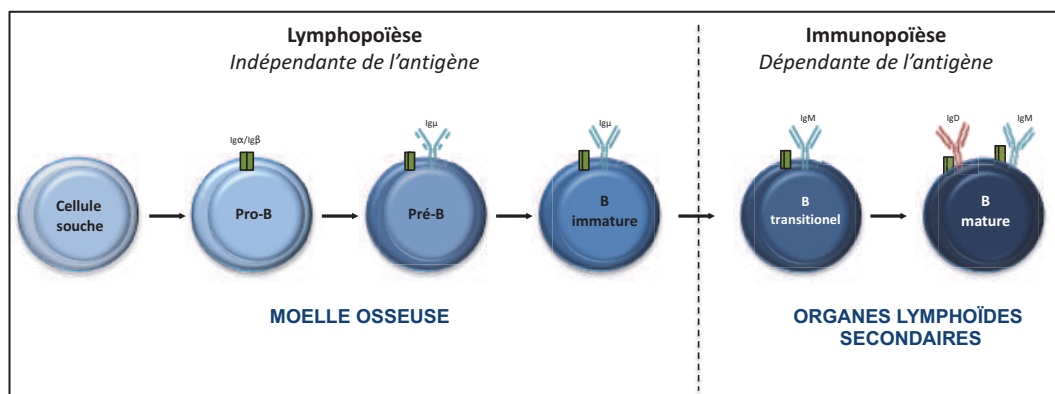


Figure 1 : Développement et différenciation des lymphocytes B

Le développement des lymphocytes B commence dans la moelle osseuse par la différenciation de progéniteurs lymphoïdes communs en Pro-B qui expriment un hétérodimère, formé de Igα et Igβ. Au stade Pré-B les cellules expriment la chaîne μ à partir de laquelle se forme un pré-BCR. Les cellules B immatures poursuivent leur développement dans les organes lymphoïdes secondaires, avec la différenciation en cellules B matures.

a. La lymphopoïèse, le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse

Dans la moelle osseuse, les progéniteurs lymphoïdes communs, issus des cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules pré-pro-B, les précurseurs les plus immatures de la lignée lymphoïde B. De ces pré-pro-B dérivent les cellules pro-B, sous le contrôle de facteurs de transcription tels que PU.1 et Ikaros (1).

❖ *Le stade Pro-B*

Ce stade est marqué par la mise en place des réarrangements des gènes qui codent les chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH). Ces réarrangements commencent par la jonction d'un segment D_H et d'un segment J_H au niveau du locus IGH (**Figure 2**). Le segment V_H s'assemble ensuite aux segments DJ_H réarrangés. Des segments $V_H D_H J_H$ sans codon stop et en phase de lecture correcte codent une région variable fonctionnelle et permettent la synthèse d'une chaîne lourde μ . Ce réarrangement se fait sur un premier chromosome et s'il n'est pas productif s'effectue au niveau du second chromosome. Ce mécanisme s'appelle l'exclusion allélique. Il repose sur l'inactivation des enzymes Rag-1 et Rag-2 (Recombinant Activating Gene) et permet d'obtenir un seul type de chaîne lourde ou de chaîne légère. L'expression de ces enzymes est induite et régulée par les cellules stromales de la moelle par l'intermédiaire de facteurs solubles tels que l'interleukine 7 (IL-7). Un réarrangement productif permet donc à la cellule pro-B de poursuivre sa maturation et de se différencier en cellule pré-B (2).

❖ *Le stade Pré-B*

Au stade pré-B, la chaîne lourde μ est exprimée à la membrane, en association à une pseudo-chaîne légère constituée de deux protéines $V_{\text{préB}}$ et $\lambda 5$ pour former le pré-BCR (Récepteur à l'antigène des cellules B). L'expression de ce récepteur permet aux cellules pré-B de recevoir des signaux de survie et de poursuivre leur maturation. Une première étape de sélection, la « sélection positive » se fait notamment grâce à un hétérodimère, formé par $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ (CD79a et b), associé à la chaîne μ , à la membrane. Ces molécules présentent des motifs intra-cytoplasmiques, ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) qui permettent la création d'une cascade de signalisation impliquée dans la survie et la prolifération.

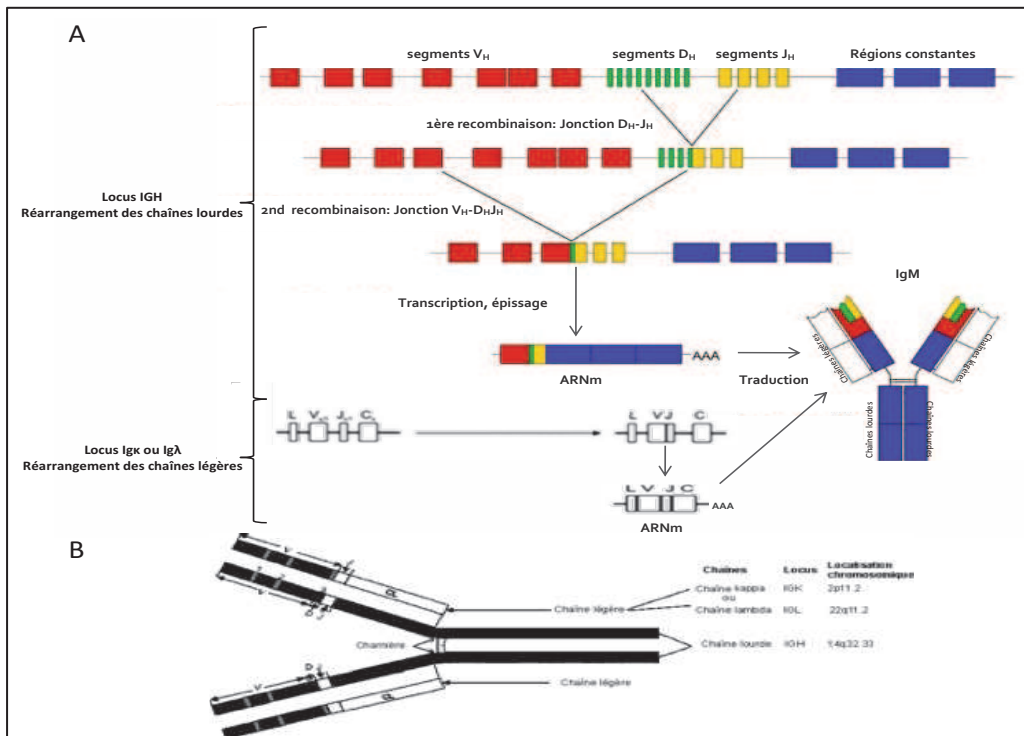


Figure 2 : Réarrangement des Immunoglobulines

A) Au stade pro-B, le réarrangement des gènes des Immunoglobulines commence par la recombinaison des segments $V_H D_H J_H$ au niveau du locus IGH qui permet la synthèse de chaînes lourdes. Il se poursuit au niveau du locus IGK ou IGL, au stade pré-B aboutissant à la production de chaînes légères.

B) Représentation schématique d'une immunoglobuline (Ig). Les chaînes L (légères) κ et λ sont formées de 2 domaines, un domaine variable (V) et un domaine constant (C). Les chaînes H (lourdes) comportent un domaine N-terminal variable (V_H) et 3 ou 4 domaines constants (CH). *Adapté de Janeway et al., 2002 (3).*

❖ Le stade B immature

Les enzymes Rag-1 et Rag-2 sont réexprimées à la fin du stade pro-B pour réaliser les réarrangements $V_L J_L$ des gènes de la chaînes légère κ , si celui-ci n'est pas productif, de la chaîne légère λ . Un réarrangement fonctionnel permet à la cellule d'exprimer une Immunoglobuline M (IgM) de surface, et l'acquisition d'une spécificité de reconnaissance de l'antigène. À ce stade, un processus de « sélection négative » permet d'éliminer les cellules auto-réactives, exprimant des IgM de surface, spécifiques des antigènes du soi (auto-antigènes). Cette sélection permet l'acquisition de la tolérance centrale dans laquelle, les cellules stromales de la moelle osseuse jouent un rôle clé. Elles expriment à leur surface, des peptides du soi qu'elles présentent aux cellules B par l'intermédiaire de molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Les cellules qui reconnaissent les antigènes du soi avec une forte affinité reçoivent des signaux de mort, on parle alors de délétion clonale.

Ces cellules peuvent également subir des mécanismes de réédition des récepteurs qui consistent en l'induction de nouveaux réarrangements des gènes des chaînes d'immunoglobulines. Au-delà d'un certain seuil d'affinité, les clones B auto-réactifs deviennent anergiques. Seules les cellules qui reconnaissent ces peptides avec une faible affinité poursuivent leur maturation. Ces premières étapes du développement se font sous la dépendance du microenvironnement et sont gouvernées par les signaux provenant des cellules stromales de la moelle osseuse. Les lymphocytes B expriment en effet différents récepteurs qui leur permettent de dialoguer avec les cellules du microenvironnement. Ces cellules régulent ainsi, la croissance, la maturation et la survie des cellules en développement via des contacts directs ou la production de facteurs solubles tels que les facteurs de croissance, les cytokines (IL-7, Stem Cell Factor (SCF)) ou les chimiokines (Stromal cell Derived factor (SDF-1)) (4).

b. L'immunopoïèse, phase d'activation du lymphocyte B

Les lymphocytes B immatures ayant quitté la moelle osseuse passent par un stade intermédiaire, le stade B transitionnel et subissent une sélection périphérique. Les cellules B matures qui survivent à cette sélection expriment une IgM et une IgD à leur surface et gagnent les organes lymphoïdes secondaires où elles se différencient en lymphocytes B folliculaires ou en lymphocytes B de la zone marginale.

❖ Différenciation post-médullaire des lymphocytes B

Les lymphocytes B matures se différencient en cellules B folliculaires conventionnelles, impliquées dans les réponses humorales dépendantes des lymphocytes T ou en lymphocytes B de la zone marginale (ZM), impliqués dans des réponses humorales thymo-indépendantes. Ces lymphocytes produisent des anticorps « naturels » polyréactifs, de faible affinité et occupent la première ligne de défense contre certains micro-organismes. On distingue deux types de lymphocytes, les B1 qui se développent dans les cavités pleurales et péritonéales et les lymphocytes B2 folliculaires de la zone marginale.

L'activation des lymphocytes B folliculaires par la rencontre avec un antigène entraîne leur différenciation en plasmocytes à courte durée de vie, des cellules productrices d'anticorps, exprimant CD38 et CD138 (**Figure 3**).

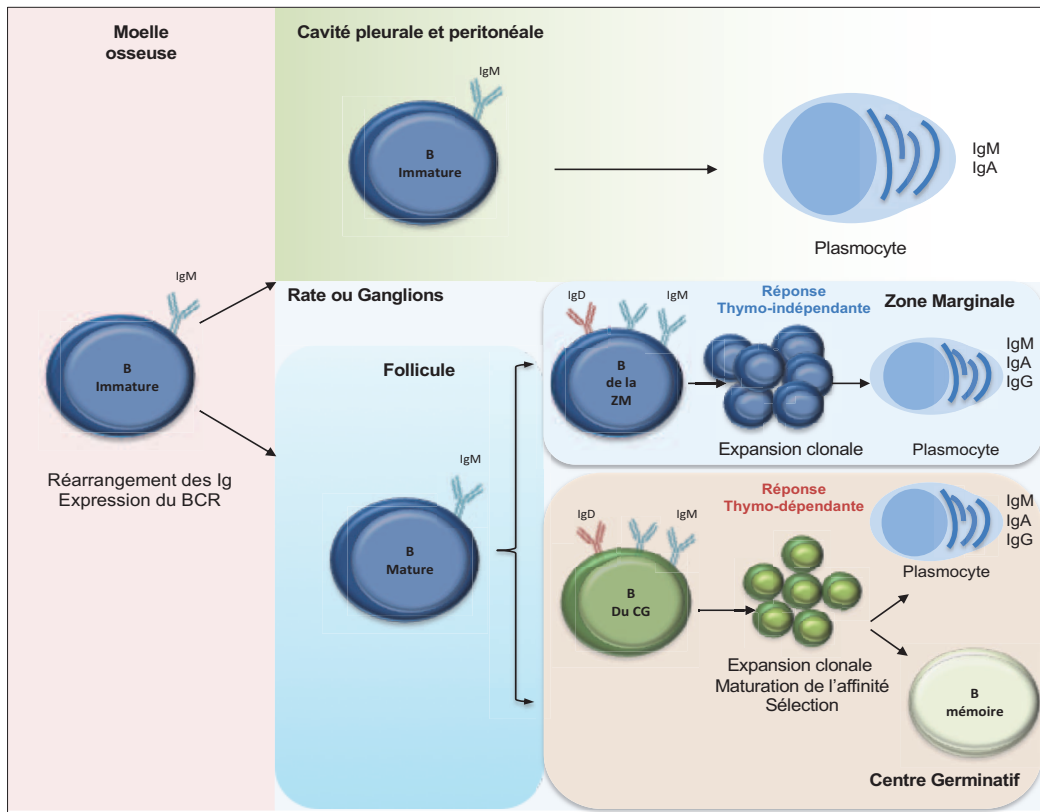


Figure 3 : Les différents types de réponses thymodépendantes ou non

Une population de « lymphocytes B1 », dont l'origine est mieux caractérisée chez la souris, se développe dans les cavités pleurales et péritonéales, à la différence des « B2 » qui se développent dans la rate ou les ganglions. La cellule B mature pourra rencontrer un antigène (Ag) dans la rate ou les ganglions, et se différencier en plasmocytes ou cellules B mémoires. Cette rencontre peut se faire de façon thymo-indépendante, au niveau de la zone marginale (ZM) ou thymo-dépendante entraînant la formation de centres germinatifs (CG) où se poursuit la différenciation *Inspiré de Rickert et al., 2013 (5)*.

Cette activation peut également entraîner la formation de centres germinatifs où les lymphocytes vont subir les processus d'hypermutations somatiques et de commutation de classes avant de se différencier en plasmocytes à longue durée de vie ou en cellules B mémoires. Ces dernières, capables de persister à l'état quiescent, sans proliférer, ont la capacité de répondre très rapidement à des pathogènes lors d'une seconde rencontre avec l'antigène avant de se différencier en plasmocytes.

❖ *Formation des centres germinatifs*

L'activation du lymphocyte B avec un antigène est suivie de la formation de structures particulières dans les organes lymphoïdes secondaires, les centres germinatifs (CG). Ces structures constituent un microenvironnement dynamique associé à l'expansion de cellules B spécifiques.

D'un point de vue micro-anatomique, les CG matures sont constitués de deux compartiments distincts, la zone sombre et la zone claire.

La zone sombre, correspond à une zone de prolifération, composée de centroblastes exprimant peu d'immunoglobulines à leur surface.

Ces lymphocytes B subissent une modulation de l'affinité de leurs immunoglobulines pour les antigènes via des processus d'hypermutations somatiques. Dans la zone claire, la prolifération des lymphocytes B alors appelés centrocytes et exprimant d'avantage d'immunoglobulines de classe M à leur surface est ralentie. La sélection des cellules à immunoglobulines de haute affinité se poursuit dans cette zone (6).

❖ *Les hypermutations somatiques*

Les hypermutations somatiques induites suite à la stimulation antigénique sont des modifications ciblées des régions variables des gènes d'immunoglobulines modulant l'affinité du BCR pour l'antigène. Des mutations ponctuelles sont introduites de manière aléatoire et peuvent être silencieuses, neutre, délétères ou positives. L'AID (Activation-Induced cytidine Deaminase »), une enzyme exprimée dans les centres germinatifs, est responsable de ces hypermutations somatiques. Les mutations délétères entraînent une diminution de l'affinité pour l'antigène alors que les mutations positives permettent d'augmenter cette affinité. Les cellules ayant une faible affinité pour l'antigène sont sélectionnées négativement et éliminées par apoptose.

Ce processus permet de sélectionner les lymphocytes B ayant une meilleure affinité pour l'antigène, afin d'obtenir suite à leur différenciation, des anticorps plus efficaces et des cellules mémoires plus spécifiques (7). Suite à cette sélection, les cellules B appelées centrocytes ayant fait pénétrer par endocytose l'antigène l'apprêtent et le présentent aux lymphocytes T helper folliculaires (Tfh) présents au sein de la zone claire. Cette présentation de l'antigène sous forme de peptides se fait via les molécules du CMH de classe II présentes à la surface des lymphocytes B. Des signaux de survie et de différenciation provenant de ces lymphocytes T helper folliculaires permettent aux lymphocytes B de poursuivre leur maturation qui passe notamment par la commutation de classe.

❖ *Commutation de classe et maturation terminale*

Si les régions variables des chaînes des immunoglobulines déterminent la spécificité à l'antigène, les régions constantes contrôlent les fonctions effectrices et varient selon les isotypes. Le changement d'isotype ou commutation de classe consiste au remplacement du locus de la région constante C de l'IgM par celui d'un autre isotype. Ainsi, selon le type de réponse immunitaire souhaité, la cellule exprime un isotype spécifique. Il existe 5 classes d'immunoglobulines les IgM et IgD, sont produites au cours de la réponse primaire alors que les IgG, IgE et IgA sont produites au cours des réponses secondaires (8). Les lymphocytes B, issus des centres germinatifs, où ils ont subi hypermutations somatiques et commutation de classe se différencient en plasmocytes d'un isotype spécifique ou en cellules B mémoire (**Figure 4**). Le développement et la sélection du répertoire des lymphocytes B passent par un ensemble de processus assurant l'acquisition d'une tolérance au soi. Malgré l'efficacité des mécanismes de tolérance centrale au stade de B immature, certains clones auto-réactifs peuvent gagner les organes périphériques.

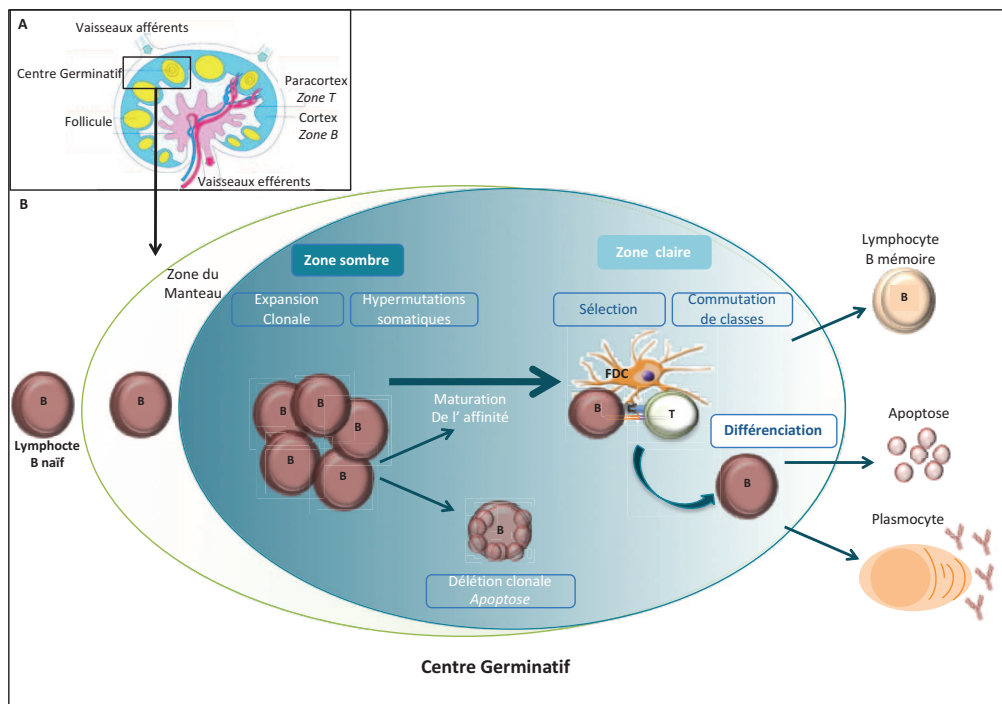


Figure 4 : Réactions au sein des Centres Germinatifs

A) Les centres germinatifs sont des structures retrouvées au niveau des ganglions lymphatiques.

B) La cellule B naïve, prolifère au sein de la zone sombre où elle subit les hypermutations somatiques et une sélection en fonction de l'affinité de son récepteur. Une fois dans la zone claire, le lymphocyte B rencontre l'antigène, en contact avec les cellules T et les cellules dendritiques folliculaires (FDC). Cette rencontre est suivie par les commutations de classes de ses Immunoglobulines, le lymphocyte B se différencie en plasmocyte ou cellule B mémoire.

Adapté de Katia Basso & Riccardo Dalla-Favera., 2015 (6).

La tolérance périphérique peut avoir lieu dans la rate au stade de B transitionnel où les cellules ayant une forte affinité pour le soi sont éliminées par anergie ou délétion clonale. Cette tolérance est également acquise au sein des centres germinatifs grâce aux mécanismes décrits précédemment.

c. La voie de signalisation du BCR dans l'activation des cellules B

L'activation du lymphocyte B se fait principalement à travers son récepteur à l'antigène, le BCR. La fixation d'un antigène au récepteur entraîne l'activation des chaînes de signalisation associées, CD79a et CD79b, phosphorylés sur les résidus tyrosine de leurs motifs ITAM. Cette phosphorylation se fait par des kinases, de la famille Src (Lyn, Fyn), associées au BCR et permet l'ancrage de molécules adaptatrices ainsi que le recrutement de molécules de signalisation comme SYK (Spleen Tyrosine Kinase) et BTK (Bruton Tyrosine Kinase). Ces molécules permettent la formation d'un complexe protéique autour du BCR, appelé le « signalosome ». Les protéines du signalosome vont conduire à l'activation de plusieurs effecteurs secondaires qui propagent un signal et activent à leur tour des facteurs de transcription impliqués dans des mécanismes tels que la prolifération et la survie des lymphocytes B (**Figure 5**).

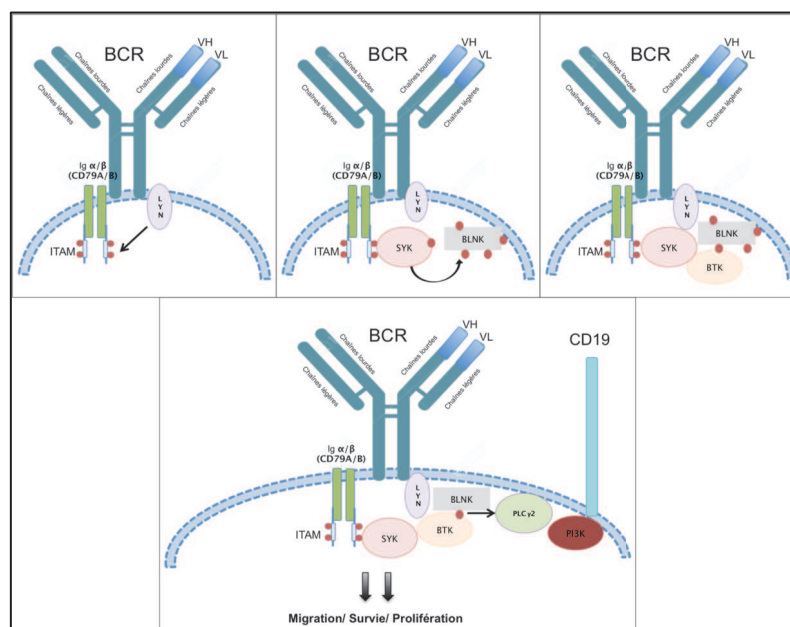


Figure 5 : Le BCR dans l'activation des lymphocytes B

CD19 : Co-récepteur ; VH : domaine variable des chaînes lourdes ; VL : domaine variable des chaînes légères ; BLNK : B-cell linker
PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PLC γ 2 : phospholipase C gamma 2.

Le recrutement et l'activation de la kinase SYK au niveau du signalosome est suivi du recrutement de protéines adaptatrice telles que BLNK (B cell linker) dont la phosphorylation permet l'ancrage des protéine BTK et PLC γ 2 (phospholipase C gamma 2).

Les kinases SYK et BTK activent alors la PLC γ 2, ce qui va conduire à l'activation des flux calciques et de la PKC (protéine kinase C) et à l'activation de facteurs comme NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), des facteurs ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinases), JNKs (c-Jun N terminal Kinase), p38 ou de NF- κ B (Nuclear factor- κ B). La kinase SYK entraîne également l'activation des MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase) via l'adaptateur VAV et l'activation de GTPases telles que Ras et Rac. Le signalosome comprend aussi des co-récepteurs activateurs comme le CD19. La phosphorylation de sa partie intracellulaire par LYN permet de recruter la kinase PI3K δ (phosphoinositide 3-kinase) à la membrane via sa sous-unité p85. Une fois activée par phosphorylation de la sous-unité p110, cette kinase phosphoryle PIP $_2$ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) et génère du PIP $_3$ (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) permettant ainsi le recrutement et l'activation des kinases BTK et AKT. Ces kinases jouent un rôle clé dans la survie activant des facteurs comme mTOR (mechanistic target of rapamycin) et NF- κ B.

Ainsi l'activation du BCR et de son signalosome conduit à l'activation de plusieurs voies et de facteurs impliqués dans la survie, la prolifération, la maturation et la migration du lymphocyte B (**Figure 6**). Cette activation est modulée par des phosphatases telles que PTPN22 (Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22) ou PTEN (Phosphatase and TENsin homolog). Les phosphatases SHP-1 (SH2 domain-containing phosphatase) et SHIP (SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase) sont recrutées et activées via les motifs ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) de co-récepteurs inhibiteurs comme le récepteur FC γ RIIB. D'autres signaux du microenvironnement cellulaire tels que les cytokines, les molécules du complément ou des molécules d'adhésion participent au contrôle des voies de signalisation activées par le BCR et sont impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation de lymphocyte B ([9](#), [10](#)).

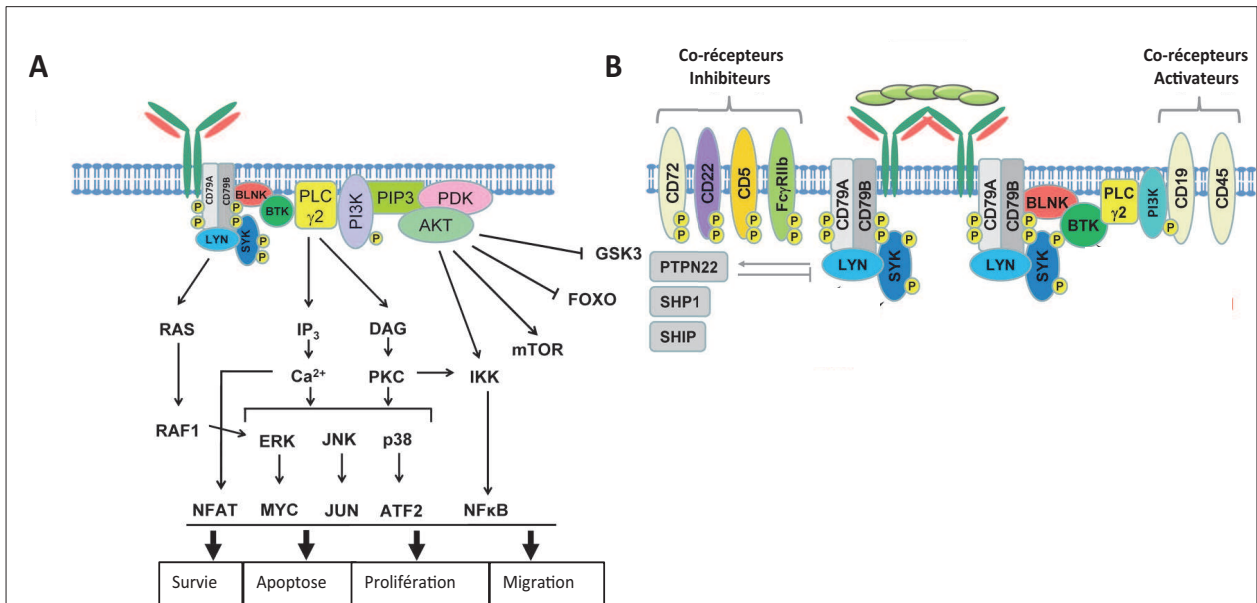


Figure 6 : Signalisation du BCR et régulation

A) Activation des voies de signalisations impliquées dans la survie, l'apoptose, la prolifération et la migration par le BCR et son signalosome.

B) Des co-récepteurs activateurs ou inhibiteurs associés au BCR modulent l'activation des protéines du signalosome. Adapté de Stevenson et al., 2011 (9, 10).

2. Contextes pathologiques : altérations de l'ontogenèse

a. Les altérations conduisant aux pathologies auto-immunes

❖ Rupture de la tolérance centrale et périphérique

Des altérations de la tolérance peuvent être observées dès les premiers stades de développement des cellules B. Dans des pathologies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (LES) ou la polyarthrite rhumatoïde (PR) on retrouve une fréquence importante de lymphocytes B auto-réactifs naïfs. La présence de ces cellules témoigne d'un défaut dans les processus de tolérance (11, 12). Ces anomalies de la tolérance peuvent être la résultante d'altérations de la signalisation du BCR. Des mutations de BTK ou de la phosphatase PTPN22 ont été associées à une augmentation de l'auto-réactivité des lymphocytes B et ont été retrouvées dans des pathologies comme les LES, le diabète de type I ou la PR.

La sélection négative des lymphocytes B exprimant des récepteurs auto-réactifs peut également être altérée. Ainsi ces lymphocytes sont sélectionnés positivement, survivent et poursuivent leur maturation.

Dans un contexte physiologique, les cellules B auto-réactives et anergiques montrent une diminution des niveaux du récepteur de BAFF (TNF-family member B-cell activating factor), un facteur exprimé par les cellules stromales et donnant un avantage de survie aux cellules B non auto-réactives (13). Une augmentation de l'expression de BAFF, a été retrouvée dans le sérum de patients de LES, PR et du syndrome de Sjögren (14).

❖ **Lymphocytes auto-réactifs et Auto-antigènes**

Suite à la reconnaissance de protéines du soi (auto-antigènes), les lymphocytes dits « auto-réactifs » sont capables de les apprêter et de les présenter sous forme de peptides aux lymphocytes T. Des niveaux élevés d'auto-anticorps ont en effet été retrouvés dans le sérum de patients LES et PR. Dans la LES, les auto-anticorps Ig de forte affinité, dirigés contre les antigènes nucléaires ANAs entraînent la formation de complexes immuns responsables d'une réponse inflammatoire et entraînant de multiples lésions tissulaires (15).

b. Les altérations conduisant aux lymphomes et leucémies chroniques

Des dérégulations dans le développement des cellules B se reflètent par l'expansion de clones dominants, qui conduit au développement de syndromes lymphoprolifératifs.

Une survie et une prolifération incontrôlées pouvant résulter d'altérations des voies de signalisation du pré-BCR des lymphocytes B immatures peuvent conduire au développement de leucémies aiguës. Ce type de transformation est notamment retrouvé dans la Leucémie Aigüe Lymphoblastique B (LAL-B) (16). Une différenciation non contrôlée au niveau des organes lymphoïdes secondaires des lymphocytes B matures peut quant à elle être à l'origine de lymphomes et leucémies chroniques. Certaines pathologies trouvent leurs origines dans les follicules primaires, la zone marginale ou le manteau. En effet, les cellules B CD5⁺ de la zone marginale et du manteau, peuvent être à l'origine de pathologies telles que, la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC), sous une forme non mutée, ou le Lymphome à Cellules du Manteau (LCM), (17, 18). Une fois dans les centres germinatifs, la maturation des lymphocytes B passe par des processus d'hypermutations somatiques et de commutation de classe.

Ces évènements font des centres germinatifs, un site préférentiel pour le développement de syndromes lymphoprolifératifs (19) (Figure 7).

❖ Les transformations malignes au cours du développement

Les translocations chromosomiques impliquant des proto-oncogènes et les régions promotrices des gènes des immunoglobulines ont été décrites dans de nombreux lymphomes. Certaines de ces translocations provoquent des points de cassures au niveau des gènes des segments J_H ou D_H et sont souvent la conséquence d'une altération des réarrangements des gènes des immunoglobulines dans la moelle osseuse. C'est le cas du lymphome à cellule du manteau (LCM) qui se caractérise par une translocation $t(11,14)$ qui juxtapose le locus de $BCL1$ au gène des Ig associée à la dérégulation du gène de la Cycline D1 (20). Les mécanismes d'hypermutations peuvent aussi engendrer des mutations au niveau d'autres gènes. Des mutations d'oncogènes tels que $TP53$ décrites dans la LLC ou dans les lymphomes de Burkitt (21).

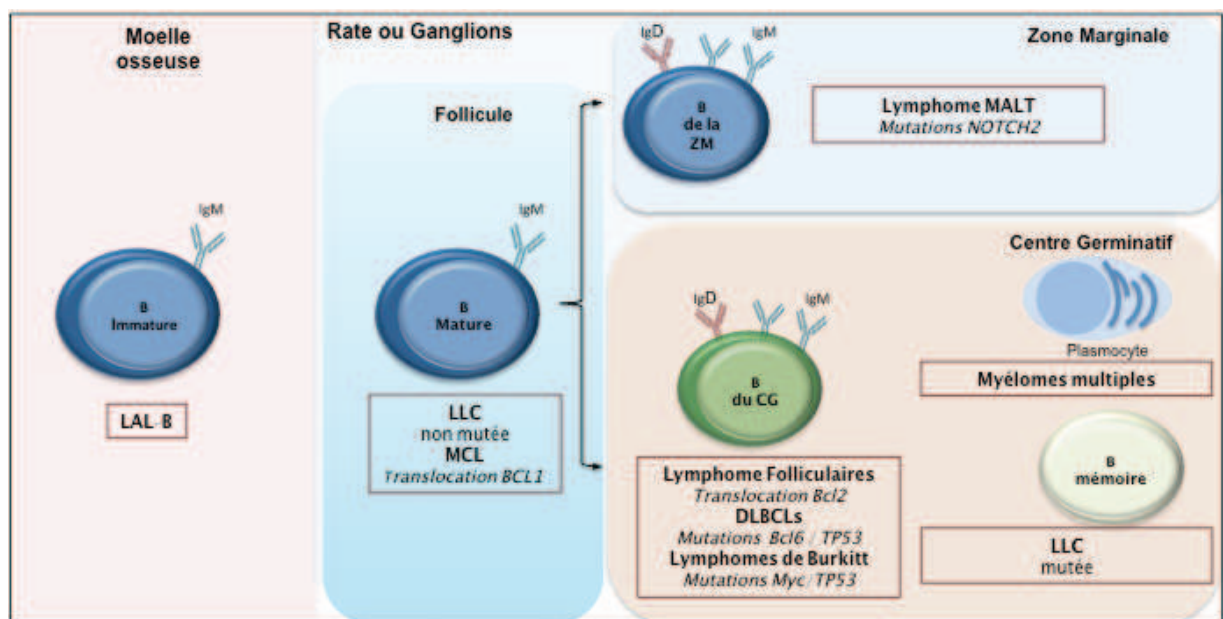


Figure 7 : Syndromes lymphoprolifératifs issus des différents stades de l'ontogénèse

Lymphomes et leucémies se caractérisent par des mutations et translocations qui peuvent apparaître aux différents stades de développement des lymphocytes B.

LAL-B: Leucémie Aigüe Lymphoblastique ; LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique ; LCM : Lymphomes à cellules du Manteau ; LBDGC : Lymphome Diffus grandes cellules ; MALT : Lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses de la ZM.

Adapté de Rickert, et al., 2013 (5).

❖ Le BCR dans le développement de syndromes lymphoprolifératifs

Malgré toutes ces altérations génétiques au niveau des gènes des immunoglobulines, les cellules malignes expriment toujours un BCR. La perte de son expression est retrouvée

dans très peu de lymphomes comme les lymphomes classiques d'Hodgkins. Ainsi, de la même façon que pour les cellules B normales, le BCR apportent des signaux essentiels à la survie et à la prolifération des cellules B de lymphomes. L'activation du BCR entraîne le recrutement des kinases des familles SRC et SYK qui initient l'activation de nombreuses voies de signalisations. Des approches génomiques, ont permis de mieux comprendre l'origine des altérations des voies de signalisations du BCR dans les lymphomes (22).

Certaines kinases comme SYK et LYN sont fortement exprimées ou activées dans des pathologies comme la LLC (23). Ces kinases permettent l'activation de la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase) / AKT qui se trouve ainsi dérégulée. L'activation dérégulée de cette kinase peut être liée à un défaut d'expression ou de fonction de la phosphatase PTEN (Phosphatase and tensin homologue) comme cela a été décrit dans les LCM (24). De nouvelles études suggèrent l'implication de facteurs épigénétiques à l'origine d'importantes altérations du développement. L'implication des miRNAs a également été rapportée dans les leucémies, comme la délétion des miR-15 et miR-16 dans les cellules de LLC, modulant leur transformation (25).

Le développement et la maturation des lymphocytes B passent donc par des étapes contrôlées et régulées permettant à ces cellules d'acquérir leurs fonctions. Comme nous avons pu le voir, une dérégulation d'une ou plusieurs étapes de ce développement peut conduire à des pathologies de déficience immunitaires, inflammatoires, auto-immunes ou encore lymphoprolifératives.

3. Les différentes fonctions des lymphocytes B

Les cellules B ont longtemps été considérées comme étant essentiellement, des cellules effectrices, productrices d'anticorps. Les lymphocytes B ont néanmoins plusieurs fonctions leur permettant d'assurer une immunité humorale et un maintien de l'organisation lymphoïde.

a. Des cellules productrices d'anticorps

L'activation de ces lymphocytes B suite à la reconnaissance d'un antigène par le BCR entraîne leur expansion clonale, et leur différenciation en plasmocytes ou en cellules mémoires. Les plasmocytes (CD138⁺), produisent et sécrètent les anticorps spécifiques de l'antigène à l'origine de l'activation conduisant ainsi, à la formation de complexes immuns. Ces complexes vont alors neutraliser les antigènes en faisant notamment intervenir les protéines du complément. Les cellules B mémoires, ayant une durée de vie plus longue que les plasmocytes réagissent de manière plus rapide, en cas de nouveau contact avec le même antigène. La production d'anticorps peut être essentielle dans la réponse immune anti-tumorale et limiter le développement de cancers (26). Des thérapies basées sur cette fonction sont de plus en plus utilisées en association avec les chimiothérapies conventionnelles.

b. Des cellules présentatrices d'antigène

Rapidement après la reconnaissance d'un antigène par le BCR, le lymphocyte B activé est capable d'internaliser cet antigène et de l'apprêter afin d'en présenter des peptides aux lymphocytes T. Cette présentation se fait via les molécules de CMH de classe II exprimées à la surface des cellules B. Le peptide reconnu par le récepteur des lymphocytes T (TCR) se retrouve au centre de l'interaction entre la cellule B présentatrice d'antigène et le lymphocyte T. Cette interaction est complétée par l'expression de molécules de co-stimulation. Sur le lymphocyte B, l'expression de CD80/CD86 permet la liaison au CD28 des cellules T. Ce second signal favorise l'activation des lymphocytes T qui expriment alors le ligand du CD40, présent à la surface des cellules B (CD40L) (27). La présentation antigénique par les lymphocytes B est précoce et avant même l'intervention de cellules dendritiques, considérées comme des cellules spécialisées dans la présentation antigénique. Ainsi les lymphocytes B pourraient non seulement initier une réponse immune mais aussi auto-immune (**Figure 8**).

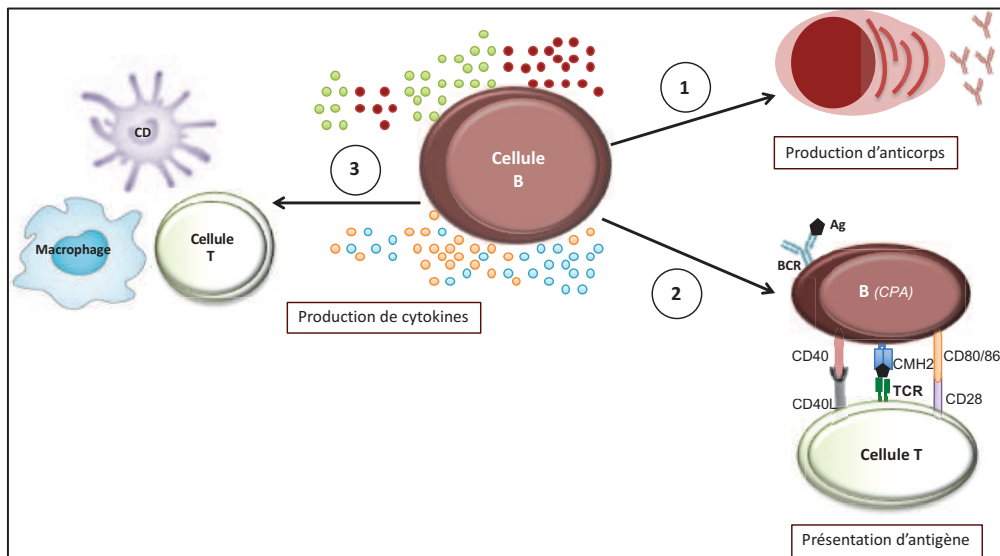


Figure 8: Les différentes fonctions des lymphocytes B

L'antigène présenté par les cellules environnantes comme les cellules folliculaires dendritiques (FDC) est reconnu par le lymphocyte B via son BCR. La cellule B va alors le présenter via son CMH de type II, au récepteur des lymphocytes T CD4⁺ (TCR). L'activation de cette cellule et le maintien de cette synapse se fait grâce aux différentes protéines de co-stimulations exprimées par ces deux cellules.

c. Production de cytokines

Les lymphocytes B ne se définissent pas seulement par la production d'anticorps ou la présentation d'antigène. Ces cellules dialoguent avec les cellules environnantes et régulent les réponses immunitaires durant les infections, les inflammations et les réponses auto-immunes. Ce dialogue fait intervenir des messagers solubles dont les cytokines. Les cytokines (8 à 80 kDa) agissent de manière autocrine ou paracrine. Elles appartiennent au réseau de signalisation extracellulaire qui contrôle les réponses immunitaires innées et spécifiques. Produites par de nombreux types cellulaires dont les lymphocytes B, ces facteurs peuvent être pro-inflammatoires, anti-inflammatoires (immunosuppresseurs), avec des propriétés d'attraction (chimiokines) ou de facteurs de croissance hématopoïétiques (28) (Tableau 1).

Noms	Exemples
Pro-inflammatoires	IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, TNF α , IFN α , IFN γ
Immunosuppressives	IL-4, IL-10, TGF β , IL-35
Chimiokines	CCL3, CCL4, CCL5, CLL17, CCL22
Facteurs de Croissance	GM-CSF, SCF, G-CSF

Tableau 1 : Familles de cytokines pouvant être produites par les lymphocytes B

IL: Interleukin, TNF: Tumor Necrosis factor, IFN: Interferon, TGF: Tumor Growth Factor, CCL: C-C Motif Ligand, G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor, GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, SCF: Stem Cell Factor.

❖ Les cytokines dans la régulation de la réponse immune

À travers la production de cytokines, les lymphocytes B modulent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes T auxiliaires (helpers), de types Th1, Th2 ou Th17, eux-mêmes impliqués dans différentes réponses immunes et ayant des profils de sécrétions cytokiniques et des fonctions différentes (29). La production d'IL-6 par les lymphocytes B au cours des infections virales ou pendant des réponses de types auto-immunes comme dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) induit des réponses de types Th1 et Th17 (30). La production d'IL-10 en revanche, joue un rôle suppresseur, inhibe les réponses de types Th1, Th2 ou Th17 et diminue les symptômes des modèles murins de EAE, de polyarthrite (31) ou d'arthrite induite au collagène (32). Les lymphocytes B exercent également, via cette production de cytokines, une fonction régulatrice sur les autres cellules de l'immunité. La maturation, le recrutement ou l'activation des cellules dendritiques, des macrophages et des cellules NK (Natural Killers) sont induits ou réprimés en fonction des cytokines sécrétées (**Figure 9**).

❖ Implication dans les pathologies

De nombreux modèles de pathologies auto-immunes ont permis de démontrer l'importante implication des cellules B par la production de cytokines. La déplétion en lymphocytes B, dans des modèles de sclérose en plaque, par un traitement au rituximab (anti-CD20) montre une diminution des symptômes qui n'est pas associée à la diminution d'auto-anticorps dans le sérum mais plutôt associée à la diminution des niveaux d'IL-6. Ceci montre l'importante implication des cytokines produites par les cellules B dans le développement de la pathologie (33). Si les pathologies auto-immunes se caractérisent notamment par d'importantes productions de cytokines pro-inflammatoires par les cellules B conduisant à des dommages tissulaires, on y observe une faible production d'IL-10. Cette cytokine joue plutôt un rôle protecteur comme cela a pu être montré dans un modèle murin de LES. Le transfert de cellules CD1d^{hi}CD5⁺ productrices d'IL-10 dans des souris NZB/NZH déficientes en CD19 a permis d'augmenter la survie de ces dernières (34). La pathogénèse des maladies auto-immunes est donc, à la fois associée mais peut aussi être altérée par l'équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives produites par les lymphocytes B.

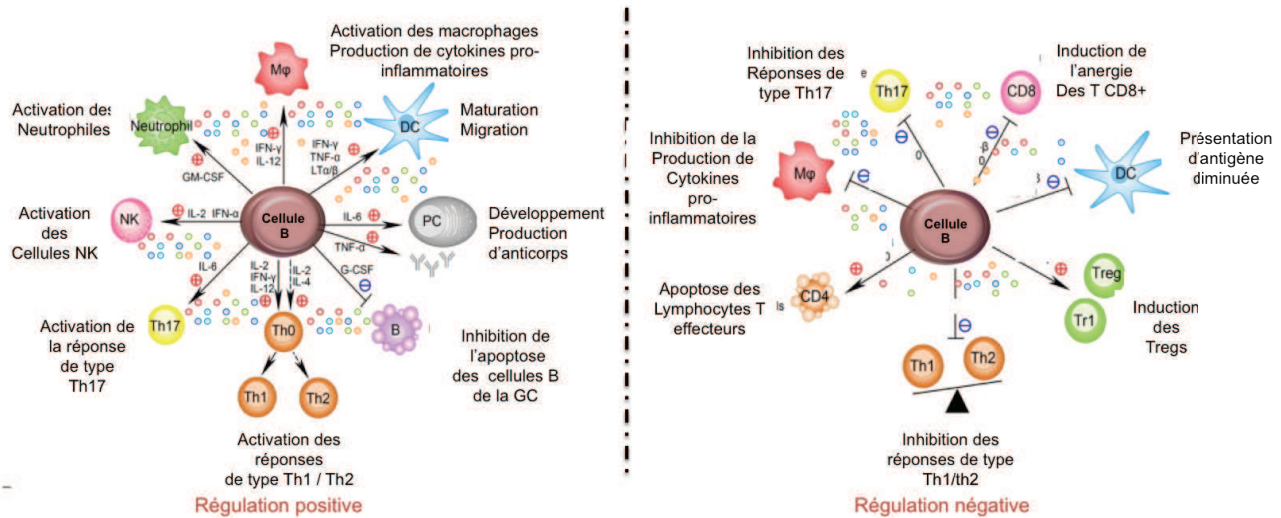


Figure 9: Production de cytokines et régulation de la réponse immune par les lymphocytes B

Régulation positive de la réponse immune par la cellule B via la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF α , IFN γ , LT $\alpha\beta$, G-CSF et GM-CSF. Régulation négative de la réponse immune par la cellule B via la production de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 et TGF- β 1. M ϕ : Macrophages, DC: Cellule Dendritique, PC: Plasmocyte, NK: Natural Killer, B: Lymphocyte B, Th: T helpers, Tr: T régulateurs.

Adapté de Rosser et al., 2015. (35)

L'IL-10 a également été impliqué dans les pathologies cancéreuses. La production de cette cytokine entraîne la diminution de production d'IFN γ (Interferon γ) par les lymphocytes T cytotoxiques CD8 $^+$ et les NK et l'inhibition de la réponse anti-tumorale (36). Les cytokines telles que l'IL-10 et le TGF β 1 (Transforming Growth Factor beta) ont été largement impliquées dans la suppression de la réponse immune anti-tumorale et participe au développement de cancers (37).

❖ Une production dépendante du microenvironnement

Les sécrétions des cellules B dépendent de leur origine, de leur stade de différenciation et de leur activation. Les Th2, par la production de cytokines telle que l'IL-4 vont induire la différenciation des cellules B en cellules productrices de cytokines. Ainsi, en réponse aux cytokines produites pas les Th1 ou les Th2, les lymphocytes B se différencient en lymphocytes effecteurs de type Be1 ou Be2, ayant des profils cytokiniques différents (29). Selon les signaux qu'elles reçoivent, les cellules B vont ainsi produire différents types de cytokines tels que l'IL-10, principale cytokine produite par les lymphocytes régulateurs.

II. Les lymphocytes B régulateurs

Le rôle du système immunitaire est de protéger l'organisme contre les agents pathogènes sans créer de lésions. Des mécanismes de contrôle permettent d'éviter les réponses inadaptées. Dans le premier chapitre, nous avons brièvement décrit les mécanismes de tolérance centrale et périphérique qui participent à ce contrôle. Une réponse immunitaire physiologique repose donc sur un équilibre entre l'activation des lymphocytes et la production de facteurs régulateurs qui bloquent ou freinent la réponse générée. Parmi ces facteurs, nous avons vu que les cytokines pouvaient réguler positivement ou négativement cette réponse immune. Ce chapitre portera particulièrement sur les populations de lymphocytes B régulateurs, les Bregs, capables d'immunosuppression.

1. Les différentes cellules régulatrices du système immunitaire

a. Les lymphocytes T régulateurs

❖ Découverte et origine

Des cellules thymiques suppressives, limitant la réponse immunitaire sont décrites dès les années 70 grâce aux expériences de Gershon et Kondo (38). Ce n'est en revanche qu'en 1995 que la notion de lymphocytes T régulateurs (Tregs) est abordée par Sakaguchi (39). Il décrit chez la souris, une sous population de lymphocytes T $CD4^+CD25^+$, capables de limiter la réponse immunitaire et ayant un rôle important dans la tolérance périphérique.

Cette population également décrite chez l'homme, représente 5 à 10 % des lymphocytes T $CD4^+$ présents à la périphérie. Dans les années 2000, le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3) est décrit comme jouant un rôle clé dans le développement et la fonction suppressive des Tregs. Ce facteur de transcription a été identifié comme étant un marqueur spécifique des Tregs (40).

❖ Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des Tregs

Les Tregs présents en périphérie peuvent avoir différentes origines. Ainsi on distingue deux sous-populations de Tregs (41). Les Tregs naturels (nTregs) générés dans le thymus au cours de l'ontogénèse.

Ces cellules expriment des récepteurs (TCR) spécifiques des antigènes du soi, mais réussissent à échapper aux mécanismes de sélection négative. L'expression du CD25 joue un rôle clé dans le maintien de ces cellules et leur permet d'exprimer le facteur Foxp3 (42). Une autre sous population de Tregs se développe après stimulation antigénique des lymphocytes T conventionnels CD4⁺CD25⁻ dans un microenvironnement riche en IL-2 et en TGFβ1 induisant leur conversion en lymphocytes T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. On parle alors de Tregs induits (iTregs) (43). Ces cellules jouent un rôle dans la tolérance aux antigènes microbiens ou alimentaires. Elles régulent les réponses inflammatoires et l'activité des lymphocytes T effecteurs dans un contexte d'auto-immunité. Leur action s'exerce via la production de cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-10 et le TGF-β1. Alors que les nTregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), agissent surtout par contact direct avec leurs cellules cibles, les iTregs produisent soit de l'IL-10 et sont appelés Tr1 (CD4⁺CD25^{low}Foxp3⁺), ou du TGFβ1 et sont appelés Tr3 (CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺). De nombreuses études évoquent une hétérogénéité fonctionnelle et une spécialisation des Tregs en fonction de l'environnement dans lequel les cellules doivent agir (44).

❖ Cibles et mode d'action des Tregs

Ces cellules T vont agir en créant un micro-environnement inhibiteur de la prolifération des cellules effectrices, en modulant leur tolérance aux antigènes ou en entraînant leur apoptose. Ces mécanismes opèrent via la production de molécules immunorégulatrices comme l'IL-10 le TGFβ1 ou le Granzyme B, et l'expression de certaines molécules de surfaces (**Figure 10**). Les Tregs activés vont agir à différents niveaux, en inhibant la prolifération les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et l'activation des réponses humorales et cytotoxiques. Les Tregs vont également supprimer ces réponses en agissant sur d'autres types cellulaires, dont les cellules NKs, les cellules présentatrices d'antigène, parmi elles, les cellules dendritiques, les lymphocytes B ou les macrophages.

De multiples mécanismes impliquant, ou non, un contact cellulaire ont été décrits comme pouvant intervenir dans l'action suppressive des Tregs. L'expression constitutive du récepteur de l'IL-2 (CD25) à la surface des Tregs, leur permet d'appauvrir le microenvironnement en IL-2, bloquant ainsi la prolifération et la survie des autres cellules. L'expression du CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocytes Antigen 4) sur ces cellules va transmettre un signal inhibiteur et jouer un rôle important dans l'immunosuppression en interagissant avec le CD80/CD86 exprimé à la surface des cellules dendritiques ou des lymphocytes B. Cette interaction induit également la production d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui est toxique pour la cellule. Ces cellules expriment également d'autres marqueurs, impliqués dans l'apoptose comme PD-1 (Programmed cell Death 1) ou CD95 (45). La diversité des mécanismes de suppression et des cellules ciblées montre que la régulation et la suppression de la réponse immunitaire met en jeu bien plus qu'un acteur cellulaire précis.

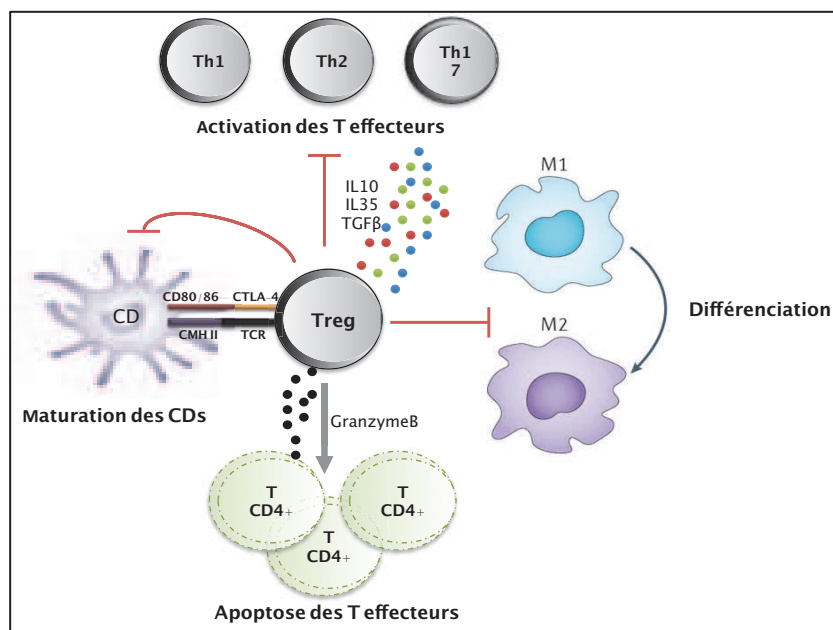


Figure 10: Principales fonctions des lymphocytes T régulateurs

Les Lymphocytes T régulateurs (Tregs) inhibent la maturation des cellules dendritiques (CD) et la différenciation des macrophages M1 en M2. Par la sécrétion de cytokines les Tregs vont inhiber l'activation des lymphocytes T auxiliaires (Th1, Th2 et Th17). La production de granzyme leur permet d'entraîner l'apoptose des lymphocytes T effecteurs (CD4+).

b. Autres cellules régulatrices

En plus des lymphocytes T, d'autres types cellulaires montrent des propriétés régulatrices. Ces cellules décrites dans des contextes d'auto-immunité, de transplantation ou de pathologies chroniques jouent un rôle clé dans le maintien de la tolérance.

Les cellules dendritiques régulatrices qui préservent leur rôle de cellules présentatrices d'antigène diminuent l'expression des molécules de co-stimulation (CD80/CD86/CD40) et la production de facteurs pro-inflammatoires. À l'inverse, elles induisent l'expression des cytokines immunorégulatrices (TGF β 1, IL-10) et l'expression de molécules inhibitrices (PD1, CD95L) pour bloquer l'activation des cellules T effectrices. Si les macrophages M1 produisent des cytokines pro-inflammatoires, les macrophages M2 ont des fonctions immunorégulatrices et anti-inflammatoires passant par la production d'IL-10 ou la suppression des lymphocytes T en bloquant leur prolifération. Enfin, d'autres cellules comme les cellules myéloïdes et stromales ont également été décrites pour leurs rôles immunosuppresseurs (46). En plus de toutes ces cellules, des lymphocytes B, capables de produire des cytokines ont montrés d'importantes propriétés régulatrices.

2. Les lymphocytes B régulateurs

a. Mise en évidence des lymphocytes B régulateurs

Dès les années 70, un caractère immunosuppresseur des cellules B est évoqué. En effet, après transfert de lymphocytes B activés, une induction de la tolérance est observée dans des modèles murins (47). En revanche ce n'est que 20 ans plus tard que le rôle immunorégulateur de ces cellules B est démontré. Une étude menée avec un modèle de souris atteintes d'Encéphalite Auto-immune Evolutive (EAE) a montré que ces souris, déficientes en lymphocytes B présentaient une rémission moins efficace que des souris sauvages (48). Les années suivantes, une série d'approches expérimentales a mis en évidence des populations de cellules B produisant de l'IL-10 et exerçant une fonction d'immunorégulation. Des souris présentant des lymphocytes B déficients en IL-10 ont une réaction inflammatoire de type Th1, persistante, associée à l'EAE. L'apport de la cytokine dans ce modèle ainsi que dans celui de colite ou d'arthrite induites au collagène permet de diminuer l'inflammation (31, 32). C'est en 2002 que l'équipe de Mizoguchi a introduit le terme de B régulateurs (Bregs), rapportant l'existence d'une population de cellules CD1d^{hi} productrices d'IL-10. La cytokine devient alors un marqueur de ces cellules.

Depuis, plusieurs populations de Bregs ont depuis été identifiées chez la souris, puis chez l'Homme (49). Ces populations de cellules B régulatrices possèdent des phénotypes différents mais également des modes d'action bien distincts.

La population de lymphocyte B1, chez la souris évoquée dans le premier chapitre, est constituée de cellules B péritonéales (B1-a et B1-b) qui se distinguent par leur expression du marqueur CD5 à la membrane. Des cellules B régulatrices appelées B10 exprimant le CD5 et produisant l'IL-10, seraient issues des cellules B1-a alors que d'autres Bregs dériveraient de lymphocytes B de la zone marginale, de B immatures ou encore de plasmocytes. Plusieurs modèles de développement des Bregs ont été proposés (Figure 11). L'établissement d'un phénotype précis propre aux Bregs est ainsi complexe et plusieurs populations de Bregs aux phénotypes différents ont été caractérisées Mauri (50) (Tableau 2).

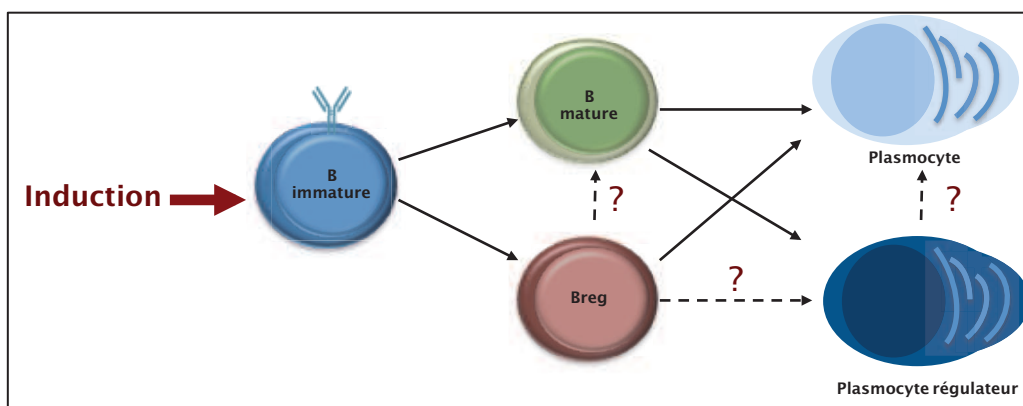


Figure 11: Modèle de développement des cellules B régulatrices.

En réponse à diverses stimulations, les cellules B immatures peuvent se différencier en lymphocytes B matures ou en lymphocytes B régulateurs. *Inspiré de Rosser et al, 2015 (35)*

b. Induction des Bregs

Plusieurs facteurs peuvent conduire à l'acquisition de capacités régulatrices par les lymphocytes B. L'activation de ces cellules peut être associée à la présence de différents facteurs présents dans l'environnement (Figure 12).

❖ Activation par le BCR

Le BCR activé par la reconnaissance d'un antigène spécifique peut participer à l'induction des fonctions régulatrices des lymphocytes B. L'importance du BCR a été décrite dans des modèles murins chimériques d'EAE et d'arthrite induite au collagène (31, 32). Dans un modèle d'encéphalite auto-immune, les souris déficientes pour le CD19, nécessaire au signal généré au niveau du BCR, montrent une incapacité à induire les Bregs associée à une aggravation de la pathologie (51). L'activation du BCR et du CD19 conduit à l'activation de la PLC γ 2 permettant le maintien d'un signal calcique important pour réguler la production d'IL-10 (52).

Le maintien de ce signal se fait sous la dépendance des molécules STIM (Stromale Interaction Molecules). Des souris déficientes pour STIM ont une production diminuée d'IL-10 par leurs lymphocytes B (53). Selon Yanaba et al., la production d'IL-10 par les lymphocytes B suite à la stimulation du BCR n'est pas aussi importante que celle induite lors de la stimulation du BCR associée à celle du CD40 et des TLRs (Récepteurs Toll Like) (54). L'équipe de S.Fillatreau a d'ailleurs proposé un modèle d'induction constitué d'une phase d'activation des TLRs, pour la production d'IL-10, suivi d'une phase d'engagement du BCR et du CD40 pour la survie et l'expansion des lymphocytes (55).

❖ L'engagement du CD40

Le CD40 est une protéine membranaire de co-stimulation exprimée à la surface des cellules B. Activée par le CD40 ligand (CD40L), présent à la surface des lymphocytes T, l'engagement de cette protéine a été associé à l'induction des fonctions régulatrices de Bregs dans plusieurs modèles. La cascade de signalisation initiée par cette protéine peut activer plusieurs facteurs de transcription tels que NF κ B (Nuclear Factor Kappa Light Chain B) ou NFAT. Ces facteurs une fois activés peuvent induire la production d'IL-10. Les souris chimériques déficientes pour le CD40 au niveau de leurs cellules B présentent une EAE exacerbée et une production d'IL-10 diminuée. Dans cette même étude, la stimulation des cellules par un agoniste du CD40 conduit à la production d'IL-10 (31). Dans le modèle murin d'arthrite au collagène, le traitement avec le CD40 permet d'inhiber la réponse Th1 via cette production d'IL-10 (32).

❖ L'activation des récepteurs Toll Like (TLRs) des cellules B

Les TLRs, activés par des ligands bactériens ou viraux sont impliqués dans la réponse innée et adaptative. Plusieurs types de TLRs sont exprimés par les cellules B et participent à leur activation. La signalisation des TLRs impliquant la protéine MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) a été montrée comme étant essentielle à l'induction de la production d'IL-10. Des souris déficientes pour MyD88 ou pour les TLR2 et TLR4 développent une EAE (55).

Des études récentes ont démontré que la stimulation des TLR4 par des lipopolysaccharides (LPS) associée à une stimulation du CD40 de cellules B spléniques de souris, induisait une production importante d'IL-10 (56). Suite à la fixation d'oligodeoxynucleotides (CpG), le TLR9 peut également induire la production d'IL-10 par les cellules B (57). La stimulation, *in vitro* de cellules B10 de souris avec du LPS, du CpG et du CD40L entraîne une augmentation de la proportion de cellules B régulatrices et de la production d'IL-10 (58). Chez l'Homme, plusieurs études ont aussi montré que la stimulation de lymphocytes B avec du CpG et du CD40L pouvait induire le développement de cellules productrices d'IL-10 (59). Une de ces études a mis en évidence le rôle des Bregs sur les lymphocytes T folliculaires (Tfh) par des expériences de co-cultures. Cette étude montre un effet à la fois sur leur développement et aussi sur l'expansion des Tregs grâce à la production de TGFβ1 et d'IL-10 (60).

❖ Différenciation des Bregs en réponse aux cytokines

De nombreuses études montrent que les Bregs peuvent être induits en réponse à des cytokines pro- ou anti-inflammatoires. L'augmentation de la proportion de Bregs observée durant les phases inflammatoires de nombreuses pathologies auto-immunes suggère que ces cellules peuvent être activées en réponse aux signaux inflammatoires à l'origine de la pathologie.

L'implication des cytokines dont l'IL-6 et l'IL1β a été montrée dans un modèle d'arthrite, induite par un antigène où l'absence de leurs récepteurs provoque une amplification de la pathologie chez la souris (61). L'IL-21 peut aussi induire le développement de cellules B10, comme cela a pu également être montré dans des modèles murins de pathologies auto-immunes (62).

Une autre famille de cytokines participe à l'induction des Bregs, ce sont les facteurs BAFF. Les cellules B isolées à partir de sang de donneurs sains produisent plus d'IL-10 en réponse aux stimulations par BAFF associé au CpG. Ces lymphocytes B10 ont une maturation pouvant aussi être induite par BAFF et le CD40L (63). Une nouvelle étude a montré que la stimulation de lymphocytes B issus de donneurs sains ou de patients atteints de PR stimulés avec le facteur APRIL, un ligand de la même famille (A proliferation-inducing ligand) induit leur capacité régulatrice (64).

❖ Autres facteurs

D'autres facteurs participent à l'expansion de ces populations régulatrices. Les molécules de co-stimulation CD80/CD86, indispensables à l'engagement du CD40L avec le CD40 du lymphocyte B, participent indirectement à l'expansion des Bregs.

De nombreux parasites ont été décrits comme étant capables d'induire la génération de cellules B régulatrices afin de contrôler l'inflammation. C'est par exemple le cas de *Salmonella*, qui dans des modèles murins induit le développement de plasmocytes producteurs d'IL-10 et d'IL-35 (65). Enfin dans un contexte tumoral, des facteurs provenant du microenvironnement tumoral entraînent l'acquisition de fonctions immunorégulatrices par les cellules B. En effet, dans un modèle murin, des cellules B isolées à partir de tumeurs sont plus immunosuppressives que les cellules isolées à partir de la rate des souris (66). Yu Zhang et son équipe parle « d'éducation des Bregs par les cellules tumorales ». L'influence des cellules tumorales peut passer par différents types de facteurs comme des métabolites ou des facteurs de croissance. C'est par exemple le cas du PIGF (Placenta Growth Factor), un membre de la famille VEGF retrouvé dans les vésicules sécrétées par les cellules de gliomes. Ce facteur induit la différenciation de cellules B normales en cellules régulatrices productrices de TGFβ1 (67).

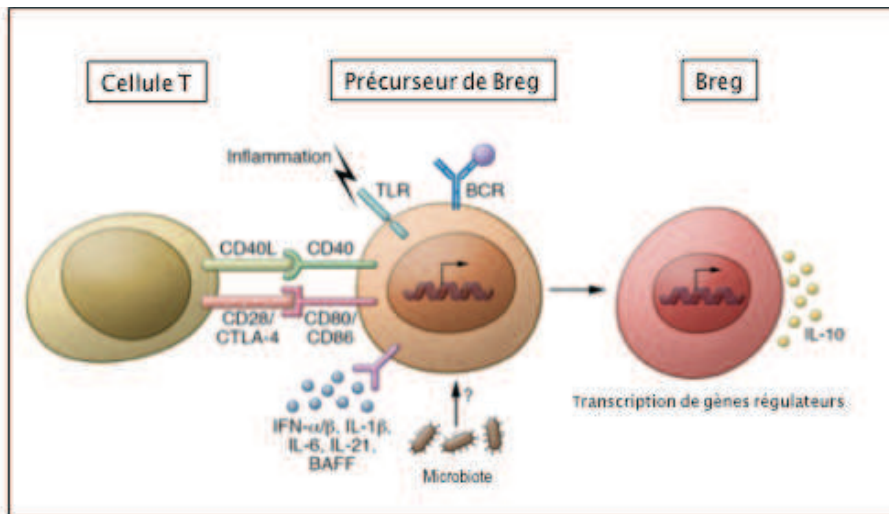


Figure 12: Induction des cellules B régulatrices

L'activation du lymphocyte B via son récepteur (BCR) est associée aux interactions avec les lymphocytes T. La fixation du CD40 à son ligand, de CD86/80 au CD28 participent à l'induction de fonctions régulatrices de la cellule B. D'autres facteurs tels que la stimulation des TLRs, les cytokines ou encore le microbiote peuvent également induire la différenciation du lymphocyte B en B régulateur (Breg). *Adapté de Mauri et al, 2017 (68).*

c. L'immunosuppression par la sécrétion de protéines

Les lymphocytes B ayant acquis une fonction régulatrice grâce à ces facteurs, vont pouvoir moduler la réponse immune. Cette régulation peut se faire de manière directe ou indirecte, via une production de cytokines ou des interactions avec les cellules cibles (**Figure 13**).

❖ Les Bregs producteurs d'IL-10

L'IL-10 est la principale cytokine produite par les Bregs. C'est aussi le premier facteur décrit, comme leur conférant une fonction régulatrice. Le rôle immunosuppresseur avait été démontré *in vivo* dans des modèles murins d'EAE ou de polyarthrite par les équipes de S.Fillatreau et de C.Mauri montrant l'effet protecteur des cellules B produisant ce facteur (31, 32). L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire dont le rôle immunorégulateur est surtout observé sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et lymphocytes T. Dans des modèles murins d'EAE, l'IL-10 inhibe la sécrétion de TNF α par les monocytes et les macrophages activés mais aussi la production d'IL-6 et d'IL-12 par les cellules dendritiques comme cela a pu être montré (52, 69). Cette inhibition diminue la capacité des cellules dendritiques à induire la prolifération des cellules T (70). L'IL-10 produit par les cellules B régule aussi la différenciation et l'activation des lymphocytes T.

Des cellules B issues de sang périphérique de donneurs sains sont capables d'inhiber la réponse de type Th1 en bloquant la production de TNF α et d'IFN γ des lymphocytes T CD4⁺ via la production d'IL-10 (71). Le blocage de l'IL-10 ou de son récepteur dans des expériences de co-cultures rétablit la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺ (72). L'IL-10 altère également l'activation des lymphocytes T CD4⁺ en régulant de manière négative l'expression des molécules d'activation comme le CD80, CD86 ou le CMH de classe II, inhibant aussi leur prolifération. L'équipe de C. Mauri a démontré que ces cellules B productrices d'IL-10 induisaient la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en T régulateurs (73, 74). La production d'IL-10 par les Bregs est ainsi liée à l'inhibition de l'immunité anti-tumorale dans de nombreux cancers (36). De nombreuses études se sont focalisées sur la production d'IL-10 au point de réduire la définition d'une cellule régulatrice à la production de cette cytokine. Cependant, les lymphocytes B peuvent jouer un rôle à travers la production d'autres cytokines comme le TGF- β 1.

❖ Production de TGF β par les Bregs

Le TGF β 1 est une autre cytokine immunosuppressive capable de réguler la survie et la différenciation des cellules T. Le TGF β 1 est capable d'inhiber la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1 ou Th2 en inhibant la production de cytokines comme l'IL-4 ou l'IFN γ et d'induire le développement de Tregs (75). Une population de cellules B productrices de TGF β 1 a été décrite pour la première fois dans un modèle de leucémie lymphoïde chronique (LLC) et constitue les Br3, en analogie avec la population de lymphocytes T appelée Tr3 (76). Dans un modèle de souris NOD (Non obesis diabetic), les lymphocytes B, activés par du LPS inhibent les réponses auto-immunes, de type Th1 dirigées contre les cellules pancréatiques productrices d'insuline. Les lymphocytes B activés induisent également la différenciation en Tregs via la production de TGF β 1 (77). Des expériences *in vitro* ont montré que les Bregs peuvent induire, via la production de TGF β 1, l'expression de Foxp3 dans des cellules T activées et entraîner le développement de Tregs (78). De la même façon que l'IL-10, le TGF β 1 peut inhiber l'immunité anti-tumorale et être impliqué dans la progression de cancers (37).

❖ **L'IL-35, cytokine inductrice de Bregs**

Les lymphocytes B régulateurs sont également capables de produire une autre cytokine anti-inflammatoire, l'IL-35. La production de cette cytokine par les Bregs a été mise en évidence dans un modèle murin d'EAE. Dans ce modèle, les souris ayant des cellules B déficientes en IL-35 ne sont pas capables de se rétablir de la pathologie. Cette régulation dépend de la présence d'IL-10. De plus, une déficience des cellules B pour l'une de ces deux cytokines conduit au développement d'une EAE exacerbée (79). La stimulation d'IL-35 entraîne une expansion des cellules productrices d'IL-10 ou d'IL-35 empêchant le développement de pathologies auto-immunes (80). La fonction immunorégulatrice des lymphocytes B peut aussi passer par la production de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-17 dont l'implication a été évoqué dans les infections par des parasites tels que *T.cruzi* (81). De la même manière que l'IL-10, la production d'IL-17 pourrait agir sur la différenciation des cellules T en réponse aux infections.

❖ **Bregs exprimant le Granzyme B**

À ces cytokines, s'ajoute la production de granzyme B, une sérine protéase libérée au sein de granules, elle est responsable d'une destruction cellulaire dépendante de la perforine. L'expression du granzyme B a d'abord été montrée dans les lymphocytes B de patients atteints de LLC (82). La production de cette protéase peut être stimulée par l'IL-21. Une récente étude a montré que les lymphocytes B CD5⁺ de patients atteints du syndrome de Sjögren expriment des niveaux plus importants de récepteurs à l'IL-21 et produisent plus de granzyme B limitant ainsi le développement de la pathologie (83). Le rôle du granzyme B produit par les cellules B est encore mal compris même si une récente étude sur des cellules B de patients atteints de polyarthrite montre une inhibition des réponses Th1, Th17 et une apoptose des lymphocytes T CD4⁺ qui seraient dépendante du granzyme B (84).

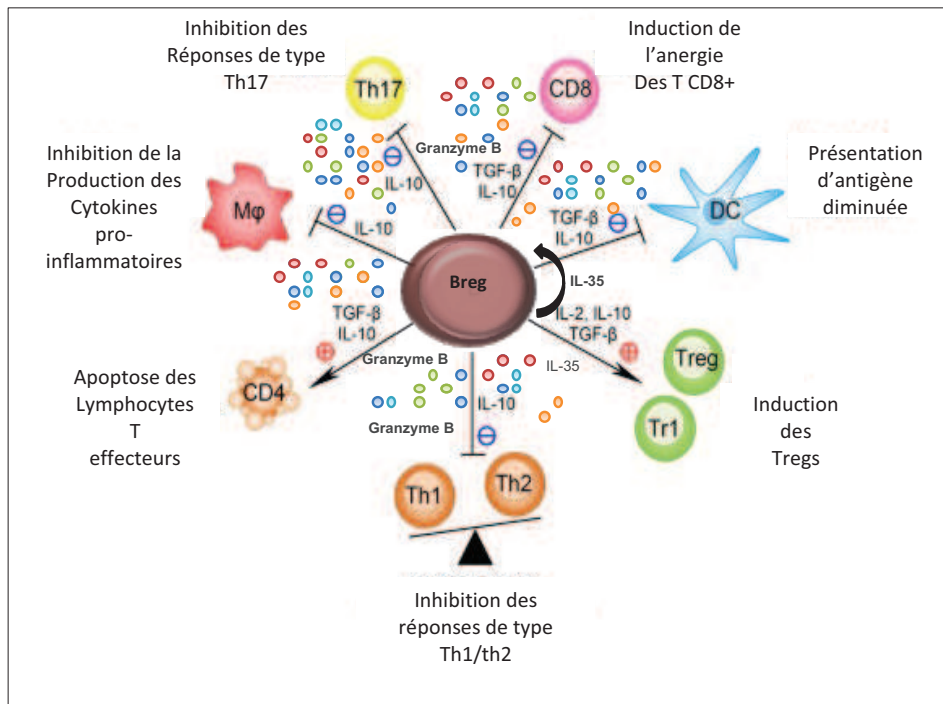


Figure 13: Bregs et immunosuppression par la production de cytokines

Régulation négative de la réponse immunitaire par la cellule B régulatrice (Breg) via la production de facteurs immunosuppresseurs, tels que IL-10 et TGFβ1 et le Granzyme B. Mφ: Macrophages, DC: Cellule dendritique, PC: Plasmocyte, NK: Natural Killer, B: lymphocyte B, Th: T auxiliaires, Tr: T régulateurs. *Adapté de Rosser et al., 2015 (35).*

d. Immuno-régulation par des interaction cellulaires

❖ Bregs appelés « killers cells »

Les lymphocytes B régulateurs jouent leur rôle immunosuppresseur en produisant des facteurs solubles mais aussi en exprimant différents types de ligands tels que Fas-L (Fas ligand), TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) ou PD-L1 (Programmed death-1 ligand) impliqués dans la mort cellulaire programmée. L'expression de Fas-L à la surface des cellules active l'apoptose de cellules cibles comme les cellules T, exprimant le récepteur Fas. L'expression de FasL par les lymphocytes B a été démontrée dans des pathologies comme le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) et la LLC. Son expression induit l'apoptose des cellules T CD4⁺ et d'autres cellules régulant la réponse immunitaire (85, 86). Dans les modèles d'arthrite induite au collagène, le nombre de cellules B CD5⁺ exprimant FasL est inversement proportionnel à la sévérité de la maladie (87). L'expression de TRAIL par les lymphocytes B a été mise en évidence dans des modèles humains et murins de lymphomes comme la LLC (88) mais son rôle reste encore mal connu.

L'expression de PD-L1 par les lymphocytes B leur confère aussi un rôle suppresseur sur les cellules exprimant le récepteur PD-1 comme les lymphocytes T. Dans des modèles murins et humains d'auto-immunité, ce ligand est exprimé de manière importante par les Bregs, il régule l'activité des cellules Tfh et atténue l'activation des lymphocytes T ainsi que leur différenciation (89).

❖ Implication des protéines de co-stimulation

L'expression de protéines de surfaces, impliquées dans l'activation des cellules B joue un rôle crucial dans leur fonction régulatrice. Si les molécules de la famille B7 (CD80 et CD86) jouent un rôle clé dans l'induction des Bregs, le contact entre ces Bregs et les cellules T via ces molécules ainsi que les molécules du CMH de classe II est essentiel au maintien de la tolérance (74). Ce contact avec les lymphocytes T se fait aussi via la molécule CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) qui peut induire la différenciation des lymphocytes B en Bregs induits, les iBregs. Cette population de Bregs module les réponses immunitaires par la production d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui induit les Tregs (90).

Enfin une population de Bregs appelée Br1, a aussi été décrite pour son rôle dans le

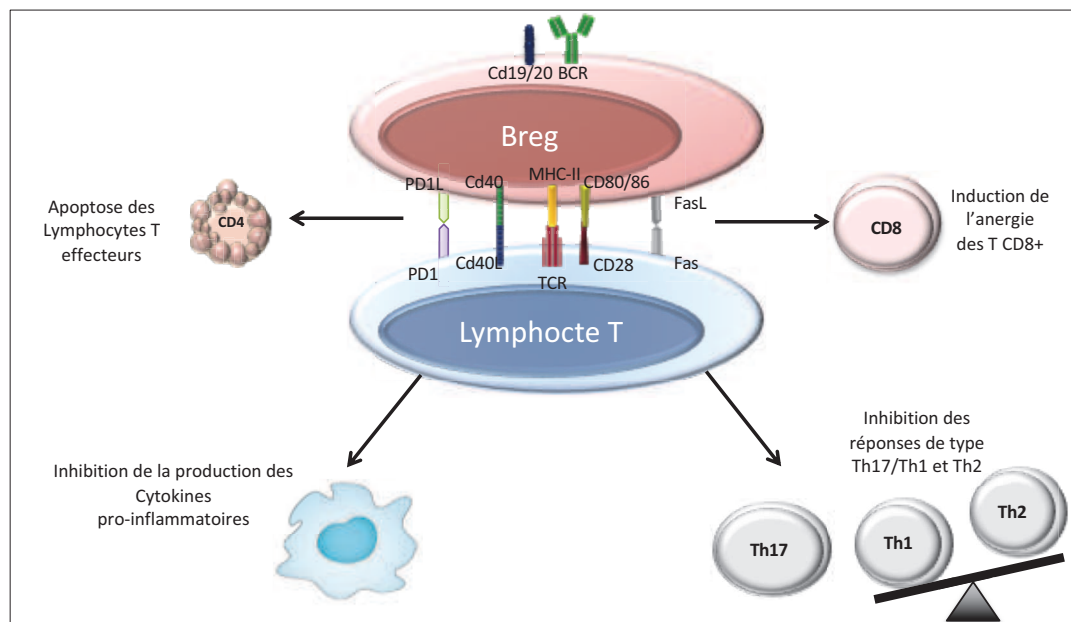


Figure 14: Bregs et immunosuppression par contacts cellulaires

Immunorégulation par les Bregs via différentes interactions. PD1 et PD1L: Programmed Death receptor et ligand, MHC-II: Molécule de CMH de type II, BCR et TCR: Récepteur à l'antigène de la cellule B et de la cellule T, CD19,CD20: Co-récepteurs du BCR, CD80/86 et CD28: molécules de co-stimulation. CD4 et CD8: Lymphocytes T effecteurs et cytotoxiques, Th: T auxiliaires, Mφ: Macrophages.

maintien de la tolérance aux allergènes via la production d'anticorps IgG4 (74) (Figure 14).

Mécanismes De régulation	Populations	Modèle	Phénotypes	Références
IL-10	B T2 MZP	Souris	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} CD24 ^{hi} IgM ^{hi} IgD ^{hi} CD1d ^{hi}	Mauri et al., 2003 ; Evans et al., 2007
	B10	Souris	CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{hi}	Yanaba et al., 2008
	Plasmablastes	Humain	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺	Iwata et al., 2013
		Souris	CD138 ⁺ CD44 ^{hi}	Matsumoto et al., 2014
	Plasmocytes	Humain	CD38 ^{hi} CD27 ^{hi}	
	Souris	CD138 ^{hi} IgM ⁺ TACI ⁺ CXCR4 ⁺ CD1d ^{hi} Tim1 ^{int}	Shen et al., 2014	
	B immatures	Humain	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	Blair et al., 2010
TGFβ1	Br3	Humain	TIM1 ⁺ CCR6 ⁺ CXCR3 ⁺ <u>IL10</u> ⁺	Lotz M et al., 1994
		Souris	IDO ⁺	Tian et al., 2001
IDO	iBreg		-	Nouël et al., 2015
IL-35	Plasmocytes	Souris	CD138 ^{hi} IgM ⁺ TACI ⁺ CXCR4 ⁺ CD1d ^{hi} Tim1 ^{int}	Shen et al., 2014
Granzyme B	GrzB ⁺ Breg	Humain	CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD1d ⁺ IgM ⁺ CD147 ⁺	Jahrsorfer B et al, 2006
Fas-L/IL-10	B-1a	Humain, Souris	CD5 ⁺	Lundy et al., 2009
TRAIL	-	Humain	-	Sedger et al., 2010
PD-L1	PD-L1 ^{hi}	Souris	CD19 ⁺ PD-L1 ^{hi}	Khan et al., 2015
	Humain			
	B immatures	Humain	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	Blair et al., 2010
IgG4	Br1	Humain	CD25 ⁺ CD71 ⁺ CD73 ^{lo}	Van de Veen et al., 2013
Adénosine	-	Souris	CD39 ⁺ CD73 ⁺	Kaku et al., 2014
		Humain		Saze et al., 2013

Tableau 2: Différentes populations de Bregs chez l'Homme et la Souris

CD : Cluster de Différenciation, B T2 MZP : B précurseurs de la zone marginale, IDO: Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygénase, iBreg: B régulateurs induits, TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand, PD-L1: Programmed death ligand 1, IgG4: Immunoglobuline G4.

3. Implications des cellules régulatrices dans les pathologies

L'importance des lymphocytes B régulateurs est confirmée par l'existence de nombreuses pathologies caractérisées par une altération quantitative ou fonctionnelle des Bregs (68).

a. Lymphocytes B régulateurs dans les pathologies immunes

❖ Pathologies Auto-immunes

Les pathologies auto-immunes sont caractérisées par un défaut numérique et fonctionnel de lymphocytes B régulateurs. Un défaut fonctionnel et quantitatif des lymphocytes B régulateurs a été décrit dans la LES. La pathologie se caractérise par une altération de la différenciation des lymphocytes immatures en Bregs avec une incapacité à produire de l'IL-10 et à supprimer la réponse Th1 ([91](#)). Une diminution de la proportion de lymphocytes B producteurs d'IL-10 a été décrite chez les patients de PR. On retrouve une corrélation inverse entre le nombre de Bregs et l'évolution de la pathologie ce qui implique une perte d'immunosuppression conduisant à une inflammation chronique non résolue ([92](#)). Les approches thérapeutiques visent donc à induire l'expansion de ces cellules et à rétablir les mécanismes d'immunorégulation en utilisant des facteurs immunosuppresseurs tel que l'IL-35 ([80](#)).

❖ Allergies

Une réponse inflammatoire aux allergènes incontrôlée à peut-être l'origine de l'apparition d'allergies. Ces allergies peuvent conduire à différentes pathologies comme par exemple l'asthme. L'altération de la tolérance aux allergènes peut être due à un manque de Bregs. Dans un modèle d'asthme, les patients présentent une faible expansion des Bregs en réponse au LPS ([93](#)).

❖ Dans les Infections

Le rôle des Bregs a été décrit dans plusieurs types d'infections qui entraînent une expansion des lymphocytes B régulateurs et une réduction de la réponse de type Th1. L'expansion des Bregs supprime les réponses protectives de l'hôte en modulant les réponses immunes ([94](#), [95](#)). Cette expansion excessive de Bregs a également été identifiée dans les infections virales de type VIH ou HBV.

Les patients infectés présentent une augmentation de la proportion de cellules B régulatrices, productrices d'IL-10, corrélée à la charge virale ([96](#), [97](#)). Dans le cas des infections ce n'est donc pas un défaut de cellules B régulatrices mais un excès de ces dernières qui participe au développement des pathologies.

b. Lymphocytes B régulateurs dans les cancers

❖ **Cancers et Tumeurs**

La fonction immunosuppressive des Bregs dans les cancers peut être délétère. De nombreuses études décrivent l'implication de ces cellules dans un défaut de réponse immunitaire anti-tumorale. Dans un modèle murin de cancer du sein, 4T1, les Bregs infiltrent la tumeur, induisent le TGFβ1 pour convertir les lymphocytes T CD4⁺ en Tregs Foxp3⁺ et jouent un rôle clé dans la progression tumorale (37). Des cancers comme le cancer du sein, des ovaires ou colorectal ont été décrits comme pouvant être infiltrés par des lymphocytes B régulateurs impliqués dans le développement et la progression tumorale (98).

❖ **Lymphomes et pathologies chroniques**

Dans les lymphomes, des cellules B sont attirées par le microenvironnement tumoral et modulent les réponses anti-tumorales. Ces cellules ont été décrites par l'équipe d'Ansell comme étant capables d'induire l'expansion des Tregs Foxp3⁺. Ces Tregs sont recrutés au niveau de la niche tumorale grâce aux chimiokines et suppriment la réponse de type Th17 à travers une production de TGFβ1 (99). L'implication de l'interaction PD-1/PD-L1 a aussi été montrée dans plusieurs lymphomes, conduisant ainsi au développement et à l'utilisation de thérapies ciblant PD-1. L'utilisation d'anti-PD-1 a ainsi permis de diminuer l'effet des Bregs ce qui semble efficace dans le traitement de la maladie de Hodgkin (100). Plusieurs pathologies chroniques impliquent donc un excès de lymphocytes régulateurs qui par la production de facteurs comme le TGFβ1 ou l'IL10 participent à l'immunosuppression responsable de l'expansion chronique des cellules tumorales. Dans les modèles murins de lymphomes, l'équipe de Tedder a montré que les Bregs producteurs d'IL-10 inhibent la déplétion en lymphocytes B induite par un traitement aux anti-CD20 (101). Cette même équipe a décrit, dans la LLC une population de lymphocytes B CD5⁺ producteurs d'IL-10 qui partagent de nombreuses similitudes avec les Bregs (102).

III. La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

1. Caractéristiques cliniques et biologiques

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie maligne caractérisée par une accumulation de lymphocytes B monoclonaux matures dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate) ([103](#)).

L'évolution clinique de la pathologie est très variable avec des courbes de survie pouvant aller de quelques mois à plusieurs décennies. Alors que certains patients sont asymptomatiques, d'autres ont une maladie progressive avec une altération de leur état général nécessitant le recours à un traitement spécifique. Actuellement, aucun traitement ne peut être considéré comme curatif et la caractérisation des facteurs pronostiques prédictifs est une priorité clinique et thérapeutique. La compréhension des mécanismes responsables de la pathologie et des mécanismes immunorégulateurs, favorisant sa progression est essentielle pour le développement d'immunothérapies ciblées.

a. Présentation Clinique

❖ Épidémiologie

La LLC est l'une des hémopathies de l'adulte les plus fréquentes dans les pays occidentaux. Elle représente 25 à 30% des leucémies diagnostiquées. L'âge médian au diagnostic est de 70 ans chez les hommes et 72 ans chez les femmes. L'incidence de la maladie est maintenue dans les populations migrantes et leur descendance. Les facteurs environnementaux ne semblent donc pas être impliqués dans la pathogénèse. En revanche, des facteurs génétiques semblent être impliqués avec une prédisposition familiale dans 5 à 10% des cas ([104](#)).

Stade	Risque	Caractéristiques	Survie Globale
-------	--------	------------------	----------------

❖ Diagnostic

Les signes cliniques de la LLC sont très variables et la pathologie est souvent découverte lors d'un examen médical de routine. À un stade précoce, la plupart des patients sont asymptomatiques et la maladie n'est diagnostiquée que lorsqu'une élévation de la numération des globules blancs est mise en évidence. La maladie se caractérise par une hyperlymphocytose supérieure à 5.10^9 lymphocytes/Litre, persistante sur plusieurs semaines et mois. Les symptômes plus tardifs peuvent comprendre l'hypertrophie des ganglions lymphatiques ou des douleurs abdominales dues à l'élargissement de la rate (**Figure 15**). Le diagnostic de cette pathologie est généralement effectué sur la base de deux types d'examens : l'hémogramme et l'immuno-phénotypage. Les cellules de LLC expriment en plus du marqueur classique CD19 deux marqueurs caractéristiques de la pathologie, le CD23 et le CD5. Le CD5 est un marqueur de lymphocytes T et d'une sous-population lymphocytaire B rare chez l'adulte. L'expression constante du marqueur d'activation CD23 et plus rarement du CD25 ou du CD71 révèle l'état activé de ces cellules. Par ailleurs, à la différence des lymphocytes B normaux, l'expression du CD20 et des immunoglobulines membranaires de type IgM et IgD est relativement faible sur les cellules B de LLC. Un score basé sur l'expression de ces marqueurs et la présence d'adénopathies a été défini pour confirmer la pathologie, c'est le score de Matutes. La LLC se définit par un score égal ou supérieur à 4. Plusieurs systèmes de classification clinique existent, basés sur l'examen clinique. Les plus utilisées sont celles de Rai et Binet permettant de définir des sous-groupes de patients, en discriminant les formes graves (stades B/C) qui nécessitent un traitement des formes moins sévères (**Tableau 3**). Cette classification permet d'orienter la prise en charge des patients mais d'autres facteurs pronostiques comme le statut mutationnel des immunoglobulines, l'expression du CD38 ou de ZAP-70 (Zeta chain-associated protein 70) restent des facteurs de risque de progression de la maladie.

			(ans)
RAI			
0	Faible	Hyperlymphocytose isolée	> 10
I/II	Intermédiaire	Adénopathies et/ou Hépatosplénomégalie	7
III/IV	Haut	Anémie et /ou Thrombopénie	< 4
BINET			
A	Faible	Moins de 3 aires de polyadénopathies	12
B	Intermédiaire	≥ 3 aires de polyadénopathies	7
C	Haut	Anémie et /ou Thrombopénie	2-4

Tableau 3: Classifications de Rai et Binet

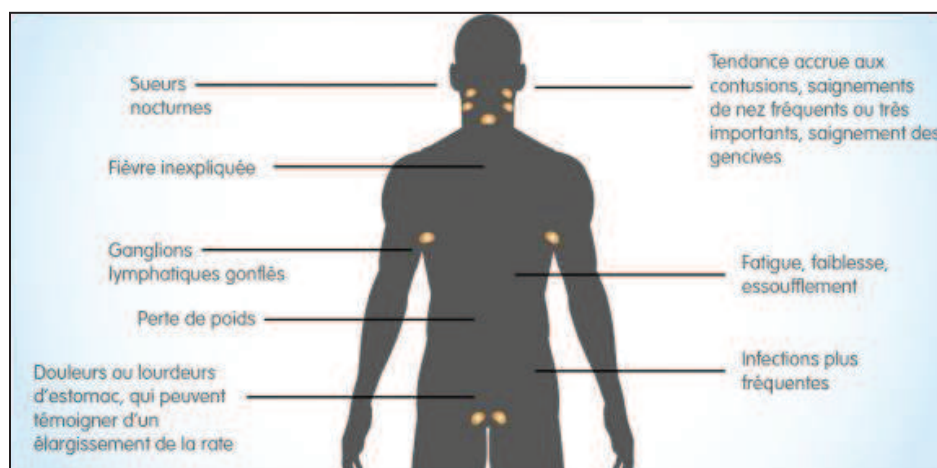


Figure 15: Symptômes classiques de la Leucémie Lymphoïde chronique

D'après Sign and symptoms of chronic lymphocytic leukemia, American Cancer Society.

❖ Évolution de la pathologie

L'évolution clinique de la LLC est hétérogène. L'augmentation de la population tumorale peut être associée à plusieurs types de complications telles que des cytopénies. Les complications les plus fréquentes restent les infections qui constituent la première cause de morbidité des patients atteints de LLC. Essentiellement d'origine bactérienne, plus rarement virales, elles sont constatées dans plus de 50% des cas, aux stades les plus avancés.

D'autre part, les formes les plus agressives peuvent évoluer en lymphomes, leucémie pro lymphocytaire aigüe ou en myélome multiple. La transformation en Richter, forme la plus agressive de la pathologie touche 3 à 10% des patients abaissant leur médiane de survie à moins de 4 mois. Certains patients développent des pathologies auto-immunes ou des cancers solides, de plusieurs types.

b. Facteurs pronostiques

Des facteurs pronostiques, reconnus ou encore en cours d'évaluation peuvent être cliniques ou venir de la caractérisation d'anomalies génétiques ou biochimiques.

❖ Facteurs clinico-biologiques

En plus des classifications de Binet et de Rai, certains paramètres permettent d'anticiper la progression de la maladie. Ils correspondent par exemple, au temps de doublement des lymphocytes (LDT). Un LDT inférieur à 12 mois est associé à une diminution de la survie globale et à la progression de la maladie ([105](#)).

Les marqueurs biologiques les plus classiquement analysés sont des marqueurs sériques tels que les taux de thymidine kinase (TK) ou de β -2 microglobuline (β -2M). Des taux élevés de TK ou de β 2M dans le sérum des patients sont associés à une progression de la pathologie et à une survie diminuée ([106](#)).

❖ Statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines

L'étude du statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgHV), exprimées à la membrane a permis de séparer les patients en deux groupes.

Un groupe de patients avec une IgHV mutée, dont la séquence présente plus de 2% de différence avec celle des lymphocytes B naïf et un groupe de patients avec une IgHV non mutée et au moins 98% d'homologie avec le gène de la lignée germinale. Alors que ces patients à IgHV non mutée (LLC-NM) ont une diminution significative de leur survie, les patients à IgHV mutée (LLC-M) présente une forme moins agressive de la pathologie ([107](#), [108](#)).

❖ Marqueurs cytogénétiques

Les anomalies chromosomiques sont fréquentes dans la LLC. Des anomalies cytogénétiques ont été retrouvées chez 80% des patients. Les plus fréquentes sont la délétion 13q14, la délétion 11q22-23, la trisomie 12q et la délétion 17p13. Certaines de ces anomalies peuvent être corrélées au pronostic et à la survie des patients. Les patients porteurs d'une délétion 13q (55%) ont une meilleure survie que les patients au caryotype normal ou que ceux porteurs de délétions 11q (18%). Les patients avec une délétion 17p (7%) entraînant une inactivation ou une absence de p53 ont le plus mauvais pronostic. ([109](#)).

❖ Mutations récurrentes

Des mutations somatiques ont plus récemment été identifiées chez les patients grâce au développement des techniques de séquençages du génome entier. L'analyse 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 ([110](#), [111](#)). 18 anomalies ont été détectées, les plus fréquentes étant celles des gènes *TP53*, *SF3B1* ou *ATM*. Ces mutations agissent de façon synergique pour participer à la résistance aux traitements par chimiothérapie ([112](#)). La résistance aux traitements par inhibiteurs de protéines de signalisation a été associée à des mutations impliquant l'évolution clonale. C'est par exemple, le cas des mutations de la kinase *Btk* au niveau du site de liaison de l'inhibiteur ([113](#)). Des mutations de *PLCγ2* ont également été décrites conduisant à l'activation de la voie du BCR indépendamment de BTK ([114](#)).

❖ Facteurs liés au microenvironnement

Des marqueurs protéiques dont l'expression ou l'activation peut être liée à une interaction avec le microenvironnement tumoral ont également été décrits comme indicateurs de stratification. L'un de ces facteurs est ZAP-70, une tyrosine kinase initialement décrite dans les lymphocytes T et NK, comme étant impliquée dans la transduction du signal activé au niveau du récepteur à l'antigène (TCR).

L'expression de ZAP-70 a été décrite dans les cellules B de LLC et joue un rôle dans signalisation initiée par le BCR (115). Des études plus récentes ont montré de nombreuses discordances quant à son expression comme indicateur pronostique indépendant (116).

Un second facteur, indépendant est le CD38, une glycoprotéine transmembranaire de type II ayant à la fois une fonction de récepteur et d'enzyme impliquée dans le métabolisme de l'ADP (adénosine diphosphate). Exprimée à la surface des lymphocytes T, B, des NKs ou des monocytes, le CD38 peut également s'associer au CMH de classe II et jouer un rôle de co-récepteur. Dans la LLC, son expression est à la fois le reflet de l'activité proliférative des cellules et de leur interaction avec le microenvironnement (117). Associée à un mauvais pronostic, le seuil de positivité de la valeur pronostique de ce facteur dont l'expression semble varier au cours du temps est encore controversé (entre 20 et 30%) (118).

Les avancées dans l'identification et la compréhension de leur implication dans la pathologie ont permis de préciser la classification des patients et d'améliorer les stratégies thérapeutiques.

c. Traitements de la LLC

Depuis quelques années, la prise en charge de la LLC connaît d'importants progrès et permet d'atteindre de bien meilleurs pourcentages de rémission de longue durée, à travers la mise en place de thérapies ciblées (119). L'indication thérapeutique se fait en fonction de critères d'évolutivité (HAS 2012) et se base sur la classification des patients en fonction des différents critères décrits. Les patients en stade A de Binet ne sont pas traités en première intention, ceux au stade B le sont dès qu'ils présentent des signes de progression de la maladie alors que les patients en stade C sont traités dès le diagnostic.

❖ La Chimio-immunothérapie

Le traitement de référence reste une association de chimiothérapie avec des analogues de Purine comme la fludarabine associée à des agents alkylants tels que la cyclophosphamide ou la bendamustine. Cette chimiothérapie est combinée à une immunothérapie avec l'utilisation, notamment du rituximab ou l'ofatumumab, des anticorps monoclonaux anti-CD20, ciblant donc tous les lymphocytes B. Bien qu'efficace et permettant une amélioration durable de l'état du patient, ce traitement n'empêche pas les rechutes à plus ou moins long terme.

De plus, ce traitement n'est pas prescrit aux patients qui présentent une délétion (17p), réfractaires à la chimiothérapie. La recherche de traitements alternatifs pour tous ces patients est très actuelle et a conduit au développement de petites molécules inhibitrices ([120](#)).

❖ Les agents ciblant la voie du BCR

Le récepteur à l'antigène (BCR) joue un rôle important dans la survie des cellules de LLC. L'inhibition des voies de signalisation, représente une stratégie alternative de traitement de la pathologie. Différents inhibiteurs ciblant les protéines du signalosome ont été développés ces dernières années avec notamment l'utilisation en clinique de l'ibrutinib (Imbruvica®). Cet inhibiteur irréversible de BTK inhibe la signalisation initiée par le BCR et les effets pro-survie du microenvironnement ([121](#)). Ce traitement se montre très efficace quel que soit le profil du patient traité (caryotype, statut IgHV). Cependant, l'ibrutinib ne permet pas la rémission complète et favorise la génération de clones leucémiques mutants entraînant une résistance au traitement ([119](#)). Des essais cliniques avec un inhibiteur de BTK de seconde génération sont en cours d'analyse ([122](#)). Un inhibiteur de la PI3K (Phosphoinositide 3 kinase), l'idelalisib (Zydelig®) a aussi fait l'objet d'essais cliniques, arrêtés en 2016 en raison d'importantes infections et de décès liés au traitement.

D'autres traitements ciblant les voies de signalisation en aval du BCR sont actuellement à l'essai. Ceci est le cas d'inhibiteurs des voies de l'apoptose tels que les inhibiteurs de BCL2 (B-cell lymphoma 2) (Venetoclax) ou des agents immunomodulateurs comme le lenalinomide ([123](#)). De nouvelles approches visant à trouver de meilleurs traitements restent en plein développement. De nouveaux essais sont réalisés avec la technologie CAR T (Cellules T porteuses de récepteur chimériques) et montrent une amélioration de la survie sans progression ni rechutes. Les CAR T-cells, sont des lymphocytes T génétiquement modifiés, dirigés contre le CD19 ([124](#)). Enfin des inhibiteurs de protéines impliquées dans l'immunosuppression, comme le récepteur PD-1 sont également en cours d'évaluation ([125](#)). La seule approche permettant une rémission complète est actuellement la transplantation allogénique de cellules souches, réservée aux sujets jeunes et à hauts risques.

2. Les lymphocytes B dans la LLC

a. Origine cellulaire de la LLC

L'origine cellulaire des lymphocytes B de LLC est encore controversée, même si de nombreuses hypothèses ont été proposées. Des cellules souches hématopoïétiques porteraient déjà des caractéristiques leucémiques ([126](#)). Elles seraient à l'origine des cellules B clonales exprimant le CD5 et le CD23.

Si au départ on pensait à l'existence de deux pathologies, le modèle actuel retenu indique que les cellules de LLC à IgHV muté (LLC-M) dériveraient de cellules d'origine post centre germinatif avec une rencontre antigénique thymo-dépendante tandis que les cellules de LLC à IgHV non muté (LLC-NM) proviendraient de cellules naïves indépendantes du centre germinatif (CG). Les patients présentant une leucémie à IgHV non mutée ont plus fréquemment d'autres mutations, en accord avec l'évolution clinique de la pathologie ([127](#)). Ainsi ces lymphocytes B de LLC peuvent aussi bien dériver de lymphocytes de la zone marginale que de lymphocytes mémoires issus des centres germinatifs ([18](#)).

Les cellules de LLC seraient donc issues d'un dysfonctionnement des mécanismes de tolérance visant à éliminer les cellules auto-réactives, les entraînant vers un processus d'immortalisation. Ces cellules disposent alors d'un BCR dont la signalisation est activée de façon autonome afin de les faire proliférer de manière antigène-indépendante ([127](#)) (**Figure 16**).

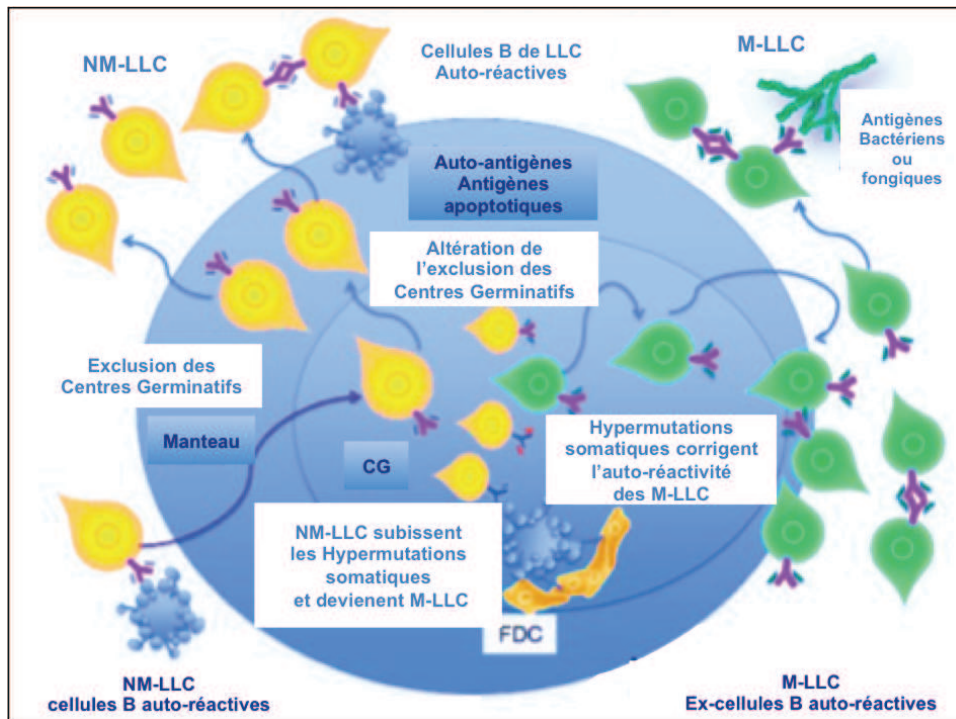


Figure 16: Origine cellulaire de la LLC

Les LLC non mutées (LLC-NM) sont issues de l'exclusion de cellules B auto-réactives des centres germinatifs (CG). Ces cellules reconnaissent leur propre BCR, les auto-antigènes et les antigènes apoptotiques. Dans les CG, lorsque cette exclusion est altérée, des hypermutations somatiques corrigent cette auto-réactivité, les LLC-NM deviennent alors les LLC mutées (LLC-M). *Adapté de García-Muñoz et al., 2014 (127).*

b. Fonction du BCR dans la LLC

Le BCR et son signalosome contrôlent la différenciation, la maturation et la prolifération des cellules B. Ainsi son implication et la modification des protéines de la signalisation, associées font l'objet de nombreuses études.

❖ La voie du BCR dans la LLC

La dérégulation de la voie du BCR occupe une place importante dans la physiopathologie de la LLC même si l'origine de ces altérations n'est pas encore bien comprise. Une étude très controversée rapporte une activation de ces lymphocytes qui se ferait au cours de la reconnaissance antigénique du soi ou d'un épitope présent sur le récepteur lui-même (128). Les cellules de LLC présentent de faibles niveaux d'IgM à leur surface et des réponses variables à la stimulation du BCR. Une étude récente de Märklin et al., a mis en opposition deux types de signalisation, suite à la stimulation du BCR qui mettrait la cellule dans un état anergique ou dans un état activé de prolifération.

Dans ces cellules, l'hyperactivation des éléments du signalosome telles que les kinases LYN, SYK conduit à la survie, à l'activation et à la prolifération des cellules de LLC ([129](#)). Une stimulation tonique du BCR induit quant à elle la kinase LCK qui active le facteur NFAT-2 et met la cellule dans un état anergique (**Figure 17**) ([130](#)). En plus de son implication dans les processus de survie, plusieurs études ont montré que la stimulation du BCR de cellules B de LLC pouvait conduire à la production de cytokines. L'inhibition de SYK dans le modèle murin Eμ-Tcl1 entraîne la diminution de la production d'IL-10 ([131](#)). Les mécanismes impliqués dans la régulation de cette cytokine seront détaillés dans le prochain chapitre.

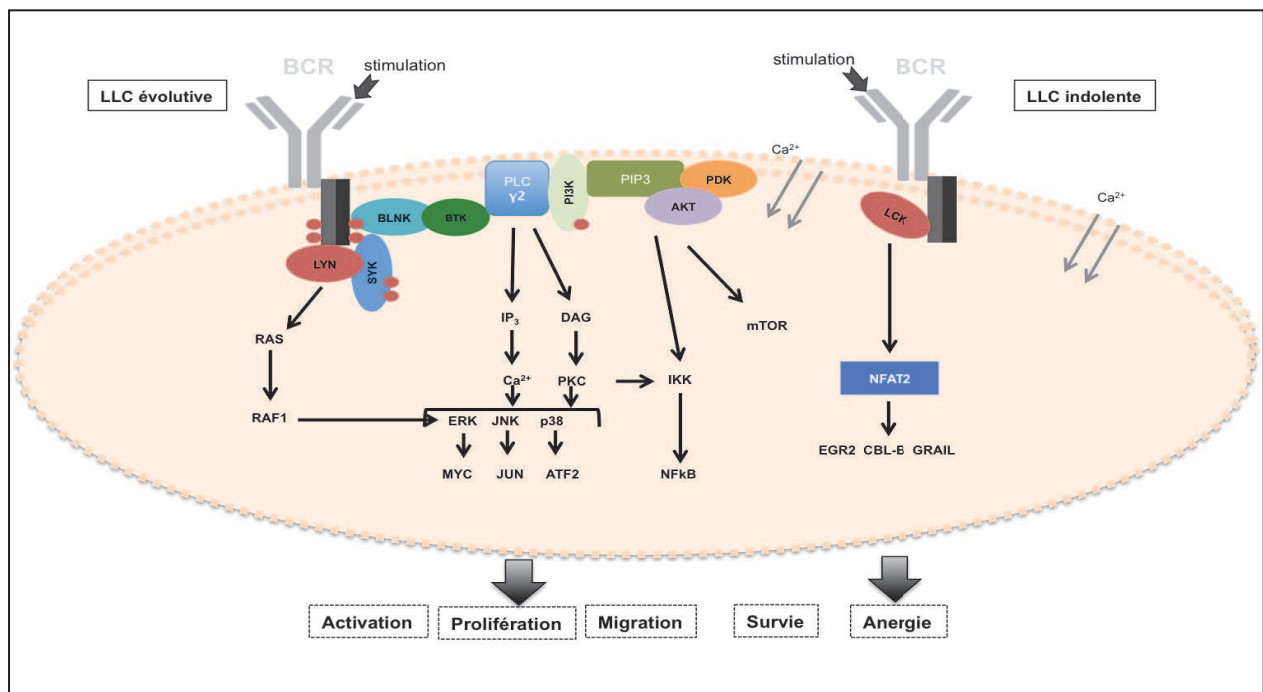


Figure 17: La voie du BCR dans les LLC évolutives et indolentes

L'activation constitutive des kinases LYN et SYK conduit à l'induction des flux calciques et à l'activation des voies de signalisation PKC, AKT, NFκB, ERK impliquées dans l'activation des lymphocytes B de LLC, leur prolifération, leur migration et leur survie. Le recrutement et l'activation de la kinase LCK dans le cas de LLC indolentes conduit à l'activation de NFAT2 qui induit l'expression du facteur de transcription EGR2 et des ligases CBL-B et GRAIL impliquées dans l'anergie. Les lymphocytes B de LLC survivent mais dans un état anergique.

D'après Stevenson et al, 2011 et Marklin et al., 2017 ([10](#)) ; ([130](#)).

❖ Rôle du microenvironnement

Les cellules B de LLC possèdent une importante dépendance aux signaux envoyés par les cellules du microenvironnement tumoral dans les organes lymphoïdes. Ceci a été démontré, par la mort spontanée des cellules B issues de patients LLC *in vitro* qui n'est pas retrouvée *in vivo*. D'autre part, les lymphocytes de LLC prélevés dans le sang périphérique, sont des lymphocytes quiescents bloqués en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Ainsi, les cellules proliféreraient au sein des ganglions et migreraient ensuite dans le sang périphérique via un mécanisme impliquant la sphingosine-1-phosphate et son récepteur.

Les cellules leucémiques en prolifération, retrouvées au sein des ganglions lymphatiques, avec une infiltration dans la moelle osseuse sont regroupées au niveau de structures histologiques particulières appelées pseudo-follicules ou centres prolifératifs (132). Au sein même de ces centres de prolifération, ces cellules leucémiques sont en contact avec les cellules du microenvironnement tumoral qui leurs délivrent de nombreux facteurs, cytokines et chimiokines permettant leur prolifération et leur survie au sein de la niche (103, 133, 134).

Parmi ces cellules, on retrouve les lymphocytes T CD4⁺ recrutés grâce aux chimiokines CCL22 et CCL27 (C-C Motif Ligand), et qui participent au maintien des cellules B via les interactions CD40/CD40L et l'IL-4 (135). Des cellules dérivées de monocytes plus communément appelées les Nurse Like Cells (NLCs). Initialement décrites *in vitro*, dans des co-cultures de cellules B de LLC avec des monocytes, ces cellules préviennent l'apoptose des lymphocytes B par un mécanisme dépendant de facteurs comme le CXCL12 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 12) ou BAFF et APRIL (136). D'autres cellules sont retrouvées dans les centres prolifératifs comme les cellules stromales de la moelle (MSC), les NKs, les cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) ou encore des cellules endothéliales qui participent à la survie, à la prolifération et à la migration des cellules B de LLC (137). Ainsi, les cellules B de LLC reçoivent de nombreux signaux qui vont activer différentes voies de signalisation et des facteurs tels que BTK, PI3K, ERK ou encore STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), présentant des effecteurs communs à ceux de la voie du BCR et impliqués dans le maintien de ces cellules (138). De nombreuses autres voies de signalisation telles que celles des TLRs, de Wnt, de Notch interviennent aussi dans l'effet pro-survie du microenvironnement (139) (Figure 18).

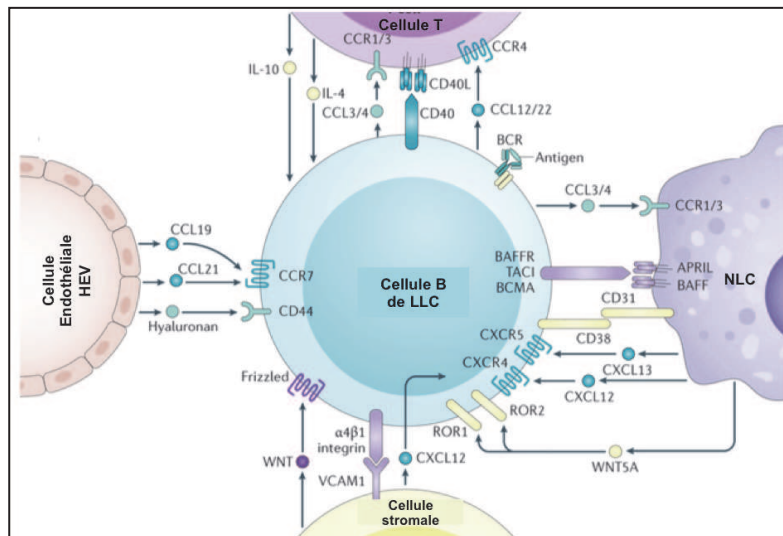


Figure 18: La cellule de LLC et le microenvironnement

La cellule B de LLC interagit avec plusieurs types de cellules dont les cellules T, les cellules stromales, les cellules endothéliales ou les Nurse Like Cells (NLC). Ces cellules échangent de nombreux signaux qui peuvent être des facteurs solubles (chimiokines, cytokines, facteurs WNT) ou des facteurs membranaires (CD40L, APRIL, BAFF, CD31, intégrines). Un ensemble de signaux qui participent à la survie et la prolifération de ces cellules de LLC.

D'après Kipps et al., 2017 (120).

c. Les facteurs anti-apoptotiques dans la LLC

Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 interviennent également dans la physiopathologie de la LLC et sont régulées par le microenvironnement. La co-culture de cellules de LLC avec les cellules stromales montre une augmentation du niveau d'expression de Mcl1 et d'autres protéines de la famille Bcl-2 dans les cellules B de LLC (140). Les protéines de la famille Bcl-2, qui peuvent être pro ou anti-apoptotiques sont importantes dans la régulation de l'apoptose, impliquant les caspases. Les cellules de LLC, en état de stress permanent expriment des niveaux importants du facteur pro-apoptotique Bim. Cependant leur protection contre l'apoptose passe par une expression compensatoire du facteur anti-apoptotique Bcl-2 qui séquestre et bloque Bim (141). Ces expressions, dans la LLC sont liées à la sous-expression de microARNs (MirRNAs) tels que miR15 et miR-16, des gènes suppresseurs de tumeur qui régulent négativement le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (25).

D'autres protéines anti-apoptotiques de la famille dont BclxL sont sur-exprimées dans ces cellules tandis que les facteurs pro-apoptotiques tels que Bax sont sous-exprimés. De ce déséquilibre résulte un défaut d'apoptose des cellules leucémiques. En plus de favoriser la survie des cellules leucémiques, ces protéines sont décrites comme des facteurs clés de la résistance aux traitements.

En outre, ce dysfonctionnement des mécanismes de l'apoptose observé chez tous les patients atteints, une capacité proliférative des lymphocytes B leucémiques est démontrée. Celle-ci se traduit notamment par la variabilité des présentations cliniques et l'hétérogénéité des marqueurs biologiques dont ceux déjà évoqués dans la première partie de ce chapitre.

3. La LLC : une pathologie hétérogène

La LLC est une pathologie hétérogène pour laquelle on distingue deux types de patients avec deux formes cliniques dues à d'importantes différences biologiques des cellules B leucémiques impliquées. D'autre part, au sein d'un même patient, les lymphocytes B peuvent présenter des différences phénotypiques, fonctionnelles.

a. L'hétérogénéité inter-patients

❖ Les LLC-M à IgHV mutée versus les LLC-NM à IgHV non mutée

On peut discriminer deux types de patients : les patients dont les cellules expriment des IgM à IgHV mutée (LLC-M) (environ 60%) qui présentent une forme indolente de la pathologie et les patients à IgHV non mutées (LLC-M) qui ont une forme plus agressive de la maladie ([108](#)). La poly/auto-réactivité des cellules B-LLC avec un statut non-muté les apparente à la lignée murine B1a, avec le marqueur CD5 à la surface et un fort potentiel de transformation. À l'inverse, dans les LLC-M on retrouve surtout des lymphocytes B dans un état d'anergie. Ces cellules ne s'activent pas en réponse à une stimulation chronique du BCR et ne prolifèrent pas. Ceci pourrait expliquer la forme indolente de la pathologie retrouvée chez les patients à LLC-M ([142](#)). D'autre part, les patients ayant des cellules avec des immunoglobulines non-mutées présentent plus fréquemment d'autres mutations, en accord avec une évolution clinique péjorative. Ces mutations correspondent à des événements plus tardifs à la différence des mutations dominantes sous forme clonale comme celle de MYD88, la trisomie du chromosome 12 ou la délétion 13q ([111](#), [112](#)).

Le destin de ces cellules B leucémiques (réactivité ou anergie) peut être influencé par leur origine, leurs caractéristiques génétiques ou encore leur profil épigénétique. Une programmation épigénétique qui se fait sous le contrôle de facteurs de transcription et qui joue un rôle clé dans le développement de la pathologie ([143](#)).

❖ Des patients LLC « Répondeurs » ou « Non Répondeurs »

La distinction des deux entités basées sur le statut mutationnel des IgHV montre l'importance du BCR dans l'évolution de la pathologie. La stimulation du BCR joue un rôle clé dans la prolifération et la survie du lymphocyte B, qu'il soit sain ou pathologique.

Bien que les cellules B de LLC présentent une faible expression des immunoglobulines membranaires, ces cellules expriment un certain nombre de marqueurs d'activation tels que CD23, CD25 ou CD27. Après stimulation du BCR, *in vitro* par un anti-IgM, l'apoptose des cellules B de 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 ([144](#)). Les patients dont les cellules ne présentent pas d'augmentation de la survie cellulaire *in vitro*, appelés patients « non-répondeurs » (NR) présentent également des facteurs de bon pronostic, et une forme indolente de la pathologie. Les patients dits « répondeurs » (R) ont des cellules qui répondent à la stimulation antigénique qui ont une survie globale réduite par rapport aux autres. Tout comme cela était le cas pour la distinction basée sur le statut mutationnel des IgHV, le statut de réponse à la stimulation du BCR permet de prédire l'évolution de la pathologie et la survie des patients. De plus, les patients « répondeurs » ont des cellules B exprimant des niveaux plus importants d'IgM et de protéines du signalosome telles que Syk et ZAP-70 ([145](#)) (**Figure 19**). Une récente étude de notre équipe a montré que ces patients majoritairement à IgHV non mutées présentent une diminution plus importante de l'expression du récepteur aux chimiokines, le CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) à la surface de leurs cellules B et développent plus facilement des lymphadénopathies que les patients « non-répondeurs » ([146](#)).

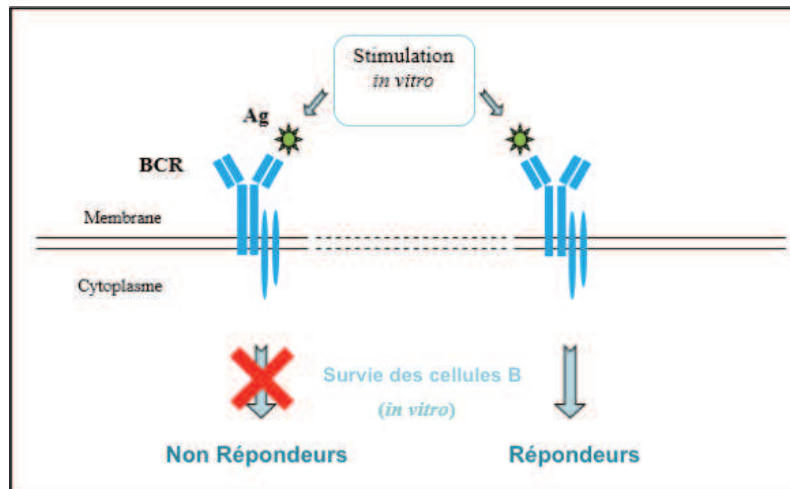


Figure 19: Identification de 2 groupes de patients en fonction de la réponse à la stimulation du BCR

La réponse des cellules de patients à la stimulation, *in vitro*, du récepteur à l'antigène (BCR) par un anti-IgM permet de séparer les patients en deux groupes, les « répondeurs », dont les cellules répondent à la stimulation par une survie augmentée et les « non répondeurs » dont la survie des cellules reste inchangée.

D'après Le Roy et al., 2012 ([145](#)).

De manière parallèle à cette différence de réponse à la stimulation du BCR on retrouve une activation différentielle des cellules suite à la stimulation des TLRs. En effet, l'activation des TLR7 et TLR9 par l'imiquimod et le CpG induit la prolifération des lymphocytes B chez les patients LLC-NM alors qu'elle induit l'apoptose des cellules de patients M-LLC.

En revanche la co-stimulation de ces TLRs et du BCR par un anti-IgM entraîne la prolifération des cellules B chez les deux groupes de patients mais avec des différences au niveau de la vitesse et la durée de la réponse ([147](#)). Les lymphocytes B présentent donc des différences phénotypiques et fonctionnelles d'un type de patients à un autre. Néanmoins, des différences de survie et de prolifération sont aussi retrouvées au sein d'un même patient.

b. L'hétérogénéité intra-patients

Les lymphocytes B de LLC se caractérisent par l'expression du CD5, ces cellules pourraient dériver de cellules B-1a exprimant le même facteur. Le CD5, principal marqueur des cellules de LLC a été décrit pour son rôle dans leur survie et leur maintien (148). Ce facteur participe au développement de la pathologie, via l'activation de la PKC (149). Une autre étude a démontré que le CD5 entraîne aussi la production d'IL-10 par ces cellules B de LLC (150).

Dans une étude faite sur la souris transgénique Tc1 (modèle murin de la LLC), DiLillo et al., ont pu montrer, par cytométrie que les médianes de fluorescence du CD5 des cellules IL-10(+) sont plus élevés que celles des IL-10 (-) (102).

Cette production d'IL-10, soulève la question de capacités régulatrices d'une sous-population de cellules B de LLC similaires à celles des Bregs décrites précédemment et capable de moduler la réponse lymphocytaire T CD4+. Le phénotype de ces lymphocytes B régulateurs reste controversé, 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 chez l'homme sont les lymphocytes B CD24^{hi}CD38^{hi} et CD24^{hi}CD27⁺. Dans la LLC, une nouvelle stratégie 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. Ainsi, en plus d'une hétérogénéité entre patients, on retrouve une hétérogénéité sous-clonale au cours de la LLC. Cette hétérogénéité intra-patients se caractérise par l'émergence de certains sous-clones favorisés par les facteurs du microenvironnement au profit d'autres.

L'émergence de sous-clones qui pourraient être corrélés à leurs capacités d'immunorégulation et de production d'IL-10.

IV. Les interleukines 6 et 10, facteurs clés de l'immunorégulation

Le dialogue entre les lymphocytes B et les autres cellules du microenvironnement repose notamment sur un échange de signaux tels que les cytokines. Les cellules B de LLC au même titre que les cellules B régulatrices produisent de l'IL-10. Dans ce chapitre, les fonctions et l'implication en physiopathologie de cette cytokine sont comparés à ceux d'une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6.

1. Implications physiopathologiques de cytokines pro- ou anti- inflammatoires

a. Une cytokine pro-inflammatoire : l'IL-6

❖ L'interleukine 6

Découvert en 1986, et au départ connu comme un facteur de différenciation des cellules B, cette cytokine était au départ appelée BSF-2 (B cell stimulatory factor-2) ([151](#)). Membre de la famille de cytokine de même nom qui inclus l'IL-11, l'IL-27 ou l'IL-31, ce facteur a par la suite été reconnu comme étant un marqueur de l'inflammation. L'interleukine 6 est un polypeptide de 26kDa dont le gène est situé sur le chromosome 7p21. Son expression a premièrement été montrée dans les monocytes et les macrophages en réponse à la stimulation des TLRs. Cette cytokine a été par la suite identifiée dans d'autres types de cellules comme les lymphocytes, les fibroblastes, les hépatocytes ou les cellules tumorales. Synthétisée dans les phases initiales d'inflammation, l'IL-6 atteint le foie via la circulation sanguine et induit la production de protéines, marqueurs de l'inflammation aiguë telles que la protéine C réactive (CRP) et le sérum amyloïde A (SAA). Ce facteur agit sur différents types de cellules afin d'assurer et d'entretenir la réponse inflammatoire. Elle stimule en effet, la différenciation des lymphocytes T en Th17, tout en inhibant la différenciation en Tregs ([152](#)) (**Figure 20**). Ce facteur participe à la maturation des lymphocytes B en plasmocytes, augmente la production d'anticorps et permet aussi de recruter les monocytes et neutrophiles sur le site de l'inflammation ([153](#)).

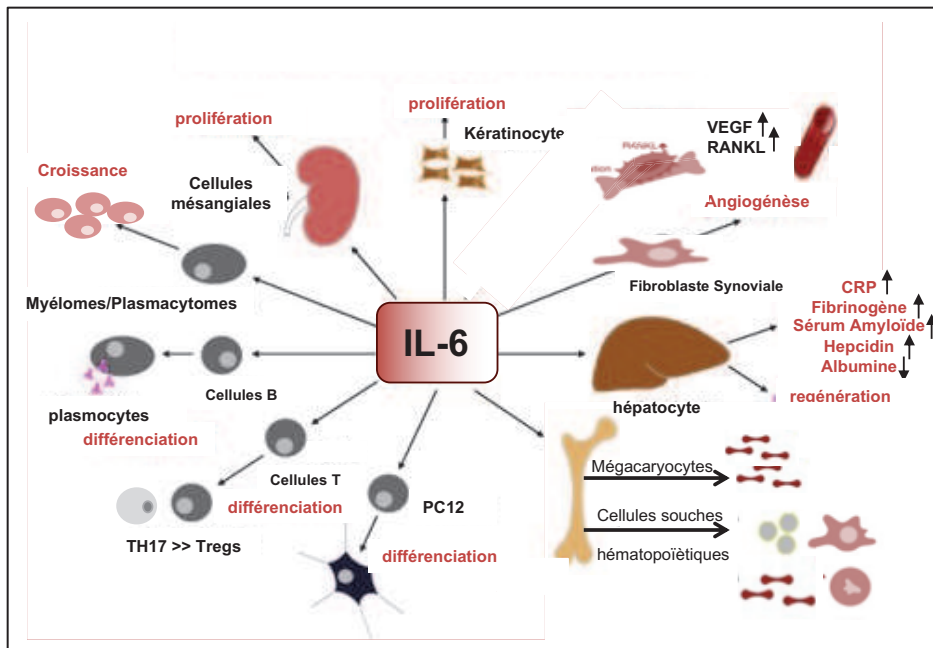


Figure 20: L'IL-6, une cytokine aux multiples fonctions biologiques

Adapté de Tanaka et al., 2012 (154).

Cette cytokine aux multiples fonctions biologiques agit en se fixant sur un récepteur exprimé à la surface de ces cellules cibles. Le récepteur à l'IL-6 (IL-6R) est constitué de deux molécules, l'IL-6R α (gp80 ou CD126) et l'IL-6R β (gp130 ou CD130). La fixation de l'IL-6 à l'IL-6R α entraîne l'homo-dimérisation de deux molécules de gp130 formant avec l'IL-6 et l'IL-6R α , un complexe tri-moléculaire de haute affinité. L'IL-6R α qui existe sous une forme transmembranaire (mIL-6R) ou soluble (sIL-6R) n'est pas capable d'induire la transduction d'un signal sans la fixation du complexe IL-6/IL-6R α aux gp130 (155). Alors que le récepteur mIL-6R α est exprimé de manière ubiquitaire, le sIL-6R est issu de clivages enzymatiques de la forme membranaire par les métalloprotéases ADAM17, ou d'épissages alternatifs. La fixation de la cytokine à la gp80 soluble ou membranaire, puis aux gp130 aboutit à l'activation de deux types de signalisations, une signalisation dite « classique » et une « trans-signalisation ». Contrairement à la majorité des récepteurs solubles qui entrent en compétition avec les récepteurs membranaires et agissent comme antagonistes, le sIL-6R agit comme un agoniste et active une voie de signalisation. Ce mécanisme de trans-signalisation, via un récepteur soluble permet ainsi, à l'IL-6 d'agir sur des cellules non leucocytaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales ou tumorales qui n'expriment pas d'importants niveaux d'IL-6R à leur surface et augmente la capacité de ces cellules à répondre dans un contexte inflammatoire (156) (Figure 21).

La fixation de la cytokine va activer plusieurs voies de signalisation, initiées par les gp130 comme les voies JAKs/STATs des MAPKs ou PI3K, qui seront décrites dans la seconde partie du chapitre (157). Deux types de signalisation activent les mêmes effecteurs mais qui pourraient être impliquées dans deux types de fonctions. La signalisation classique, impliquée dans la réponse immune innée, intervient dans la défense contre les infections et la régénération des tissus pour réguler une réponse de type anti-inflammatoire. En revanche, la trans-signalisation est impliquée dans le recrutement de lymphocytes et de monocytes au niveau du site d'inflammation pour activer une réponse inflammatoire (156). Selon le contexte et le type cellulaire, l'IL-6 initialement décrite comme étant une cytokine pro-inflammatoire peut donc présenter des propriétés anti-inflammatoires. Cette cytokine pro ou anti-inflammatoire, aux multiples fonctions biologiques peut jouer un rôle clé dans le développement de pathologies auto-immunes, ou de cancers.

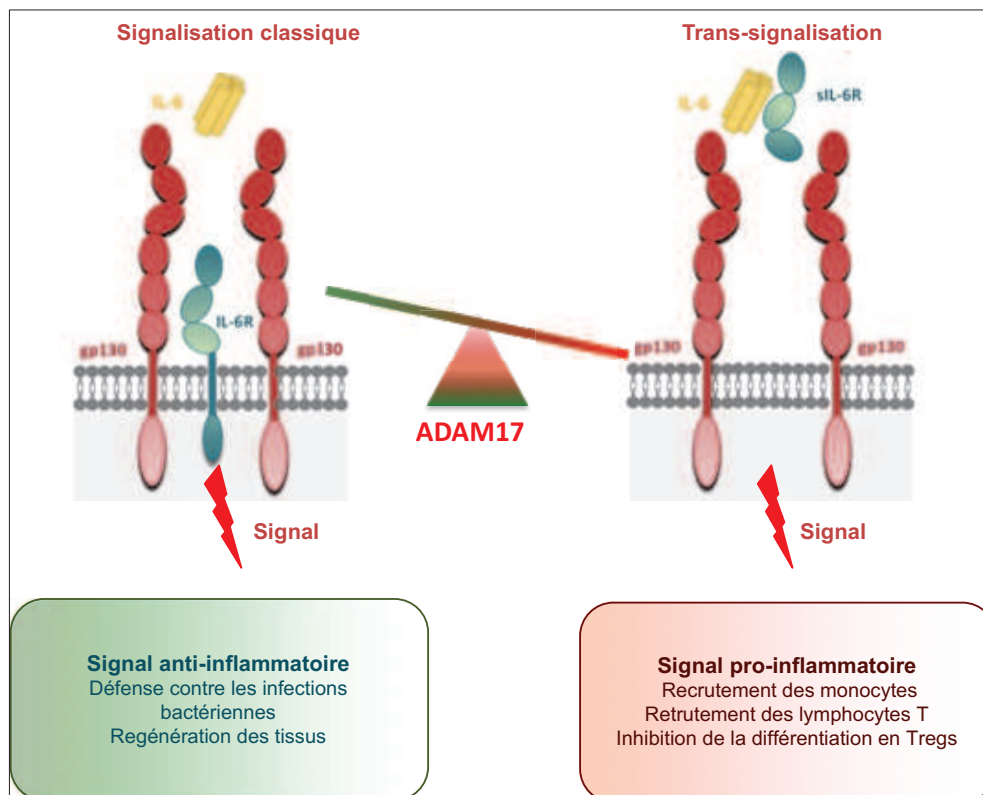


Figure 21: Signalisation classique ou trans-signalisation de l'IL6

Dans la signalisation classique, l'IL-6 se fixe à l'IL-6R trans-membranaire. Le complexe s'associe aux gp130 pour induire la transduction d'un signal de type anti-inflammatoire. Dans la Trans-signalisation, l'IL-6 se fixe à un IL-6R soluble (sIL-6R) issu du clivage des IL-6R par la protéase ADAM17. Suite à la fixation aux gp130, le complexe formé induit la transduction d'un signal pro-inflammatoire.

Adapté de Rose-John et al., 2017 (156).

❖ L'IL-6 dans l'auto-immunité

L'IL-6 contrôle l'inflammation et les facteurs impliqués dans la résolution de l'inflammation. Une production persistante ou excessive de cette cytokine peut déclencher une inflammation chronique à l'origine de maladies inflammatoires ou auto-immunes. Des niveaux importants d'IL-6 ont été retrouvés dans le sérum de patients atteints de pathologies inflammatoires telles que la PR, la LES ou la Sclérodémie systémique (SSc) ([153](#)).

Cette cytokine joue un rôle sur la différenciation des lymphocytes T en Th1 ou Th17 et participe à l'entretien d'un environnement pro-inflammatoire comme cela a pu être montré dans le modèle murin d'EAE ([30](#)). L'IL-6 agit également sur l'activation et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes pour la production d'anticorps. Une production dérégulée d'IL-6 conduit à une expression constitutive des enzymes RAG par les lymphocytes B. Une production excessive d'auto-anticorps (anti-dsADN) est retrouvée chez les patients atteints de LES ([158](#)). Dans la Sclérodémie systémique (SSc), une pathologie caractérisée par des fibroses de la peau et des organes internes, l'IL-6 participe à l'inflammation chronique et stimulerait la sécrétion de collagène par les fibroblastes de la peau et leur différenciation en myofibroblastes ([159](#)).

❖ L'IL-6 dans les cancers

L'inflammation chronique est souvent associée à des transformations malignes pouvant conduire à des cancers. L'IL-6, principal médiateur de cette inflammation est en effet surexprimé dans de nombreux cancers solides ou hématopoïétiques. Cette cytokine joue un rôle central dans les processus tumoraux tels que la prolifération, la résistance à l'apoptose, l'angiogenèse ou encore la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). L'IL-6 induit le VEGF (Vascular endothelial growth factor), facteur clé de l'angiogenèse, l'invasion et la TEM dans des cancers comme le cancer du sein ([153](#)). Dans le système hématopoïétique, l'IL-6 a un rôle clé sur le développement et la croissance de tumeurs impliquant notamment, les lymphocytes B. L'expression constitutive d'IL-6 dans des lymphocytes B transformés au virus de l'Epstein-Barr (EBV) et transférés dans des souris transgéniques conduit au développement de lymphomes ([160](#)).

Des niveaux élevés d'IL-6 ou de sIL-6R ont été retrouvés dans le sérum de patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs tels que les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) (161) ou la LLC (162) et corrélés à un mauvais pronostic. De façon intéressante, tout comme notre équipe l'a démontré dans les lymphomes à cellules du manteau (LCM), des régulations autocrines et paracrines de l'IL-6 passent par une activation constitutive du facteur de transcription STAT et jouent un rôle important dans la survie des lymphocytes B (163). Par ailleurs, des niveaux importants de récepteurs à l'IL-6 solubles et membranaires ont été décrits dans les LCM et LLC (164). L'IL-6 induit ainsi l'activation de STAT3 et l'expression de nombreuses protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, BclxL ou Mcl-1. La régulation autocrine ou paracrine de l'IL-6, impliquée dans la régulation de ces gènes anti-apoptotiques a été montrée comme pouvant jouer un rôle essentiel dans la survie des cellules de LLC et leur résistance au traitement. Selon les auteurs de cette étude, les cellules de LLC expriment des niveaux plus importants de récepteurs à l'IL-6 à leur surface lorsqu'elles expriment la protéine ZAP70 ou que les patients possèdent la délétion 11q- ou 17p-. Ces cellules montrent une résistance à l'apoptose, induite par la chimiothérapie plus importante que les cellules exprimant moins de récepteurs. En plus de son rôle sur la survie de cellules, l'IL-6 pourrait inhiber la prolifération des cellules de LLC, entraîner l'arrêt du cycle cellulaire et un blocage en phase G0 (165).

Le blocage de l'IL-6 ou de la voie de signalisation associé pour le traitement de toutes ces pathologies fait l'objet de plusieurs études. Le Tocilizumab est un anticorps chimérique anti-IL6R qui bloque la fixation de la cytokine aux récepteurs membranaires ou solubles (166). Dans la Ssc, les patients traités au Tocilizumab présentent une amélioration de la texture et de l'épaisseur de la peau avec une diminution des niveaux de collagène dans les tissus (167). Dans la LLC, Liu et al., ont montré que les cellules traitées étaient plus sensibles au traitement par chimiothérapies (165).

b. Une cytokine anti-inflammatoire : l'IL-10

❖ L'interleukine 10 et son récepteur

Au départ décrit chez la souris comme étant un facteur inhibiteur de la synthèse de cytokines (CSIF : Cytokine Synthesis Inhibitor Factor) produit par les cellules Th2 (169), l'interleukine 10 (IL-10) est une cytokine anti-inflammatoire de classe II, membre de la superfamille du même nom qui inclut IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 et IL-29. Cette protéine homodimérique de 37kDa produite par de nombreuses cellules de immunitaires comme, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, ou les lymphocytes régule à la fois l'immunité innée et adaptative (170). L'IL-10 agit sur un grand nombre de types cellulaires en se fixant à un récepteur exprimé de façon constitutive, formé de deux types de chaînes, une chaîne α (IL-10R1) de haute affinité sur lequel se fixe la cytokine, et une chaîne β (IL-10R2) sur laquelle se fixe le complexe formé par la cytokine et l'IL-10R1, activant ainsi les voies de signalisation associées. La fixation de l'IL-10 à son récepteur conduit à l'activation de la voie JAK/STAT via la trans-phosphorylation des kinases de la famille JAK (JAK1 et Tyk2) suivi de la phosphorylation des résidus tyrosines situés dans la région intra-cytoplasmique des IL-10R1. Les facteurs de transcription STATs sont alors recrutés, phosphorylés par les JAKs et une fois activés, régulent l'expression de gènes cibles spécifiques (168) (Figure 22).

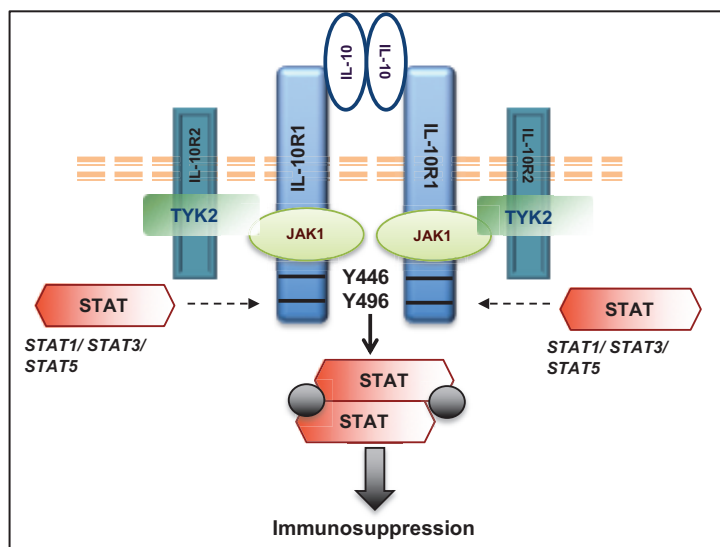


Figure 22: L'IL-10 et son récepteur

L'IL-10 se fixe à l'IL-10R1 conduisant à la trans-activation des kinases JAK1 et TYK2 puis à la phosphorylation des tyrosines Y446 et Y496 situées dans la partie intra-cytoplasmique des IL-10R1. Les facteurs de transcription de la famille STAT (STAT1, STAT3 ou STAT5) sont alors phosphorylés pas les kinases JAK. Cette phosphorylation activatrice entraîne leur dimérisation puis leur translocation nucléaire pour réguler la transcription de gènes notamment impliqués dans l'immunosuppression. *Adapté de Mosser et al., 2008 (168).*

Comme nous avons pu l'évoquer dans le second chapitre, la cytokine exerce une fonction immunosuppressive et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6 ou l'IL-12 par les monocytes, les macrophages ou les cellules T Iwata ([52](#), [171](#)). L'IL-10 agit aussi sur la différenciation des T CD4+ en favorisant le développement de Tregs ([36](#)). Cette cytokine peut également inhiber la production de certaines chimiokines tels que les MIP (Macrophages Inflammatory Protein) ou les MCP (Monocytes Chemo attractant Protein), empêchant ainsi le recrutement de cellules sur les sites inflammatoires. En plus de cette fonction immunosuppressive, l'IL-10 agit sur la survie et la prolifération des cellules via l'activation de la voie JAK/STAT dont les mécanismes seront détaillés dans la prochaine partie.

❖ L'IL-10 dans les pathologies immunes

L'IL-10 joue un rôle clé dans la résolution de l'inflammation suite à des infections par des agents pathogènes. Cependant, une importante production d'IL-10 peut également permettre aux agents pathogènes d'échapper aux contrôles immunitaires entraînant des infections chroniques comme cela a pu être évoqué dans le second chapitre. La résolution de l'inflammation requiert une réponse coordonnée commençant par des mécanismes inflammatoires pour éliminer le pathogène mais rapidement suivis de la production de cytokines anti-inflammatoires afin de stopper l'inflammation et éviter toutes lésions chroniques. En effet, l'absence de cette cytokine et un défaut de lymphocytes B producteurs d'IL-10 sont associés à la production de facteurs pro-inflammatoires conduisant à des pathologies comme la PR ou les LES ([91](#), [92](#)). L'IL-10 peut donc avoir un rôle protecteur en limitant les inflammations chroniques mais cette cytokine peut aussi participer au développement de pathologies comme les LES où elle participe à la production d'auto-anticorps et dont les niveaux dans le sérum sont corrélés à la sévérité de la pathologie ([172](#)).

❖ L'IL-10 dans les cancers

Cette double fonction physiopathologique est retrouvée dans le cas des cancers. Dans certains modèles murins de cancers, l'IL-10 a une fonction anti-tumorale et inhibe le développement de cancers.

L'injection d'IL-10 conduit au rejet des tumeurs implantées associé à d'importantes productions de granzyme B, d'IFN γ et le recrutement de lymphocytes T cytotoxiques

(CTLs) ([173](#)). Néanmoins, l'IL-10 est surtout connu pour contribuer à la croissance tumorale en agissant sur l'échappement des cellules tumorales aux défenses immunitaires. Des niveaux importants d'IL-10 dans le sérum ou dans les tumeurs sont corrélés à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers, mélanomes et lymphomes ([174](#)). Produite par les cellules du microenvironnement tumoral telles que les lymphocytes et les macrophages associés aux tumeurs (TAMs : Tumor associated macrophages), l'IL-10 peut également être produite par les cellules tumorales elles-mêmes comme dans le cas de lymphomes B à grandes cellules (LBDGC). Dans cette pathologie, l'IL-10 qui agit de manière autocrine sur la prolifération et la survie de ces cellules qui expriment d'importants niveaux d'IL-10R à leur surface ([175](#)). Une régulation autocrine de cette cytokine a en effet été montrée dans plusieurs modèles de cancers comme le lymphome à cellules du manteau (LCM) ([163](#)). Des niveaux importants d'IL-10 dans le sérum de patients atteints de LLC ont été corrélés à un mauvais pronostic ([162](#)). Dans ce contexte, les cellules B exprimant le CD5, ont été décrites comme étant des cellules qui partagent de nombreuses similitudes avec les Bregs, des cellules productrices d'IL-10 ayant des fonctions immunosuppressives ([102](#)). L'implication du CD5 et d'autres facteurs comme les TLRs ou le BCR, dans la production de cette cytokine a également été décrite et sera détaillée dans la prochaine partie. Plusieurs études ont déjà montré que cette cytokine inhibe à la fois la prolifération et l'apoptose des cellules de LLC participant ainsi au maintien de la pathologie ([176](#), [177](#)). L'IL-10 est donc un facteur clé dans le développement et la progression de la LLC agissant sur la survie des lymphocytes B mais pouvant surtout agir sur les cellules environnantes et assurer le développement de la pathologie. Les cellules de LLC présentent des capacités variables à produire l'IL-10. En effet, plusieurs études montrent que les cellules de LLC-M (patients à Immunoglobuline mutées) produisent plus d'IL-10 que les cellules de LLC-NM ([178](#)). Une étude récente a montré que les niveaux de méthylation du gène de l'IL-10 étaient inversement corrélés aux niveaux d'IgM exprimés par les cellules de LLC ([179](#)).

❖ Le blocage de l'IL-10

L'IL-10 pouvant avoir deux types de fonctions dans le développement de pathologies, son blocage ou à l'inverse, sa stimulation peut constituer une approche thérapeutique intéressante pour le traitement de pathologies inflammatoires ou de cancers.

L'administration d'IL-10 exogène pour le traitement de pathologies auto-immunes caractérisées par un défaut de production de cette cytokine a permis de limiter l'inflammation dans le cas du Psoriasis (180). Cette administration d'IL-10 ne se montre en revanche pas toujours très efficace. Un manque d'efficacité qui peut être dû à la courte durée de vie de cette protéine recombinante qui est inférieure à 5h (181). Les notions de temps, de durée et de localisation sont très importantes pour permettre à l'IL-10 d'agir efficacement dans la résolution de l'inflammation ce qui rends son utilisation en immunothérapie complexe. De nombreuses études se sont focalisées sur le blocage des récepteurs à l'IL-10 pour bloquer la voie et la fonction immunosuppressive de la protéine. Dans les cancers, la combinaison de facteurs immunostimulateurs comme les agonistes des TLRs et d'antagonistes de l'IL-10 permet aux macrophages et aux cellules dendritiques associés à la tumeur de retrouver leurs fonctions et d'induire des réponses cytotoxiques (182). Les effets du blocage de l'IL-10R ont également été étudiés dans les LBDGCs. L'importante expression des récepteurs à l'IL-10 à la surface des cellules pathologiques impliquée dans une régulation autocrine de la cytokine permet de cibler plus facilement ces cellules et de bloquer la boucle de régulation autocrine. Ce traitement conduit à l'inhibition de la voie JAK/STAT3 et induit l'apoptose de des cellules du lymphome (175).

c. Un équilibre IL-6/ IL-10 ?

L'IL-6 et l'IL-10 sont deux cytokines dont les rôles principaux sont opposés, sont aussi différemment exprimées par les lymphocytes B au cours de l'inflammation. En effet, si l'IL-6 est exprimée par les lymphocytes B au cours des phases aiguës de l'inflammation, l'IL-10 intervient au cours des phases de rémission. Dans un contexte physiologique, un équilibre entre ces deux cytokines est primordial pour assurer le développement et la résolution des processus d'inflammation. L'IL-6 et l'IL-10, aux fonctions opposées sont différemment régulées même si elles peuvent activer les mêmes facteurs tel que STAT3.

Plusieurs études ont montré que dans certains modèles, l'activation de STAT3 par l'IL-6 ou l'IL-10 conduit à l'activation de SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) qui se fixe aux gp130 et bloque la voie induite par l'IL-6 (183). Ainsi, en réponse à l'IL-6, STAT3 serait activé de façon transitoire pour conduire à un signal de type pro-inflammatoire. En l'absence de SOCS3, l'IL-6 induirait une réponse anti-inflammatoire de la même façon que l'IL-10 (184).

Paradoxalement, même si elle est activée par l'IL-10, la protéine SOCS3 ne se fixe pas à l'IL-10R et ne régulent pas la voie induite par cette cytokine. L'IL-10 induirait alors, une activation continue de STAT3 essentielle à son activité anti-inflammatoire (**Figure 23**).

Ces deux cytokines sont également capables de se réguler l'une l'autre. En activant SOCS3, l'IL-10 peut en effet inhiber la production d'IL-6 suggérant la présence d'un rétrocontrôle négatif de l'IL-6 via l'activation de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ([185](#)). Des stimulations de lymphocytes B avec l'IL-10 conduisent à des productions d'IL-6 par les lymphocytes B diminuées ([186](#)). À l'inverse, dans certains modèles comme des lignées de mélanome, l'IL-6 semble induire la production d'IL-10 qui en retour inhibe la production de cette cytokine pro-inflammatoire ([187](#)).

La durée et l'intensité d'activation de STAT3 par ces deux cytokines peut donc être différente dans certains modèles et induire une réponse de type pro- ou anti-inflammatoire, comme cela a été montré dans un modèle de cellules dendritiques ([188](#)).

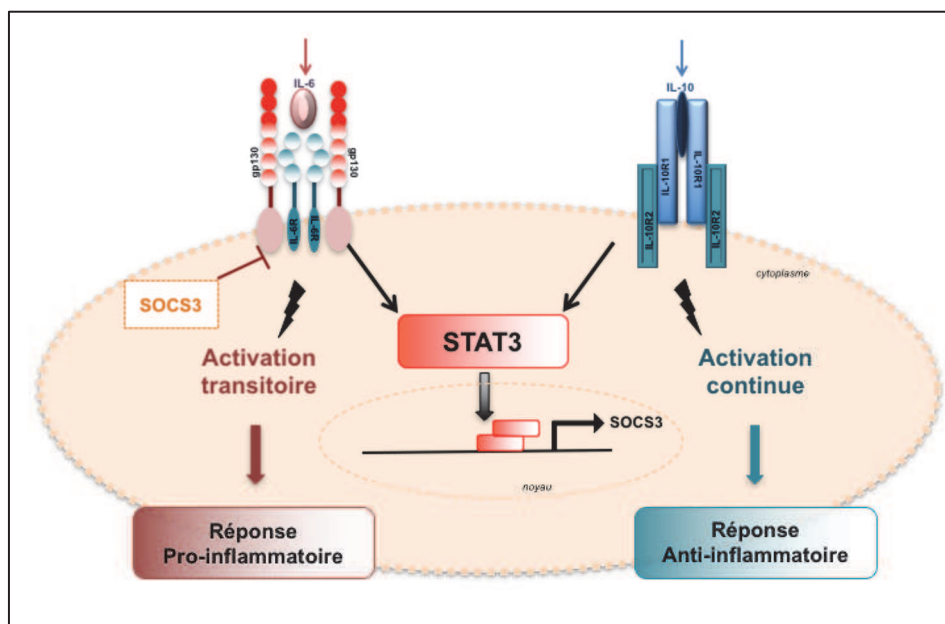


Figure 23: IL-6 et IL-10 : Un facteur activé, deux types de réponses

SOCS3, dont l'expression est induite via STAT3 par les deux cytokines inhibe la voie de l'IL-6 qui s'active donc de façon transitoire conduisant à une réponse pro-inflammatoire. La voie de l'IL-10, non bloquée par SOCS3, s'active de façon continue et conduit à une réponse de type anti-inflammatoire.

Inspiré de Wang et al., 2011 ([189](#)).

2. Les facteurs et voies de signalisation activés

a. Facteurs impliqués dans la régulation de ces cytokines

❖ La voie des TLRs

Comme nous avons pu le voir précédemment, la production de cytokines par les lymphocytes B se fait en réponse à des facteurs du microenvironnement. Parmi ces facteurs, de nombreux motifs activent les TLRs et induisent la production de cytokines, nécessaire à la protection contre les agents pathogènes. Ces récepteurs glycoprotéiques de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs : Pattern Recognition Receptors) reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns) ou à des dégâts cellulaires (DAMPs: Danger Associated Molecular Pattern). Les voies de signalisation activées par ces récepteurs ont surtout été étudiées dans les macrophages et les cellules dendritiques. Toutefois, de plus en plus d'études portent sur les lymphocytes B et montrent l'implication de ces voies dans la production des interleukines 6 et 10 ([190](#)). La stimulation des TLRs active une cascade de signalisation commençant par le recrutement de protéines adaptatrices, les MyD88 qui possèdent un domaine TIR (Toll-IL1R) permettant leur ancrage aux TLRs et un domaine DD (Death Domain) qui leur permet d'interagir avec des Sérine/Thréonine kinases dotées du même domaine comme les kinases IRAK (IL1R Associated Kinase). Suite à une cascade d'activations, les IRAK conduisent à l'activation du facteur NF- κ B qui transloque vers le noyau et induit la transcription de gènes cibles dont les gènes des cytokines IL-6 et IL-10 ([191](#)) (**Figure 24**).

Dans le contexte de la LLC, plusieurs équipes ont comparés les niveaux d'expression des différents TLRs à la surface des cellules B de LLC par rapport à des lymphocytes normaux et ont montré une expression plus importante des TLR7 et TLR9 sur les cellules de LLC alors que les TLR4 et TLR2 sont plus faiblement exprimés ([192](#)). Une récente a montré que leur expression différentielle influence le statut clinique des patients. Si la faible expression des TLR4 est associée à un mauvais pronostic, l'expression des TLR9 est associée à un meilleur pronostic ([193](#)). L'activation de ces récepteurs pour induire la production de cytokines peut être associée à celle du BCR et du CD40L ([194](#)).

❖ La voie du BCR et du CD40L

L'activation du BCR participe en effet à la production de cytokines par les cellules B. Dans la LLC, cette voie est caractérisée par l'activation constitutive des kinases LYN, SYK, ERK et de l'hyper-activation de BTK. Plusieurs études ont montré l'implication des protéines du signalosome dans la production de cytokines. En effet, l'inhibition de SYK dans des modèles murins et humains de LLC conduit à une réduction de la capacité des cellules de LLC à produire de l'IL-10 ([131](#), [179](#)). Une capacité à produire l'IL-10 qui se trouve aussi diminuée suite au traitement des patients à l'ibrutinib démontrant l'implication de BTK ([195](#)). Dans la LLC, la voie du BCR et celle du CD40 induisent l'activation de NF-κB et STAT3, deux facteurs de transcription clés dans la régulation des cytokines. Une récente étude a montré que la stimulation du BCR augmente les niveaux d'activation de NF-κB et la phosphorylation de STAT3 induisant une production plus importante d'IL-6. Les auteurs suggèrent que cette phosphorylation de STAT3 résulterait d'une boucle autocrine formée par l'IL-6 produite par la cellule suite à l'activation de NF-κB ([196](#), [197](#)) (**Figure 24**).

❖ Autres facteurs inducteurs

D'autres facteurs comme les BAFF, considérés comme étant des « stimulus naturels » induisent la production d'IL-6 et d'IL-10 par les cellules B ([63](#)). Dans la LLC cette induction se fait plus précisément via les récepteurs TACI (Transmembrane Activation and cyclophilin ligand Interactor) ([198](#)). Plusieurs équipes ont montré l'implication du CD5 dans la production d'IL-10 via l'activation des facteurs NFAT2 et STAT3 ([150](#), [199](#)) ont plus récemment montré l'implication des MAPKs et de ERK1/2 dans cette induction par le CD5 ([200](#)). Enfin, une récente étude, dans la LLC, évoque l'implication du CXCR4 dans la régulation de l'IL-10 passant par l'activation de STAT3 ([201](#))

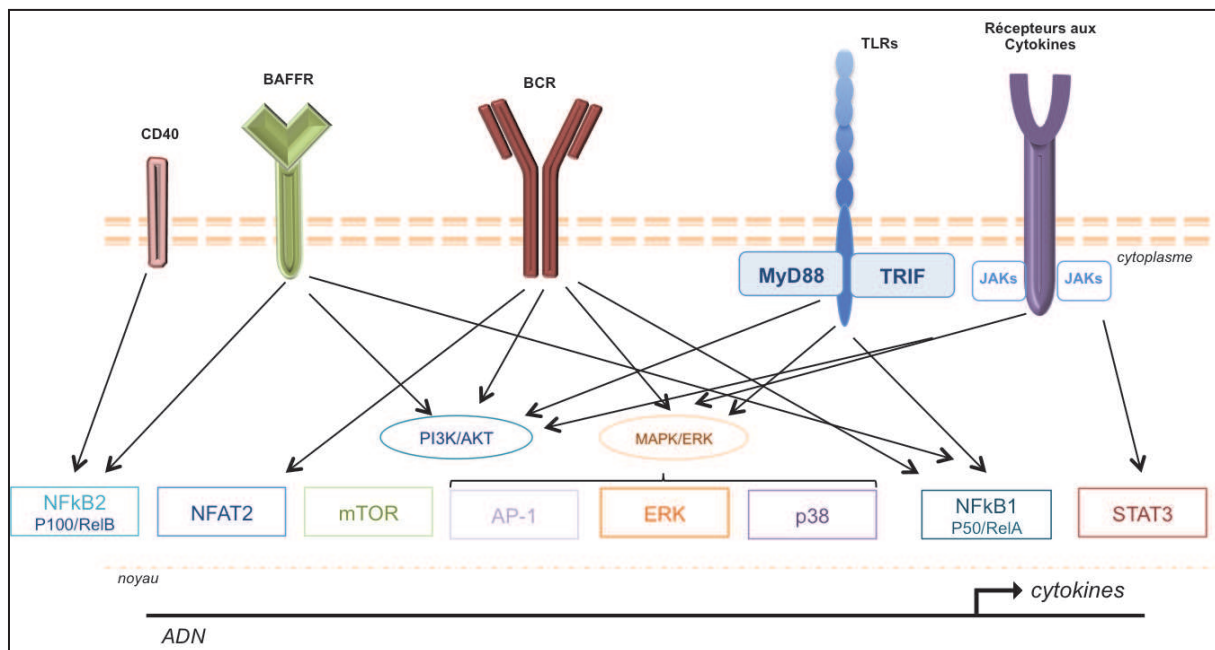


Figure 24: Voies impliquées dans la production de l'IL-6 et l'IL-10

Les cytokines peuvent induire leur propre production via STAT3. La stimulation des TLRs active la voie NFkB 1 via les adaptateurs MyD88. La voie NFkB 1 également activée par le BCR et les BAFF-R joue un rôle clé dans la régulation des cytokines. Les récepteurs BAFF activent aussi la voie NFkB 2 de la même façon que le CD40. Les voies PI3K/AKT et des MAPKs se trouvent être impliquées dans la régulation des cytokines. Ces voies sont activées par plusieurs types de récepteurs tels que le BCR, les BAFF-R, les TLRs ou les récepteurs aux cytokines. L'ensemble des facteurs activés par ces voies induit la production de différents types de cytokines. TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

b. Voies activées par ces cytokines

❖ Voies de signalisation induites par l'IL-6

Contrairement aux récepteurs de facteurs de croissance, les récepteurs aux cytokines ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque. Au niveau intracytoplasmique, la sous-unité gp130 de l'IL-6R possède des domaines de liaison à des protéines kinases appartenant à la famille des Janus kinases (JAK). Suite à la fixation de la cytokine, les kinases JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) associées vont s'activer mutuellement par transphosphorylation et conduire à la phosphorylation des résidus tyrosine présents sur le domaine intracytoplasmique des sous unités gp130. Quatre tyrosines (Y767, Y814, Y905, Y915) forment un motif appelé YXXQ, responsable de l'activation des facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). L'IL-6 en se fixant à son récepteur va activer plusieurs autres voies en plus de la voie JAK/STATs, des voies notamment impliquées dans la survie et la prolifération des cellules. Parmi les six résidus tyrosines présents dans cette région, le résidu tyrosine (Y759), situé à l'intérieur d'un motif permet le recrutement puis l'activation de la protéine SHP-2 (Src-homology tyrosine

phosphatase 2). L'activation de la protéine SHP-2 par l'IL-6 conduit à l'activation des MAPKs, impliquées dans les mécanismes de prolifération, de différenciation et la production de cytokines. SHP-2 conduit aussi l'activation de la voie PI3K/AKT impliquée dans les mécanismes de survie et la résistance à l'apoptose ([157](#)). (**Figure 25**).

❖ Voies de signalisation induites par l'IL-10

La voie JAK/STAT est la voie la mieux décrite suite à l'activation du récepteur à l'IL-10. La fixation de l'IL-10 sur son récepteur active par trans-phosphorylation des résidus Y446 et Y496, les kinases JAK1 et TYK2 respectivement associées aux chaînes α et β . Ces deux tyrosines phosphorylées permettent au récepteur de l'IL-10 de recruter et de phosphoryler les facteurs de transcription STATs. Les voies de signalisations activées par l'IL-10 ne sont pas aussi bien décrites que pour l'IL-6. Plusieurs études montrent que l'IL-10 serait également capable d'activer la voie PI3K/AKT pour influencer la survie des cellules comme cela a pu être montré pour les monocytes. L'IL-10 peut aussi activer la voie des MAPKs en activant la protéine p38. La principale fonction de l'IL-10 dans la régulation des réponses immunes passerait essentiellement par le facteur STAT3 ([202](#)) (**Figure 25**).

3. La voie JAK/STAT3 au centre de la régulation

Les cytokines IL-6 et IL-10 activent ainsi la voie JAK/STAT3 une activation essentielle à la régulation de la réponse immune par ces cytokines. En plus de cette fonction dans les réponses immunitaires, STAT3 module la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la survie, la différenciation ou encore l'angiogenèse plaçant ce facteur au centre du développement et de la progression de nombreux cancers ([203](#)). En effet de nombreuses études ont montré le rôle déterminant de ce facteur dans la cancérogénèse et son activation constitutive dans de nombreuses pathologies dont la LLC.

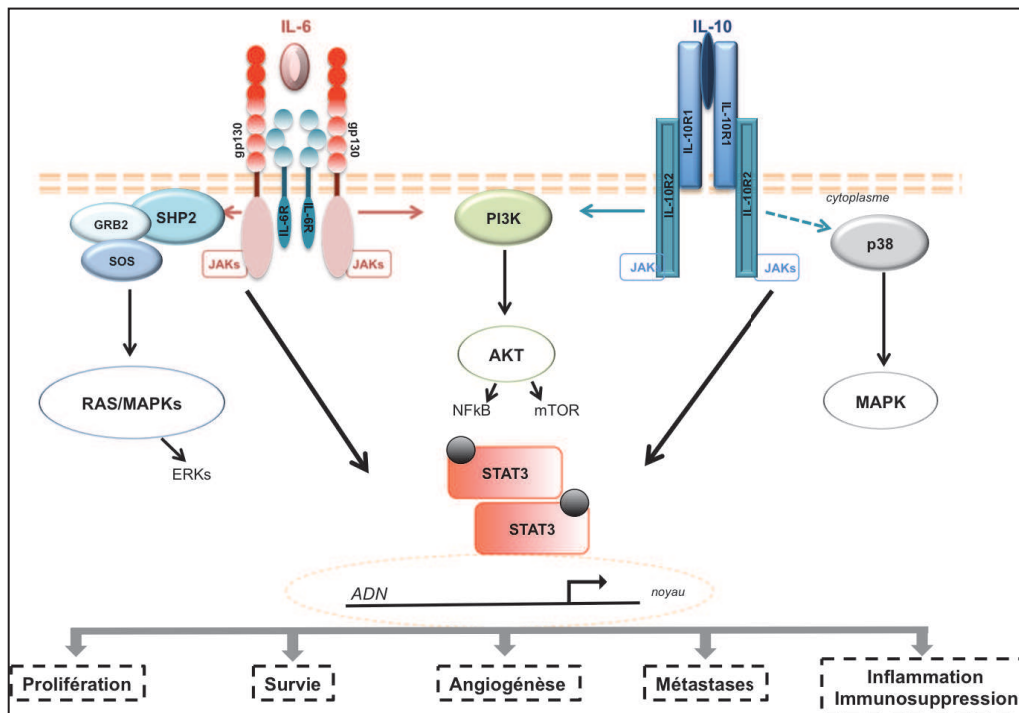


Figure 25: Voies de signalisation activées par l'IL-6 et l'IL-10.

La fixation de l'IL-6 à son récepteur entraîne le recrutement de SHP2 au niveau des gp130. SHP2 interagit avec GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), associé à la protéine SOS (Son of Sevenless), échangeur GDP/GTP pour Ras qui conduit à l'activation en cascade des MAPKs. Cette voie des MAPKs peut aussi être activée par l'IL-10 via l'activation de la protéine p38. L'IL-6 et l'IL-10 entraînent aussi l'activation de la voie PI3K/AKT impliquée dans l'activation du facteur NFkB et mTOR. L'activation de ces voies de signalisation conduit à l'induction de nombreux facteurs impliqués dans la prolifération, la survie, la transformation cellulaire et les processus d'inflammation ou d'immunorégulation. *Modifié de Ataie-Kachoe et al., 2014 (204).*

a. La voie JAK/STAT3

❖ Structure de STAT3

STAT3 est un facteur de transcription qui appartient à la famille des facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Cette famille est composée de 7 membres (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6). STAT3 est une protéine de 92 KDa, codée par un gène situé sur le chromosome 17q21 et qui possède deux isoformes issues d'un épissage alternatif. L'isoforme alpha (STAT3 α), activatrice et une isoforme beta tronquée (STAT3 β), qui ne possède pas de domaine C-terminal et longtemps considérée comme étant principalement un isoforme de type dominant négatif de STAT3 α . Une étude *in vivo* a démontré, que l'isoforme beta pouvait avoir une activité transcriptionnelle propre et empêcher la mort embryonnaire causée par des mutations invalidant STAT3. En effet, le Knockout de STAT3 n'est pas viable, soulignant l'importance de ce facteur dans l'embryogénèse (205).

STAT3 possède deux résidus dont la phosphorylation conduit à l'activation de la protéine une tyrosine (Y705) et une sérine (S727). Une tyrosine à la position 705 (Y705) phosphorylée par des tyrosines kinases notamment les protéines de la famille JAK est nécessaire à la dimérisation et à la translocation nucléaire de STAT3 pour lui permettre de réguler la transcription de gènes cibles. La substitution de cette tyrosine par la phénylalanine (Y705F) inhibe la transduction du signal induit par l'L-6 dans les lignées d'hépatome humains (HepG2) (206). Le résidu sérine à la position 727 (S727) peut également être phosphorylé et entrainer la dimérisation, la translocation nucléaire et la fixation de STAT3 à l'ADN pour la régulation de gènes cibles. De la même manière que la forme phosphorylée sur la tyrosine, S727pSTAT3 transloque dans le noyau pour réguler les gènes cibles (207) (Figure 26).

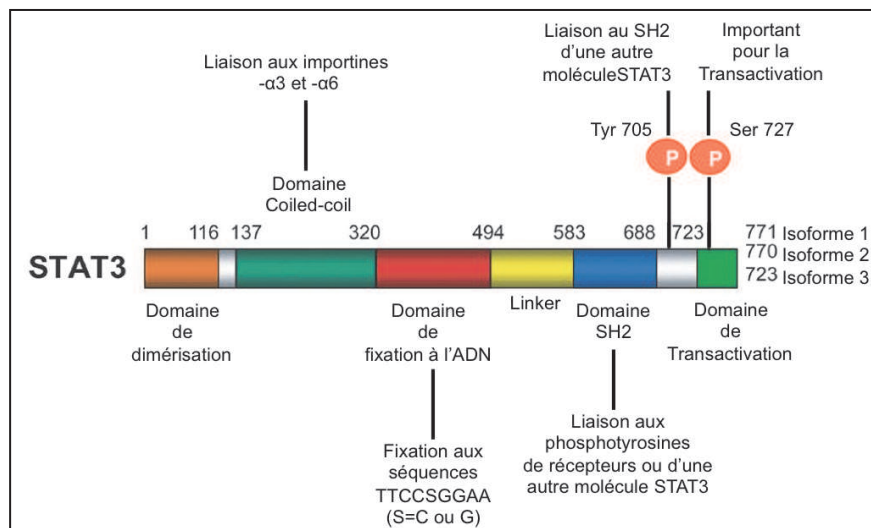


Figure 26: Les différents domaines de la protéine STAT3

D'après, Hirai H et al., 2011 (208).

Alors

que certaines études présentent cette phosphorylation comme pouvant négativement réguler le facteur STAT3, d'autres montrent une activation plus importante de STAT3 suite à cette phosphorylation. Des expériences chez la souris ont montré une importante diminution de l'activité transcriptionnelle de STAT3 suite à la substitution du résidu sérine par une alanine dans des fibroblastes embryonnaires (79). Cette forme activée de STAT3 n'agit pas uniquement en tant que facteur de transcription mais a également été décrite comme ayant une fonction dans le métabolisme. La localisation mitochondriale de S727pSTAT3 a en effet, mis en évidence dans plusieurs cellules tumorales, dont les cellules de LLC, où le facteur protège les cellules du stress antioxydant (209).

❖ Activation de STAT3

Les molécules de STAT3 phosphorylées forment des homo-dimères ou des hétéro-dimères avec notamment les STAT1 ce qui permet de libérer leurs domaines NLS (Nuclear Localisation Sequence). Les dimères ainsi formés transloquent vers le noyau par un système de transport actif passant par de pores nucléaires régulés par les importines (importine- α et importine- β). Une fois dans le noyau, STAT3 se fixe à l'ADN pour réguler la transcription de gènes cibles. Le retour vers le cytoplasme par l'exportine CRM1 (chromosomal maintenance 1) se fait suite à la déphosphorylation de STAT3 par des phosphatases comme TC45.

Les récepteurs aux cytokines ne sont pas les seuls à pouvoir induire cette phosphorylation de STAT3. D'autres récepteurs peuvent activer STAT3 tels que les TLRs (TLR4 et TLR9), décrits précédemment, les récepteurs à protéines G ou encore le BCR (203). L'activation de STAT3 par le BCR a été démontré dans les lymphocytes B de lymphome du (163, 196). Des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que les récepteurs au VEGF ont aussi été décrits dans la LLC (210, 211). L'origine de la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine est moins bien connue. Certaines études ont décrit une phosphorylation de ce résidu sérine comme pouvant être induit suite à l'activation de la Protéine kinase C (PKC), des MAPKs ; la protéine CDK5 (Cyclin Dependent Kinase), l'activation de la voie Ras/ERK1-2/Elk-1 ou suite à des cassures de l'ADN (212) (Figure 27).

En plus de la phosphorylation, STAT3 peut également subir d'autres types de modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation ou l'oxydation. En effet, STAT3 peut être acétylé sur plusieurs résidus lysine par l'histone acetyltransferase, CBP/p300 en réponse aux cytokines ou facteurs de croissance. Cette acétylation stabilise les dimères formés et l'activité transcriptionnelle de STAT3. À l'inverse, la méthylation de STAT3 par des méthyltransférase réduit son activité transcriptionnelle (213).

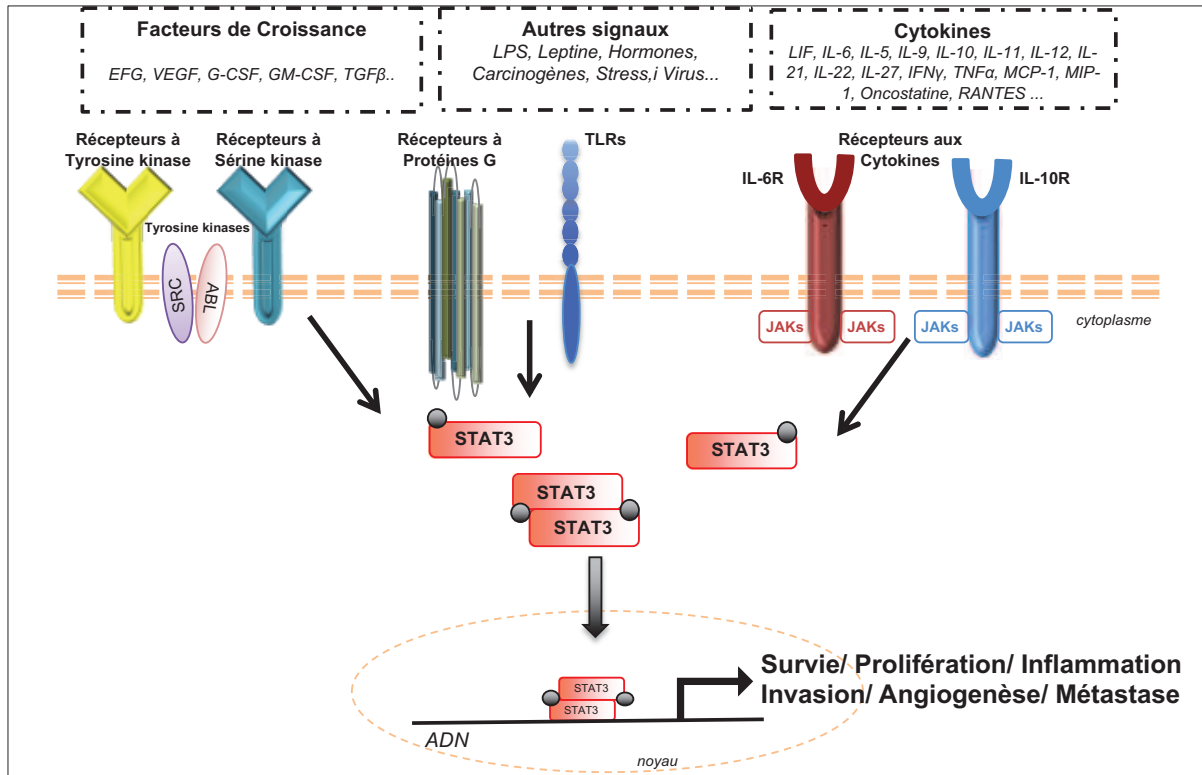


Figure 27: Activation de STAT3

Plusieurs signaux extracellulaires peuvent induire l'activation de STAT3. La phosphorylation de STAT3 entraîne sa dimérisation, sa translocation nucléaire et l'induction de gènes cibles impliqués dans la survie, la prolifération, l'inflammation, l'invasion, l'angiogenèse et les métastases.

Inspiré de Yuan et al., 2015 et Aggarwal et al., 2009 (203) ; (212).

❖ Gènes cibles de STAT3

STAT3 régule l'expression de gènes impliqués dans plusieurs processus physiologiques dont la prolifération, la survie, l'inflammation mais aussi l'invasion, l'angiogenèse et la transformation cellulaire. L'effet de STAT3 sur la prolifération repose surtout sur sa capacité à induire l'expression de la Cycline D1 et des gènes de croissance comme c-Myc. STAT3 induit l'expression de nombreux gènes anti-apoptotiques tels que BclxL, Bcl-2, Mcl-1 ou la survivine et peut aussi interagir avec c-Jun pour réprimer des protéines pro-apoptotiques comme Fas. STAT3 joue un rôle crucial dans la modulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ce facteur de transcription activé par des cytokines va induire l'expression de nombreuses cytokines pro- ou anti-inflammatoires comme IL-6 ou IL-10 qui peuvent être régulées de manière autocrine (163).

❖ Régulation de la voie JAK/STAT3

Cette activation de STAT3 peut également être négativement régulée par des protéines comme les SOCS, les phosphatases ou les PIAS (protein inhibitor of activated STAT). PIAS3 est en effet capable de bloquer STAT3 par sumoylation ou en bloquant sa liaison à l'ADN inhibant ainsi la transcription de ces gènes cibles. Les phosphatases telles que SHP-2 peuvent également inhiber la voie induite par l'IL-6. Ces protéines recrutées au niveau des motifs Y759, agissent en dé-phosphorylant ces résidus ou les JAK. L'activation des STAT en réponses aux cytokines conduit aussi à l'activation des protéines SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling). Via leur domaine SH2, ces protéines se fixent aux résidus tyrosines phosphorylés des récepteurs ou des JAK, empêchant ainsi le recrutement des STAT. Ces protéines peuvent également via leur SOCS-box recruter le complexe ubiquitine ligase E3 et entraîner la dégradation de leur cible par la voie du protéasome (203).

Même si elle est activée par l'IL-10, la protéine SOCS3 ne se fixe pas à l'IL-10R et ne régulent pas la voie induite. Ainsi l'IL-10 induit une activation continue de STAT3, essentielle à son activité anti-inflammatoire. Certaines études suggèrent que l'IL-10 est également capable d'assurer le rétrocontrôle négatif de la signalisation qu'elle induit via l'activation de SOCS1 qui bloque le site actif des kinases Jak1 et Tyk2 et les empêche de phosphoryler leurs cibles (214) (Figure 28).

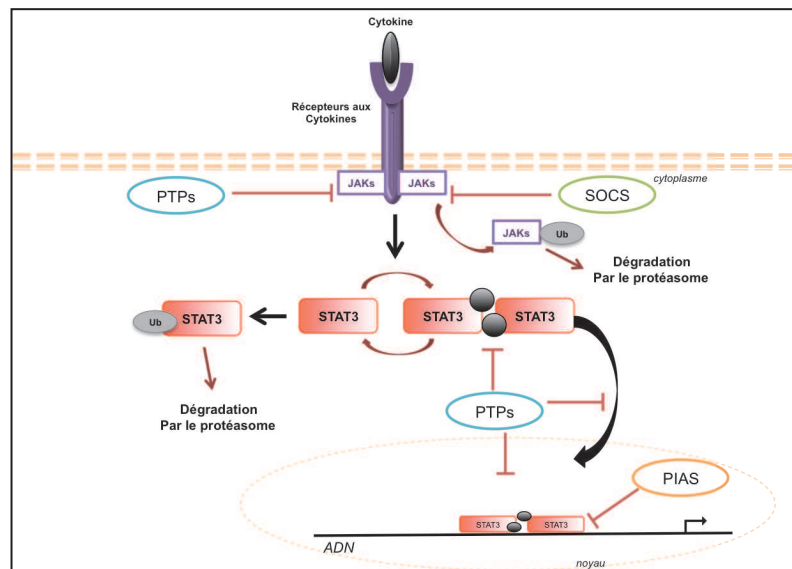


Figure 28: Régulation de la voie JAKs/STAT3

Les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) déphosphorylent les kinases JAKs et les protéines STAT. La protéine STAT3, déphosphorylée est alors ubiquitinylée et dégradée par la voie du protéasome. Les protéines SOCS peuvent se fixer aux tyrosines phosphorylées du récepteur ou des JAKs via leur domaine SH2, bloquant ainsi le recrutement de STAT3. Les SOCS peuvent aussi entraîner la dégradation des JAKs par le protéasome. Les PIAS bloquent STAT3 par sumoylation ou en bloquant sa liaison à l'ADN. *Inspiré de Shuai et al., 2003 (218).*

❖ Inhibition de la voie JAK/STAT3

La connaissance des différents mécanismes d'activation de la voie JAK/STAT3 a permis de mettre en place plusieurs stratégies d'inhibition.

La phosphorylation de STAT3 peut être bloquée suite à l'inhibition des kinases de la famille JAK. Plus d'une douzaine de petites molécules inhibitrices des JAKs ont été développées et sont actuellement testées en clinique. C'est le cas du ruxolitinib (196) ou de WP-1066 dont les effets ont pu être démontré sur les cellules de LLC. WP1066 inhibe la phosphorylation de STAT3 induite par l'IL-6 et entraîne la diminution de l'expression des gènes anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. L'utilisation du WP1066 diminue ainsi la résistance aux traitements induite par l'IL-6 (215).

L'inhibition de STAT3 peut aussi se faire en ciblant son domaine SH2 avec par exemple le STATTIC qui inhibe la dimérisation et la translocation nucléaire de STAT3. Une étude récente a montré les effets du STATTIC sur la survie de cellules B de LLC. Le traitement de ces cellules résulte en une inhibition de leur viabilité, confirmant l'implication du facteur de transcription dans la survie cellulaire (216).

Enfin, une nouvelle stratégie repose sur l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens (ASO) développés grâce aux techniques de séquençage de nouvelle génération qui piègent STAT3 ayant fait l'objet d'études précliniques pour le traitement de lymphomes et cancers du poumon ([217](#)).

b. STAT3 dans les cancers

L'activation constitutive de STAT3 a été retrouvée dans de nombreux cancers solides comme le cancer du sein ou de la prostate et hématologiques tels que le lymphome à cellules du manteau ([163](#)) ou la LLC ([207](#)). Une activation constitutive qui selon les modèles sera sous la forme Y705pSTAT3 ou S727pSTAT3.

L'origine de cette activation constitutive peut être de différentes natures comme une stimulation continue des récepteurs vus précédemment par les cellules du microenvironnement qui sécrètent des facteurs comme les cytokines ou les facteurs de croissances. Les cellules stromales ont été décrites dans plusieurs cancer dont la LLC comme pouvant produire d'importante quantité d'IL-6, activant la voie JAK/STAT3 et initiant une boucle autocrine qui maintient les facteurs activés ([219](#)). Cette phosphorylation a également été décrite dans les syndromes myéloprolifératifs comme pouvant être indépendante des facteurs du microenvironnement et résulter de la mutation des kinases de la famille JAK ([220](#)).

❖ STAT3, entre cancer et immunité

En plus de son rôle sur les cellules cancéreuses, l'activation constitutive de ce facteur de transcription agit surtout sur le microenvironnement tumoral constitué de cellules d'origine hématopoïétiques et mésenchymateuses. Déjà présentes au niveau stromal ou recrutées au niveau du site de la tumeur, ces cellules seront « éduquées » par les cellules cancéreuses afin d'acquérir des propriétés pro-tumorales. Un dialogue bi-directionnel qui repose sur des contacts cellulaires, des échanges de cytokines, de chimiokines ou de facteurs de croissances. Ces cellules associées aux tumeurs peuvent être des macrophages (TAMs : Tumor-associated macrophages), des fibroblastes (CAFs : Cancer-associated fibroblasts) ou des Tregs et cellules myéloïdes (MDSCs) recrutées pour faciliter l'échappement immunitaire ([221](#)). STAT3 joue un véritable rôle dans les mécanismes d'immunosuppression. Ce facteur induit, en effet, la production d'IL-10 et d'IL-17 et entraîne l'accumulation de Tregs et de Th17 ([222](#), [223](#)).

Comme nous avons pu le voir précédemment, STAT3 agit aussi sur les lymphocytes B et son activation par l'IL35 induit le développement de Bregs producteurs d'IL-10 et d'IL-35 (80).

Enfin, ce facteur de transcription est aussi capable d'induire l'expression de molécules immuno-inhibitrices telles que PD-L1 comme cela a été montré sur les cellules B de LLC (195).

Une fonction d'immunorégulation qui fait de STAT3 une protéine essentielle dans le contrôle de l'immunité anti-tumorale. Une activation constitutive de ce facteur peut donc être à l'origine de l'altération des réponses immunitaires du microenvironnement dirigées contre les cellules tumorales. Ainsi STAT3 est considéré comme étant le facteur de transcription faisant le lien entre l'inflammation et les cancers (224).

c. STAT3 dans la LLC

❖ Une forme constitutivement activée dans la LLC

Une forme constitutivement activée de STAT3, phosphorylé sur le résidu sérine a été mise en évidence dans les cellules B issues de patients atteints de LLC alors qu'elle n'a pas été retrouvée dans les cellules de donneurs sains (225). Alors que la forme phosphorylée sur la tyrosine n'est pas détectée dans les cellules B de sang périphérique, la forme phosphorylée sur la sérine est retrouvée chez tous les patients. Cette forme activée de STAT3 est capable de transloquer vers le noyau et de réguler les gènes cibles tels que BclxL, Bcl-2 ou STAT3 (207). C'est uniquement dans les cellules B issues des ganglions de patients que la forme Y705pSTAT3 a été détectée. Ceci montre que les cellules de sang périphérique privées de contact avec un microenvironnement spécifique, ne sont plus stimulées par les différents facteurs sécrétés (226).

❖ Activation de STAT3 dans la LLC

Plusieurs études ont porté sur la mise en évidence des facteurs pouvant induire cette phosphorylation de STAT3 dans les cellules de LLC. Plusieurs récepteurs semblent participer à cette induction, des récepteurs aux facteurs de croissance comme le VEGF (210) ou les récepteurs aux cytokines comme le récepteur à l'IL-6 très exprimé à la surface de ces cellules (165). Le BCR est également capable d'induire une phosphorylation de la tyrosine qui se fait de façon plus tardive que celle induite par l'IL-6 mais qui passe

également par les kinases de la famille JAK. Ceci suggère que l'activation de STAT3 qui se ferait suite à la formation d'une boucle autocrine activée par le BCR ([196](#)).

De nombreuses études ont démontré l'implication du CD5 dans l'activation de STAT3 et la production d'IL-10 ([150](#), [199](#)). Une étude récente a montré que le CD5 formait un complexe avec les protéines BLNK et CK2 (Casein Kinase). CK2 est une Sérine/Thréonine kinase surexprimée par les cellules de patients et pouvant être activée par le CD5. L'équipe a montré par spectrométrie de masse l'interaction entre CK2 et STAT3 et a démontré la phosphorylation de STAT3 sur la sérine par le complexe CK2-BLNK-CD5. Cette phosphorylation n'est pas retrouvée suite à un traitement avec l'inhibiteur de CK2, testé *in vivo* et qui entraîne l'apoptose des cellules de LLC ([227](#)). Dans ces études, l'inhibition de STAT3 par shRNA ou par inhibiteurs conduit à l'apoptose des cellules de LLC confirmant le rôle de ce facteur dans la survie de ces cellules de LLC.

❖ Fonction de STAT3 dans la pathogénèse de la LLC

Phosphorylé sur le résidu sérine, STAT3 régule des gènes anti-apoptotique et participe à la survie des cellules de LLC ([207](#)). STAT3 active également d'autres facteurs décrits comme pouvant maintenir les cellules de LLC et les protéger de l'apoptose. C'est par exemple, le cas du récepteur au GM-CSF dont l'activation ainsi que l'expression sur les lymphocytes B de LLC peut être induite par STAT3 et jouer un rôle pro-survie sur ces cellules ([228](#)). Ser727pSTAT3 a également été décrit comme pouvant avoir une localisation mitochondriale dans les cellules de LLC. Cette forme mitochondriale semble être induite par le stress oxydatif et permet à STAT3 de participer aux systèmes de défenses antioxydants et à la protection des cellules de l'apoptose ([209](#)). Le rôle anti-apoptotique de STAT3 se fait aussi via la formation d'un complexe avec NF- κ B. La régulation autocrine de l'IL-6 a été corrélée au niveau d'activation des facteurs STAT3 et NF- κ B, activés de manière constitutive dans ces cellules ([211](#)). Deux facteurs pouvant interagir et être au centre d'un dialogue entre plusieurs voies de signalisation. Une étude en 2007 a montré qu'à l'état basal, STAT3 pouvait interagir avec NF- κ B (p65/p50) et l'activer ([229](#)). Une fois le complexe formé, il transloque dans le noyau afin de réguler l'expression de gènes cibles de NF- κ B. Ainsi STAT3 semble jouer un rôle dans l'activation constitutive de NF- κ B dans les cellules de LLC. L'activation constitutive de ces deux facteurs a récemment été associée à la sensibilité des cellules de LLC à l'apoptose *in vitro* qui reflète leur résistance aux chimiothérapies et la progression de la pathologie ([211](#)).

La même équipe a montré que les cellules de LLC anergiques et bloquées au stade G₀, reprennent le cycle et passent en G₁ suite au traitement par le tocilizumab qui entraîne une diminution de l'activation de STAT3 de l'expression des gènes anti-apoptotiques Mcl-1 et BclxL. Les cellules deviennent alors moins résistantes aux traitements chimiothérapeutiques. Une régulation autocrine de l'IL-6 passant par ce facteur permet aux cellules de résister aux différents traitements ([165](#)). Cependant et paradoxalement, l'activation de STAT3 peut dans certains cas induire l'apoptose des cellules de LLC. Notamment lorsque l'activation de STAT3 est induite par l'IL-21, activant ainsi les caspases et ayant un effet pro-apoptotique présentant l'IL-21 ([230](#)). Une autre étude a suggéré qu'une activation importante de STAT3 au-delà d'un certain seuil pouvait conduire à l'apoptose des cellules de LLC via l'activation des caspases ([231](#)). Enfin, une étude faite sur des patients traités à l'ibrutinib (inhibiteur de BTK) a mis en évidence l'implication de STAT3 dans la suppression de la réponse immune anti-tumorale. En effet, l'inhibition de STAT3 suite au traitement est associée à la diminution de l'expression des protéines PD1/PD-L1 mais aussi de la production d'IL-10 par les cellules de LLC ([195](#)). STAT3 constitutivement activée dans les cellules de LLC joue un rôle dans la survie de ces cellules et leur résistance à l'apoptose en réponse à divers traitements mais participe aussi au maintien de la fonction immunosuppressive de ces cellules productrices d'IL-10 pour l'inhibition de l'immunité anti-tumorale.

OBJECTIFS

Les lymphocytes B matures produisent non seulement des immunoglobulines mais aussi des facteurs solubles activateurs, pro-inflammatoires et immunosuppresseurs afin de dialoguer avec les autres cellules environnantes et réguler la réponse immune. Dans la LLC, une sous-population de cellules tumorales présente des similitudes phénotypiques avec les lymphocytes B régulateurs et des propriétés immunosuppressives notamment par la production d'IL-10 qui permet de moduler la réponse lymphocytaire T CD4⁺.

Un certain nombre d'études ont également décrit un rôle dans la pathologie de l'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire. En effet, le sérum de patients de LLC montre des niveaux plus élevés des deux cytokines par rapport à l'état physiologique. Dans de nombreux types cellulaires, les deux cytokines jouent un rôle clé dans la survie des cellules en activant un facteur de transcription, STAT3, ce qui leur permet d'induire leur propre production par une régulation autocrine.

Une majorité d'études actuelles sont consacrées à l'étude de ces productions cytokiniques dans le dialogue entre la cellule tumorale et son microenvironnement. En revanche, le rôle de cette production sur la survie de la cellule leucémique elle-même reste beaucoup moins analysé. Mon travail de doctorat s'est centré sur cette analyse.

Nous avons étudié la balance des productions cytokiniques entre l'IL-10 et l'IL-6 et la relevance physiopathologie de ces deux cytokines, dans la LLC grâce à une étude essentiellement faites sur des cellules primaires de patients.

Les objectifs successifs de ce travail ont été :

- D'identifier des sous-populations de lymphocytes B présentant des propriétés immunorégulatrices en démontrant l'expression de facteurs immunorégulateurs tels que l'IL-10 et le facteur de transcription FOXP3 dans ces lymphocytes B de LLC.
- D'évaluer la balance d'expression des facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou immunosuppresseurs tel que l'IL-10 des cellules de LLC.
- D'étudier et de comparer les effets de ces deux facteurs sur la survie des lymphocytes B de LLC via notamment l'activation de STAT3.
- De démontrer une boucle autocrine de régulation par l'IL-10 participant au maintien de la sous-population immunorégulatrice qui joue un rôle important dans la LLC.

RÉSULTATS

I. Caractérisation de facteurs immunorégulateurs dans la LLC

Depuis la description initiale de sous-populations de lymphocytes B ayant la capacité de sécréter l'IL-10 et de moduler la réponse lymphocytaire T CD4⁺, dans un certain nombre de pathologies autoimmunes, un nombre important de travaux a évalué la fréquence et la caractérisation phénotypique de ces sous-populations lymphocytaires ainsi que leurs capacités immunorégulatrices sur les autres lignages hématopoiétiques. Ces travaux ont notamment participé à la démonstration d'une fréquence plus élevée de cellules B régulatrices dans certaines tumeurs solides et dans des leucémies ayant pour conséquence une modulation négative de la réponse anti-tumorale.

La majorité des études menées s'est intéressée aux sous-populations sécrétrices d'IL-10. Cependant, en prenant différents modèles pathologiques d'autres facteurs immunorégulateurs que l'IL-10 ont maintenant été décrits comme exprimés par des lymphocytes B à divers stades de la différenciation du lignage dont le TGB β 1, le granzyme ou encore les facteurs IDO.

Dans ce premier travail auquel j'ai participé, notre équipe a identifié et caractérisé des sous-populations de lymphocytes B de LLC sécrétrices d'IL-10 et de TGF β 1 mais aussi l'expression d'un facteur de transcription, préférentiellement décrit dans les cellules T régulatrices, FOXP3. Cette étude a permis de déterminer le phénotype des sous-populations lymphocytaires de LLC exprimant les différents facteurs immunorégulateurs et leur potentiel rôle immunomodulateur permettant d'expliquer l'expansion clonale retrouvée dans la pathologie.

Article 1

Immuno-regulatory B-cells are a critical functional subset in progressive chronic lymphocytic leukemia

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}, Fanny Baran-Marszak ^{1, 2, 3}, Rémi Letestu ^{1, 2, 3}, Luc Mouthon ^{5, 6}, Vincent Lévy ^{2, 4}, Florence Ajchenbaum-Cymbalista ^{1, 2, 3}, Christine Le Roy* ^{1, 2} and Nadine Varin-Blank* ^{1, 2}

Immuno-regulatory B-cells are a critical functional subset in progressive chronic lymphocytic leukemia

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}, Fanny Baran-Marszak ^{1,2,3}, Rémi Letestu ^{1,2,3}, Luc Mouthon ^{5,6}, Vincent Lévy ^{2,4}, Florence Ajchenbaum-Cymbalista ^{1,2,3}, Christine Le Roy* ^{1,2} and Nadine Varin-Blank* ^{1,2}.

¹ INSERM, U978, Bobigny, France

² Université Paris 13, COMUE SPC, UFR SMBH, Labex INFLAMEX, 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, COMUE SPC, Labex INFLAMEX, Paris France

* Co-senior and corresponding 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 and christine.le-roy@inserm.fr

Original Article

Key words: CLL, BCR, IL10, TGF β 1, FOXP3, regulatory B cells

Funding and financial conflicts of interest: none

Running title: B regulatory cells function in CLL

Counts: Title 96; abstract 202, manuscript 5460, 3 Tables and 6 figures, 7 supplementary figures

Summary: 40 mots

Abstract

Depending on the cytokines produced, several regulatory B cell (Breg) subsets contribute to immune resolution and their enrichment leads to disease-associated immunosuppression. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a heterogeneous clonal B cell neoplasm ranging from indolent to rapidly progressive clinical course that eludes tumor clearance. This study presents a comprehensive phenotypic and functional analysis of the regulatory subpopulations in CLL patients at various stages of the disease. Cytokines profiling of CLL-B cells evidences the production at various extents of IL-10 and TGF β 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 markers of activated and memory B cells defining a specific signature. Based on CD5 CD19 expression, intraclonal heterogeneity showed differential regulatory factors production relevant to disease evolution. Functional studies proved their regulatory capacities targeting T cell differentiation, proliferation and secretion. IL-10, TGF β 1 and FOXP3 expressions combined in a polyfunctional index strongly correlated with high-risk factors of progression. This profiling helps to predict progression and pinpoints immune dysfunction in CLL.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoid malignancy prevalent in the elderly 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 impact life expectancy ([232](#)). The disease results in the clonal expansion of small, mature B lymphocytes, which accumulate in the bone marrow, blood and secondary lymphoid organs. In progressive patients chemo- and immunotherapies are not curative and residual clonal cancer cells re-populate both lymphoid organs and peripheral blood; the antitumor immune surveillance being ineffective ([232](#), [233](#)). The heterogeneity of CLL has been investigated and related to immunophenotypic markers including CD5, CD19 or CD38 expressions. Moreover, genetic studies have pointed out the importance of stereotyped CDR3 sequences of immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) genes and of antigen receptor (BCR)-triggered pathways leading to apoptotic defect ([234](#), [235](#)). These membrane and signaling features converge to an active antigen-driven selection in the clonal expansion of the malignant cells. Indeed, functional studies have confirmed the relevance of signals propagated by BCR triggering in the heterogeneity of leukemic cell survival *in vitro*. BCR effectors such as Spleen tyrosine kinase, Phospholipase C γ or NFAT transcription factors are often overexpressed and/or constitutively activated in B-CLL cells and allow the expression of target genes important for cell survival ([144](#), [145](#)). Expression of unconventional activators, such as the zeta chain associated protein (ZAP-70) commonly expressed in T and NK cells, is also associated with increased cell survival. In addition, the capacity to generate and propagate such activating signals at the cellular level correlates with disease progression. By contrast, defective signal transduction is prevalent in indolent disease and related to an anergic phenotype of the leukemic cells ([129](#), [130](#)). The important driving force of BCR initiated signals is especially

encountered in lymph nodes, which are important sites for antigen recognition and may account for the accumulation of malignant cells in synergy with microenvironmental factors (236).

Besides heterogeneous signaling capacity, the malignancy is also characterized by an imbalance of the immune subpopulations present in peripheral blood and lymphoid organs of CLL patients. T cell subsets that account for immune surveillance in tumor development encompassing CD4⁺ helpers (Th) and regulatory T cells (Tregs) have an altered ratio in these hematological malignancies (237, 238) Thus, Tregs are increased in CLL and correlate with several clinical/biological features of progressive disease, whereas CD8⁺ T cells from CLL patients show functional defect in proliferation and cytotoxicity, but preserved cytokine production reflecting T-cell exhaustion (239). Such impairment of immunological homeostasis is often observed when ineffective antitumor immunity takes place during neoplasm progression and has been attributed to the production of several regulatory molecules and cytokines by specific B cell subsets ascribed to regulatory B cells (35, 95, 240, 241) . Recent data have shown that these B cell subsets play an important role in the direct or indirect suppression of inflammatory response and in the maintenance of tolerance through the production of IL10 (69, 102, 242, 243). Various teams have undertaken the phenotypic characterization of these subsets both in murine models and in human pathologies. However, this strategy did not identify a unique consensus but several phenotypes of progenitor populations with suppressive activity (35). Among others, murine CD5⁺ B1a and CD1d^{high}CD5⁺CD19^{high} B10 cells are IL-10 producing cells (101, 244). Studies unraveling the functional properties of the CD5⁺ B1a lineage have uncovered regulatory properties leading to bias of the immune cells repertoire amongst which expansion of the Treg population and suppression of Th1 and Th17 differentiation (245). Human Breg subsets, identified by their capacity to suppress Th1 differentiation and convert CD4⁺ T cells into Tregs *via* IL10

production, have also been described ([50](#), [74](#)). In peripheral blood from both healthy individuals and patients with autoimmune diseases or neoplasms, various IL10 producing subtypes have been reported ([50](#)). The latter include CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} immature B cells, CD19⁺CD24^{high}CD27⁺ B10 cells, CD19⁺CD38⁺CD1d⁺IgM⁺CD147⁺Granzyme⁺ B cells and CD27^{intermediate}CD38^{high} plasmablasts ([52](#), [242](#), [246](#)). Induction of IL10 in the various subsets seems to require signals from activated CD4⁺ T cells with CD40L playing a major stimulatory role, while IL21-dependant signals rather induce Granzyme (GrB) producing regulatory B cells preferentially ([247](#)). Additional induced Bregs can also exert a suppressive mechanism *via* the production of TGFβ1 and indoleamine-2,3 dioxygenase (IDO) ([248](#)).

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 long as being derived from a human B1 lineage recognizing natural antibodies ([249](#), [250](#)). 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 ([232](#)). CLL malignant B cells have a clear survival advantage over the other normal B cells ([251](#)). Furthermore, diverse triggering events have been shown to induce IL10 in these cells, which share immunosuppressive capacities with B10 cells ([243](#)).

In the present study, we systematically analyzed the capacity for CLL cells from donors with indolent and progressive disease to produce in response to BCR/CD40 triggering key cytokines involved in immune modulation and in tumor surveillance. We found that a subset of leukemic cells of variable prominence produced constitutive IL10 and induced TGFβ1. Those cells also expressed the transcription factor FOXP3 that is a hallmark of Tregs. Cells that produce these three regulatory proteins display a specific signature somehow different from the already

described B10 cells. Evidently, these cells share the regulatory properties attributed to Bregs toward CD4⁺T cells. Finally, we give evidences that the combination of the three factors in a polyfunctional score is indicative of progression and might be used for the stratification of the disease. These novel findings provide also important insights on how CLL cells modify their immunological environment to their advantage.

Results

CLL-B cells express heterogeneous immunoregulatory cytokines profile.

Purified CLL-B cells, from a cohort of 42 CLL patients displaying variable biological parameters and clinical outcome (**Tables 1-2**) were analyzed for their ability to express two important immunosuppressive cytokines, IL10 and TGFβ1. Flow cytometry analysis of CD5⁺CD19⁺ cells at the time of isolation (D0) and after culture for 3 days (D3) showed a highly variable proportion of cells expressing IL10 or TGFβ1 ranging from 0.1 to 85% and from 0 to 71%, respectively (**Figure 1A-B**). Comparable frequencies of IL10⁺ cells were found at the time of B cell isolation and in cultured cells indicative of an IL10 constitutive expression (23±4,8% at D0 versus 27±4,8% at D3) (**Figure 1B**). By contrast, while very low levels of TGFβ1 expressing cells were observed at the time of isolation; several, but not all of the cases, increased TGFβ1 expressing cells in culture indicating a high degree of inducibility (2.9±1,9% at D0 versus 21,7±4,5% at D3). In order to estimate the maximum extent of inducibility, cells were stimulated by addition of CD40L and anti-IgM during the 3 days of culture followed by Phorbol Myristate Acetate (PMA) and ionomycin for 4 h before analysis. Upon stimulation, for most of the samples, the proportion of IL10-expressing cells (27±4,8% versus 28,7±5,5%) was not modified, whereas further increase of TGFβ1 expressing cells (21,7±4,5% versus 35,2±6,2%) was observed (**Figure 1A-B**). Small needle puncture analysis confirmed the presence of such IL10⁺ and TGFβ1⁺ subpopulations in the lymph node (Figure 1A). Examination of individual cases analyzed in all conditions (connected lines) suggested both up or downregulation only in few

cases for IL10. By contrast, several cases showed further induction of TGF β 1 expressing cells upon stimulation while others remained at comparable levels (**Figure 1B**). Nonetheless, the intracellular levels of expression of the two cytokines revealed by the median of fluorescence of the cells was not modified upon stimulation (**Sup Figure 1**) Indeed, flow cytometry on CD5⁺CD19⁺ gated cells revealed a subset of cells co-expressing IL10 and TGF β 1 (**Figure 1C**). Capacity to secrete various immune modulatory cytokines was also quantified. Cells in culture for 3 days and stimulated with CD40L/anti-IgM showed low levels of IL10 (mean = 0.5 pg/ml) and high levels of TGF β 1 (mean = 800 pg/ml). Interestingly, TGF β 1 was secreted at low or high levels allowing the segregation of two groups. Furthermore, the amount of secreted TGF β 1 in the high secreting group was correlated to the fraction of expressing cells with levels similar to healthy controls (**Figure 1D-E**). All the other cytokines tested were produced at low levels as compared to healthy controls. Similarly to TGF β 1, secretion of TNF α , IL8 and IL6 was induced upon stimulation while IL4, IL1 β , IFN γ , IL13, IL2 and IL17 were unchanged (**Figure 1E-F and Sup Figure 2A**). However, their production was not correlated to TGF β 1 secretion (**Figure 1E**). Granzyme B (GrB) expressing cells were rarely observed even when cells were triggered with a major inducer such as IL21/CD40L in contrast with B cells isolated from healthy subjects (**Sup Figure 2B**). Taken together, our results support the idea of a B-CLL cellular subpopulation, present at various extents among cases with a specific cytokine profile evocative of an immunoregulatory population that can further respond to BCR/CD40 stimulation.

CLL-B cells constitutively express FOXP3.

In line with the specific pattern of cytokines expressed, indicating similarities between regulatory and CLL-B cells, we assessed whether CLL-B cells could express, like T regs, the major transcriptional regulator FOXP3. Flow cytometry analysis of peripheral viable

CD5⁺CD19⁺ CLL-B cells revealed a FOXP3⁺ subpopulation present at highly variable extents among patient samples in culture for 3 days (ranging from 0 to almost 80% **Figure 2A-B**). Several FOXP3⁺ cells were also observed in small needle aspirate of lymph node and at collection of peripheral blood samples. Stimulation for 3 days with CD40L/anti-IgM did not increase significantly the overall proportion of the FOXP3⁺ subpopulation (**Figure 2A-B**). Yet, a substantial up- or down-regulation of the FOXP3⁺ subpopulation was observed in several individual samples upon CD40L/anti-IgM triggering while others remained at comparable proportion (**Figure 2A-B**, connected lines). Mean fluorescence intensity of FOXP3 labeling did not change upon stimulation in CD5⁺CD19⁺ patient B cells (**Sup Figure 3A**). Additionally, flow cytometry on CD5⁺CD19⁺ gated cells revealed a subset of cells co-expressing IL10 and FOXP3 (**Figure 2C**). To confirm FOXP3 expression we performed a western blot analysis right after purification or sorting using an antibody recognizing a different epitope of the transcription factor. Indeed, in CD5⁺CD19⁺CD27⁺CD3⁻ sorted cells (**Sup Figure 3B**) the 47 kDa protein was expressed and enriched as compared to CD5⁺CD19⁺CD3⁻ purified cells; FOXP3 was also observed in positive controls such as U2OS or FOXP3 transfected HEK293T cells (**Figure 2D**). Altogether, this analysis demonstrates that CLL-B cells display at variable extent a constitutive 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 pathological B cells were split into IL-10, TGFβ1 and FOXP3 positive or negative subsets and were then assessed for the level of expression (MFI) of phenotypic markers (CD5, CD19, CD27, CD24, CD25 and CD38), previously described in various regulatory subsets (**Figure 3A-B** and **Sup Figure 4A**). As shown in **Figure 3A**, three phenotypic markers *e.g.* CD5, CD19 and CD27 presented significant differences of expression

between IL-10⁺ and IL10⁻ cells. Comparable results were obtained between TGFβ1⁺ and TGFβ1⁻ cells. Therefore, the memory CD5⁺CD19⁺CD27⁺ CLL-B cells are the IL10 and/or TGFβ1 producing subsets. We also observed that FOXP3⁺ cells express to a certain extent higher levels of CD5, CD19 and CD25 compared to FOXP3⁻ cells. Analysis upon CD40/BCR triggering confirmed the results obtained with unstimulated cells in spite of a weaker CD5 detection (**Figure 3B**). By contrast, several other phenotypic markers usually associated to IL10 producing cells were not differentially expressed between IL-10^{+/-}, TGFβ1^{+/-} or FOXP3^{+/-} CLL-B cells and were not influenced by *in vitro* stimulation (**Sup Figure 4A**).

CD5/CD19 expression levels discriminate intra-individual heterogeneity for regulatory-markers.

In line with the specific and heterogeneous individual signature of the two phenotypic markers CD19 and CD5 for all three regulatory factors, we distinguished for a number of samples two subpopulations of B cells at steady state: CD5^{high}CD19^{high} and CD5^{dim}CD19^{dim} (**Figure 4A and Sup Figure 4B**). On a set of annotated patients, both subpopulations were evaluated over a period of time. Analysis showed clearly two intra-individual profiles. Several samples exhibited remarkably homogeneous CD5 CD19 expression with similar CD5^{high}CD19^{high} and CD5^{dim}CD19^{dim} frequencies over a long period of time (1 to two years, Group1, **Figure 4B**). In contrast, a second group of samples showed a pronounced heterogeneity of CD5 CD19 expression and a significant variation of the CD5^{high}CD19^{high} and CD5^{dim}CD19^{dim} frequencies even over a shorter period of time (less than a year, Group 2, **Figure 4B**).

Importantly, the evaluation of IL10, TGFβ1 and FOXP3 expressing cells showed striking differences for every regulatory factor between the two subpopulations, both in unstimulated or CD40/BCR stimulated cells (**Figure 4C**). This analysis defined the CD5^{high}CD19^{high} subpopulation as the major source of the regulatory factors among CLL-B cells.

In comparison the CD5^{dim}CD19^{dim} subset exhibited a lower ability to express IL10, TGFβ1 and FOXP3 (**Figure 4C**).

Altogether, these results outline the heterogeneous profile of CLL cells within a single case and a particular subset, defined as CD5^{high}CD19^{high} B cells showing high expression levels of all three regulatory factors IL10, TGFβ1 and FOXP3 and diverging from already described regulatory B cells subsets.

CLL-B cells undergo a regulatory crosstalk with their T cell counterparts

Next, we examined whether CLL-B cells might exhibit regulatory properties able to influence other immune cells. Purified autologous CD4⁺ T cells were cultured alone or together with CLL-B cells and their capacity to produce proinflammatory cytokines and regulatory factors was analyzed. The presence of stimulated CLL-B cells diminished, the percentage of CD4⁺ T cells expressing two important type 1 cytokines TNFα and IFNγ. This effect was dependent on the T/ B cells ratio in the coculture (**Figure 5A**). Conversely, coculture between autologous T and CLL-B cells, increased the number of CD4⁺ T cells expressing FOXP3. Since stimulation of T cells alone did not, this result argues for an orientation toward T regs in the coculture (**Figure 5B left**). The modulation of FOXP3⁺ T cells was further supported by the assessment of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ T regs, which was significantly enhanced in the presence of CLL-B cells (**Figure 5B right**).

Finally, coculture of autologous CD4⁺ T cells with CLL-B cells clearly impacted the division rate of T cells. While up to 2 division cycles were observed for T cells cultured alone during 72 h, the presence of CLL-B cells, dependent on the ratio between B and T cells in the coculture, markedly reduced T cells proliferation rate with full blockade for a 1:5 ratio (**Figure 5C**). Altogether these results indicate a positive regulatory role of CLL-B cells toward the induction of CD4⁺ Tregs and at contrary a suppressive role on TH1 cellular response.

Expression of IL-10, TGFβ1 and FOXP3 in CLL-B cells correlates with disease progression

Following the characterization of these immune regulators, we performed an unsupervised hierarchical cluster analysis of the biomarkers among the various CD5⁺CD19⁺ patient samples. First, using the frequency of IL10, TGFβ1 and FOXP3 expressing cells in unstimulated and stimulated conditions, we confirmed that stimulation influenced significantly the expression of TGFβ1 in a number of samples. Next, the hierarchical analysis of the three parameters in both conditions showed a strong correlation between the frequency of TGFβ1 and FOXP3 expressing cells ($r=0.8$) and to a lesser extent with IL10 ($r=0.6$). Additionally, the analysis allowed the discrimination of two clusters of samples showing, respectively, weak or elevated occurrence for the three factors. Under stimulated conditions, the variables were distributed with a higher homogeneity individualizing a cluster positive for the three parameters (**Figure 6A**). Taking separately into account the three factors, a statistical analysis did not reveal significant correlation with known risk factors of progression except for TGFβ1 that was elevated in samples expressing Zap70 (**Sup Figure 5**). Next, we, combined IL-10, TGFβ1 and FOXP3 expressions in a polyfunctional score, reflecting CLL-B cells capacity to express all 3 immunoregulatory factors. We challenged this score with the global or low and high CD5⁺CD19⁺ sub-populations. The unidimensional validity of this polyfunctional score was confirmed with eigenvalues of components 2 and 3 lower than 1 in both unstimulated or stimulated conditions (**Sup Figure 6A**). Applying this polyfunctional score to the distinctive CD5^{high}CD19^{high} subpopulation (**Figure 6B**) we found that values of polyfunctional score were significantly associated with IGHV status as well as with ZAP-70 expression.. These values were more elevated in IGHV unmutated or ZAP-70 positive cells. A similar analysis on CD5^{low}CD19^{low} subset or on global CLL population associated the score with Zap70 expression only.

By contrast, the novel regulatory score was never correlated with Binet staging of the disease at diagnosis, CD38 expression or metabolic activity (**Figure 6B and Sup Figure 6B-C**) ([144](#), [145](#)).

Remarkably, all the patients for whom the frequency of the immunomodulating subpopulations were low (upper cluster of cases in Figure 6A) experienced an indolent disease that did not require treatment. Their negative polyfunctional score was weakly associated with factors at risk of progression (20%, **Table 3**, UPN 14, 28, 20, 21, 24, 13). At the opposite, cases with high frequency of immunomodulating subpopulations (lower cluster of cases in Figure 6A) presented with a progressive disease requiring treatment. Their positive polyfunctional score was majorly associated with factors at risk of progression (58%, **Table 3**, UPN 1, 23, 6, 22, 25). Moreover, a longitudinal analysis for several patients confirmed that the polyfunctional score was negative and stable for patients with an indolent disease (UPN 14, 28 and 13) while those experiencing a progression showed rise of the immunoregulatory score (UPN 2 and 8). Altogether the striking link 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 score as a novel independent indicator of risk of progression. It also gives insights into the immunoregulatory capacity of the leukemic population.

Discussion

Recent advances in understanding the pathophysiology of CLL and the related heterogeneity at risk of progression have established the implication of dysregulated immune survey. The present study reveals important immune modulating functions of a subset of the clonal B-CLL expansion strongly correlated to disease progression. The analysis of a cohort of 42 patients has uncovered the capacity for CD5⁺CD19⁺CD27⁺ memory CLL-B cells to produce and secrete not only constitutive IL10 but also inducible TGFβ1. An important association between the level of expression of the phenotypic markers and the heterogeneous production of the cytokines defined two subpopulations; evolution of these subpopulations is evidenced for patients encountering disease progression. Interestingly, CD5^{hi}CD19^{hi} CLL-B cells also produce at variable extent the transcription factor FOXP3, a hallmark of Tregs. Co-cultures with autologous T cells have proved the functional regulatory implication of CLL-B cells in the induction of Tregs, the negative regulation of CD4⁺ 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 score argues for its validation as a functional predictive marker of disease progression.

Several reports have suggested implication of IL10 producing CLL-B cells in the immune deficit in CD4⁺ T cells observed along disease progression ([52](#), [102](#), [243](#)). The major population characterized in the initial study had phenotypic features resembling those of CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B10 cells, the human counterpart of murine CD1d^{hi}CD5⁺CD19^{hi}B10 cells ([52](#)). CD5⁺CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ cells formed a relevant subset in the CLL-B cells of our cohort (**Sup Figure 7**). However, the proportions of IL-10⁺, TGFβ1⁺ and FOXP3⁺ cells in this subset were not significantly different from those found in CD24^{inter}CD27⁺ or CD24⁺CD27⁻ cells. In addition, both CD5⁺CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ and CD5⁺CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} subsets were able to produce IL-10 and TGFβ1 cytokines (**Sup Figure 7**). Several other subtypes such as immature

CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, CD1d⁺CD19⁺CD38⁺IgM⁺CD147⁺GrB⁺ or CD11b⁺CD19⁺ cells have also been described as IL10 competent cells ([52](#), [69](#), [242](#), [250](#), [252](#)). The frequency of CD11b⁺ and CD24^{hi}CD38^{hi} cells among CD19⁺CD5⁺ 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⁺ cells did not represent a significant proportion of CLL-B cells and GrB expression was only slightly induced upon IL21/CD40L triggering as compared to healthy controls (**Sup Figure 2**). Finally, mechanisms of suppression *via* IL10 production have also been ascribed to mature B cells that do not express typical phenotypic markers of CLL-B cells such as plasmablasts or Br1 cells ([69](#)). Our results indicate that the major IL10⁺ and TGFβ1⁺ producing cells are memory CD5⁺CD19⁺CD27⁺ that differ from the other described regulatory subtypes with markers such as CD25, CD24 and CD38. Importantly, CLL-B cells also showed differential propensity to induce expression of TGFβ1, an immunoregulatory factor for Tregs induction and CD8⁺ T cell anergy. These two immunomodulation have also been documented in CLL ([237](#), [253](#), [254](#)). Moreover, TGFβ1 expression, when not already at the highest levels, was induced in a BCR/CD40 dependent manner, mimicking T/B cells interactions. We have previously shown that establishment of a threshold response to BCR triggering is mandatory for CLL-B cell heterogeneous survival ([145](#)). 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. The cytokines that rather promote specific helper T cells responses and pro-inflammatory signals, such as IL1β, IL2, IL4 or IFNγ, were not induced and produced at very low levels as compared to healthy controls. In the pathological context, TGFβ1 was induced at elevated levels while its secretion was not linked to the other cytokines. These results underline the

inflection of the cytokinic balance in favor of the expansion of regulatory populations. Of note, similar IL10⁺ and TGFβ1⁺ subtypes were observed in lymph node aspirates from CLL patients suggesting similar modulatory mechanisms in secondary lymphoid organs.

Interestingly, CLL-B cells and mainly CD5^{high}CD19^{high} 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 as present only in pre-apoptotic B cells in healthy controls ([241](#)). 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. In CD5⁺CD19⁺ samples we observed a strong match between the productions of the two immunoregulators FOXP3 and TGFβ1. Phenotypically, FOXP3⁺ B cells also expressed CD25, another key marker of Tregs, which has been observed in IL10⁺ Br1 cells with antigen specific suppressive functions ([255](#)). Whether some coordinated regulation of FOXP3, TGFβ1, CD5 and CD25 expressions might occur in CLL-B cell subtypes remains to be determined. A relationship between expression of CD5 and IL10 was already documented in CLL-B cells involving STAT3 and NFAT2 activation ([150](#)). Moreover, flow cytometry analysis revealed subpopulations expressing both IL10 and TGFβ1 or IL10 and FOXP3. Actually, 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 should be hypothesized ([222](#)).

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⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ Tregs. This orientation might result from the secretion by CLL-B cells of the two main suppressive cytokines IL10 and TGFβ1 ([50](#)). This expansion was accompanied by a reduction of two major CD4⁺ T cell populations, *e.g.*

expressing TNF- α and IFN γ targets of regulatory B cells, tumor clearance and cytotoxic response ([69](#), [242](#), [256](#)). This suppressive mechanism was dependent on the ratio in the co-culture between T and B cells and reflecting the cellular distortion observed in CLL patients. Finally, CLL-B cells hindered or suppress, in a T/B ratio dependent manner again, CD4⁺ T cells division, a major hallmark of Bregs. Remarkably, our analysis of the three suppressive factors expression identified the CD5^{high}CD19^{high} subpopulation as the functional subset expressing the highest levels of IL10, TGF β 1 and FOXP3. This CD5^{high}CD19^{high} subset allowed distinction of two groups of cases with differential evolution during patients follow up. A reasonable interpretation of this finding is that high levels of regulatory factors provoke exhaustion of tumor survey mechanisms and tumor escape. At the opposite, the lower levels seen in CD5^{dim}CD19^{dim} do not generate warning signals toward tumor survey. Among the three suppressive factors, TGF β 1 only was statistically linked to ZAP70 expression or to BCR/CD40 triggering in IGHV unmutated patient samples arguing for the involvement of BCR signaling in the induction of TGF β 1⁺ cells. In agreement with this result induction of TGF β 1⁺ Bregs was reported upon stimulation with CTLA-4 by T cells ([248](#)). Using T cell-independent CpG stimulation IL10 expressing cells were increased in IGHV mutated cases ([243](#)). Besides, our results indicate the presence of a constitutive pool of IL10⁺ cells that was not induced upon B/T triggering.

In contrast with an individual analysis of suppressive factors, recent studies have interestingly reported a combinatorial evaluation of various cytokines or factors as better indicators of a functional subset. For instance, the balance between IL10 and TNF α expression in CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} Bregs was further associated with renal allograft rejection than individual evaluation ([257](#)). Similarly, a polyfunctional index for T cells assembling expression of various cytokines was shown efficient during infectious disease response ([258](#)). Our analysis proved the benefit of using such a combinatorial score for its possible association with

indicators at risk of progression of CLL patients. 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 score of the CD5^{high}CD19^{high} subset correlated with two major indicators of B cell activation and antigenic recognition, *e.g.* IGHV mutational status and ZAP70 expression. Similarly, higher polyfunctional score was associated with higher number of pejorative factors and patient disease progression necessitating treatment. With a measure of three different regulatory factors, the additional information given by the polyfunctional score might therefore become a better orientation indicator of disease progression and lack of tumor clearance.

Patients, Materials and Methods

A cohort of 42 CLL patients was used in this study. CLL diagnosis was confirmed using international guidelines ([259](#), [260](#)) and approved by the local ethic committee (CLEA, GHPSSD, Avicenne hospital). The clinical and biological parameters (Service d'Hématologie Biologique de l'Hôpital Avicenne) such as Binet stage at the experiment time, CD38 and ZAP-70 expressions, IGHV gene mutational status, cytogenetic features, P53 mutation, other genetic mutations and need of treatment were analyzed (**Tables 1-3**).

Human cells isolation and cell culture

B and T CD4⁺ lymphocytes were isolated from total blood using Rosette B and CD4⁺ 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) at 37°C in humidified incubator containing 5% CO₂ at the concentration of 2.10⁶/ml for 72 hours. B cells were stimulated or not with a combination of

soluble CD40L (1 µg/ml; Miltenyi Biotec) and coated anti-IgM (20 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) or a combination of soluble CD40L and IL21 (50ng/ml, Gibco by Life Technologies).

CD4⁺ T cells were stimulated or not by coated anti-CD3 mAb (Hit-3a, 10 µg/ml; Ebioscience) and anti-CD28 mAb (CD28-2, 1 µg/ml; Ebiosciences). For cytokine detection by flow cytometry, Brefeldin A (BFA) (10 µg/ml; Sigma Aldrich), PMA (500 ng/ml; Sigma Aldrich) and Ionomycin (1 µg/ml ; Sigma Aldrich) were added for the last 4 hours of culture. For B and CD4⁺ T cells co-culture experiments, B and T cells were mixed at different ratios (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10) reaching a total cell number of 2x10⁶ cells. MTS was assessed as previously described ([144](#), [145](#)).

Cell sorting

Cell sorting was performed with purified CD5⁺CD19⁺ peripheral blood CLL-B cells further labeled with PE-Vio770 anti-CD19 (LT19), PerCP-Vio700 anti-CD3 (REA613), APC-Vio770 anti-CD5 (UCHT2) and VioBlue anti-CD27 (M-T271) (Miltenyi Biotec). After doublet cells exclusion, gating on CD19⁺, CD3⁻, CD5⁺ and CD27^{high} cells was performed. Sorted cells were then lysed to perform Western Blot. 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 with protease inhibitors). Proteins (2 to 20 µg) were separated on a 10% SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and incubated with rabbit monoclonal anti-FOXP3 antibody (D608R, Cell Signaling Technologies) and with anti-β actin mAb (AC-74, 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).

Flow cytometry

IL10, TGF β 1 and FOXP3 CLL expressing cells were first labeled for extracellular staining with anti-CD19/V500 (HIB19), anti-CD5/V450 (UCHT2), anti-CD24/FITC (ML5), anti-CD25/APC-Cy7 (M-A251), anti-CD27/PerCP5.5 (M-T271) and anti-CD38/PE-Cy7 (HIT2) mAbs (BD Biosciences) for 20 min. After washes, cells were fixed (2% PFA in PBS 1X), permeabilized (0.5 % saponin, 1% BSA in PBS 1X) and further stained with anti-IL10/APC (JES3-19F1), anti-FOXP3/PE (259D/C7) or anti-TGF β 1/PE (TW4-9E7) mAbs or with their respective isotypes (BD Biosciences) overnight at 4°C.

In co-culture experiments the following alternative panel was used: anti-CD19/V500 (HIB19), CD5/FITC (UCHT2), CD25/APC-Cy7 (M-A251), CD127/PE-Cy7 (SB/199) mAbs (BD Biosciences). Then, cells were fixed, permeabilized and stained with anti-IL10/APC (JES3-19F1), TGF β 1/PE (TW4-9E7) or FOXP3/PE (259D/C7) (BD Biosciences).

For analysis of T cell division or TNF α and IFN γ expression, CD4⁺ T cells were labeled with CellTrace Violet (Invitrogen) immediately after isolation according to the manufacturer's protocol. After co-culture for 72 hours, cells were labeled with anti-CD19/PEVio770 (LT19), CD3/PerCPVio700 (REA613) and CD5/APCVio770 (UCHT2), mAbs (Miltenyi biotec) for 20 min. After washes, cells were fixed and permeabilized with cytofix/cytoperm buffer (BD biosciences) following the manufacturer's protocol and then stained with anti-IFN γ /PE (B27) (BD bioscience) and anti-TNF α /FITC (cA2) (Miltenyi biotech) or relevant isotype mAbs for 1 hour. Flow cytometry analysis was performed using a FACS Canto II driven by DIVA software (BD biosciences) and analyzed with the FlowJo software (Miltenyi Biotec).

Quantification of cytokine secretion in cell supernatants

Supernatants from B, CD4⁺T and B/ CD4⁺T cell cultures and co-cultures were frozen at -80°C and various cytokines (IL-1 β , IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL13, IL17, TNF α and IFN γ , as well as TGF β 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 Mann-Whitney U test for the continuous variables or Wilcoxon signed-rank test (paired data). Association between cytokine secretion and producing cells was analyzed using Pearson correlation (r). Unsupervised hierarchical cluster analysis was performed using IL10, TGF β 1 and FOXP3 expression in unstimulated and stimulated state. An index called polyfunctional score was built by combining IL10, TGF β 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 and Graphpad (Prism 7).

Author Contributions: AM, AQ, MM, LA, ED and NA performed the experiments. AM, CLR, NVB conceived the project, analyzed the data, generated figures and wrote the manuscript. MB and VL performed the statistical analysis and contributed figures. LM provided expertise on cytokine profiles. FC and VL assumed follow-up of the patients and provided patients samples. FBM, RL, FC and VL contributed patients clinical and biological parameters.

Acknowledgments

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.

Abbreviations:

CLL, Chronic lymphocytic leukemia ; IGHV, immunoglobulin heavy chain variable region ; M-IGHV, mutated IGHV; UM-IGHV unmutated IGHV; BCR, antigen receptor of B lymphocytes; ZAP-70, zeta chain associated protein; Th, T helper cell; Treg, regulatory T cell; Breg, regulatory B cell; GrB, granzyme; IDO, indoleamine-2,3 dioxygenase; MFI, Mean Fluorescence Intensity

Figure legends

Figure 1: CLL-B cells express immune regulatory cytokines

A-C: Analysis of purified CD5⁺CD19⁺ CLL-B cells from blood or lymph nodes for IL10 and TGFβ1 production by flow cytometry. (A and C) Representative dot plots with the percentage of positive populations, (B) Graphic representation of IL10⁺ or TGFβ1⁺ cells among blood CD5⁺CD19⁺ cells at the time of isolation (0, n=5) or after three days of culture (3, IL10 n=26,

TGFβ1 n=30) in the presence (+) or not (-) of stimulatory CD40L and anti-IgM. Dotted lines link individual patient samples. (C) Representative co-expression of IL10 and TGFβ1. (D-F) Levels of the indicated cytokines secreted in the culture supernatant were evaluated by MSD technology (n=17). (D right) Linear regression between levels of TGFβ1 in the culture supernatant and the percentage of TGFβ1⁺ cells is presented (r=0.82, n=9). (E) Secreted cytokines levels from 17 CLL cases (UPN) and 3 healthy control (HC) are shown in a heat map representation. (F) Cells were stimulated (+) or not (-) with CD40L and anti-IgM. Wilcoxon signed-rank test and Pearson's correlation. *P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01; ns, not significant P >0.05.

Figure 2: CLL-B cells express FOXP3

(A-C): Analysis of purified CD5⁺CD19⁺ CLL-B cells from blood or lymph nodes for FOXP3 expression by flow cytometry. (A) Representative dot plots with the percentage of positive populations, (B) Graphic representation of FOXP3⁺ cells among CD5⁺CD19⁺ cells at the time of isolation (0, n=4) or after three days of culture (3) in the presence (+, n=29) or not (-, n=27) of CD40L and anti-IgM. Dotted lines link individual patient samples. (C). Representative co-expression of IL10 and FOXP3. (D) U2OS and HEK293T cells transfected with FOXP3 or Mock expressing vectors were used as control. CLL B cells were first purified for CD5⁺ CD19⁺ cells or subsequently sorted for CD5⁺ CD19⁺ CD27⁺ cells as described in Supplementary Figure 3 and immediately analysed by western blot with the indicated antibodies. The dotted line indicates that both sides are obtained from the same western blot. Wilcoxon signed-rank test, ns, not significant P >0.05.

Figure 3 : Phenotypic Characterization of CLL-B cells.

(A-B) : Purified B cells were cultured for 72 hours and stained with the indicated membrane markers, and for IL-10, TGFβ1 or FOXP3. MFI of CD5, CD19, CD25, CD27 were compared between IL10⁺/₋ (n=16), TGF-β1⁺/₋ (n=16) and FOXP3⁺/₋ (n=14) cells in unstimulated (A) and stimulated conditions (CD40L and anti-IgM, B). Ratio of membrane markers MFI between

positive and negative cells is graphed. Wilcoxon signed-rank test * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, *ns*, not significant $P > 0.05$.

Figure 4 : Differential expression of regulatory factors between CD5^{high}CD19^{high} and CD5^{dim}CD19^{dim} subpopulations

(A-C) Purified B cells were stained for CD5 and CD19 and analysed by flow cytometry. (A) Representative dot plot showing the two subpopulations. (B) Representative dot plots of the subpopulations at two time points (T1 and T2) for two groups of patients (#1 and #2). Frequencies of the two populations (High and Dim) were graphed for the two groups (High n=3, Dim n=3). (C) Cumulative results of IL10 (n=26), TGF β 1 (n=30) and FOXP3 (n=31) expression in CD5^{high}CD19^{high} (H) and CD5^{dim}CD19^{dim} (D) cells stimulated (+) or not (-), compared with Wilcoxon signed-rank test, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, *ns*, not significant $P > 0.05$

Figure 5 : Regulatory functions of CLL-B cells

(A) Purified CD4⁺T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 (S) or not (NS) were cultured for 48 hours in presence or not (-) with CLL-B cells activated with CD40L and anti-IgM at the indicated ratios (T/B). Scatter dot plots indicate the frequency of TNF α ⁺ (left, n=5) and IFN γ ⁺ (right, n=9) cells among CD4⁺T cells. ANOVA test * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$. (B) Bar graphs show the frequency of FOXP3⁺ among CD4⁺ T cells and CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺Treg cells upon coculture (+) or not (-) with CLL-B cells (1:1 ratio; n=5) Cells were stimulated (+) or not (-) as indicated. Wilcoxon signed-rank test * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. (C) Flow cytometry analysis of T cells division cycles using cell trace violet. T cells stimulated (S) or not (NS) were cocultured for 48h with CLL-B cells with the indicated ratios. Representative profile of 4 experiments is depicted.

Figure 6: A polyfunctional score is correlated with factors at risk of progression

(A) Unsupervised hierarchical cluster analysis of IL-10, TGF β 1 and FOXP3 expressions in a cohort of 28 patients (UPN). Immunoregulatory factors levels in CLL-B cells stimulated or not are depicted in shades of red (higher) and green (lower). (B) Dimensional analysis of the polyfunctional score according to major risk factors: IGHV (Mutate, M; Unmutated, UM), ZAP70 and CD38 expressions (-, Negative and +, positive), Binet stage (A and B or C), and %MTS (Non responder, NR; Responder, R) of CLL progression in the CD5^{high}CD19^{high} subpopulation. Median and [Q1,Q3] are depicted. * P \leq 0.05 (Mann-Whitney U test).

Supplementary Figure 1: Expression of immune regulatory cytokines

Flow cytometry analysis of purified CD5⁺CD19⁺ CLL-B cells, stimulated (+) or not (-) with CD40-L and anti-IgM. Median of fluorescence intensity (MFI) of IL10⁺ or TGF β 1⁺ cells relative to respective control isotype is presented. *ns*, not significant P > 0.05.

Supplementary Figure 2: Expression of cytokines and Granzyme B

(A) The levels of the indicated cytokines secreted in the culture supernatant of purified CD5⁺CD19⁺ CLL-B cells, stimulated (+) or not (-) with CD40L and anti-IgM were evaluated by MSD technology. Wilcoxon test, *ns*, not significant P > 0.05 (B) Purified CD5⁺CD19⁺ CLL-B cells or healthy control B cells stimulated (+) or not (-) as indicated were analyzed by flow cytometry for Granzyme B (clone GB11, BD Pharmingen) production. Wilcoxon signed-rank test, * P \leq 0.05, ** P \leq 0.01, *ns*, not significant P > 0.05.

Supplementary Figure 3: Expression of FOXP3

(A) Analysis of purified CD5⁺CD19⁺ CLL-B cells, stimulated (+) or not (-) with CD40-L and anti-IgM, for FOXP3 expression by flow cytometry. MFI is presented. *ns*, not significant P > 0.05 (Wilcoxon signed-rank test). (B) Gating strategy during cell sorting showing that the sorted cells were CD19⁺ CD3⁻ CD5⁺ CD27^{high}.

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

(A) Purified B cells were cultured for 72 hours and stained with the indicated membrane markers, and for IL-10, TGF β 1 or FOXP3. MFI of CD24, CD25, CD38 or CD27 were compared between IL10 $^{+/-}$ (n=16), TGF- β 1 $^{+/-}$ (n=16) and FOXP3 $^{+/-}$ (n=14) cells in unstimulated (Top) and stimulated conditions (CD40L and anti-IgM, Bottom). Ratio of membrane markers MFI between positive and negative cells is graphed. Wilcoxon signed-rank test *ns*, not significant $P > 0.05$. (B) Purified B cells were stained for phenotypic markers CD5 and CD19 and intracellular expression of IL10, TGF β 1 and FOXP3 as compared to control isotypes were analysed by flow cytometry in the CD5 high CD19 high and CD5 dim CD19 dim subpopulations (Representative dot plots with the respective frequencies).

Supplementary Figure 5: Correlation between regulatory factors expression and biological annotation

Purified B cells were cultured for 72 hours and stimulated (+) or not (-) with CD40L and anti-IgM. Cells were stained for CD5, CD19 and IL-10, TGF β 1 or FOXP3 expression. The frequencies of IL10 $^{+}$ (A), TGF β 1 $^{+}$ (B) and FOXP3 $^{+}$ (C) cells were compared according to IGHV status (unmutated, UM or mutated, M) and ZAP70 expression (positive or negative) by Wilcoxon signed-rank test, * $P \leq 0.05$.

Supplementary Figure 6: Comparison of the polyfunctional scores with factors at risk of progression

(A) Screen plot showing eigenvalues for components 1-3 with a reference line at eigenvalue of 1. (B-C) (B) Dimensional analysis of the polyfunctional score according to major risk factors: IGHV (Mutated, M; Unmutated, UM), ZAP70 and CD38 expressions (-, Negative and +, positive), Binet stage (A and B or C), and %MTS (Non responder, NR; Responder, R) of CLL progression in the CD5 dim CD19 dim subpopulation (B) and CD5 $^{+}$ CD19 $^{+}$ global population. Median and [Q1, Q3] are depicted. * $P \leq 0.05$ (Mann-Whitney U test).

Supplementary Figure 7: Phenotypic evaluation of regulatory B cell subtypes.

Purified B cells were culture for 72 hours and stimulated (+) or not(-) with CD40L and anti-IgM. Cells were stained with a backbone of CD5 CD19 and CD24 CD27 or CD24 CD38. The frequencies of CD24^{high}CD27⁺ and CD24^{high}CD38^{high}cells are shown on Top. Expression of IL10,, TGFβ1 or FOXP3 by CD24^{high}CD27⁺ or CD24^{high}CD38^{high}cells are graphed (stimulated condition, bottom). Wilcoxon signed-rank test,*P≤0.05, ** P≤0.01.

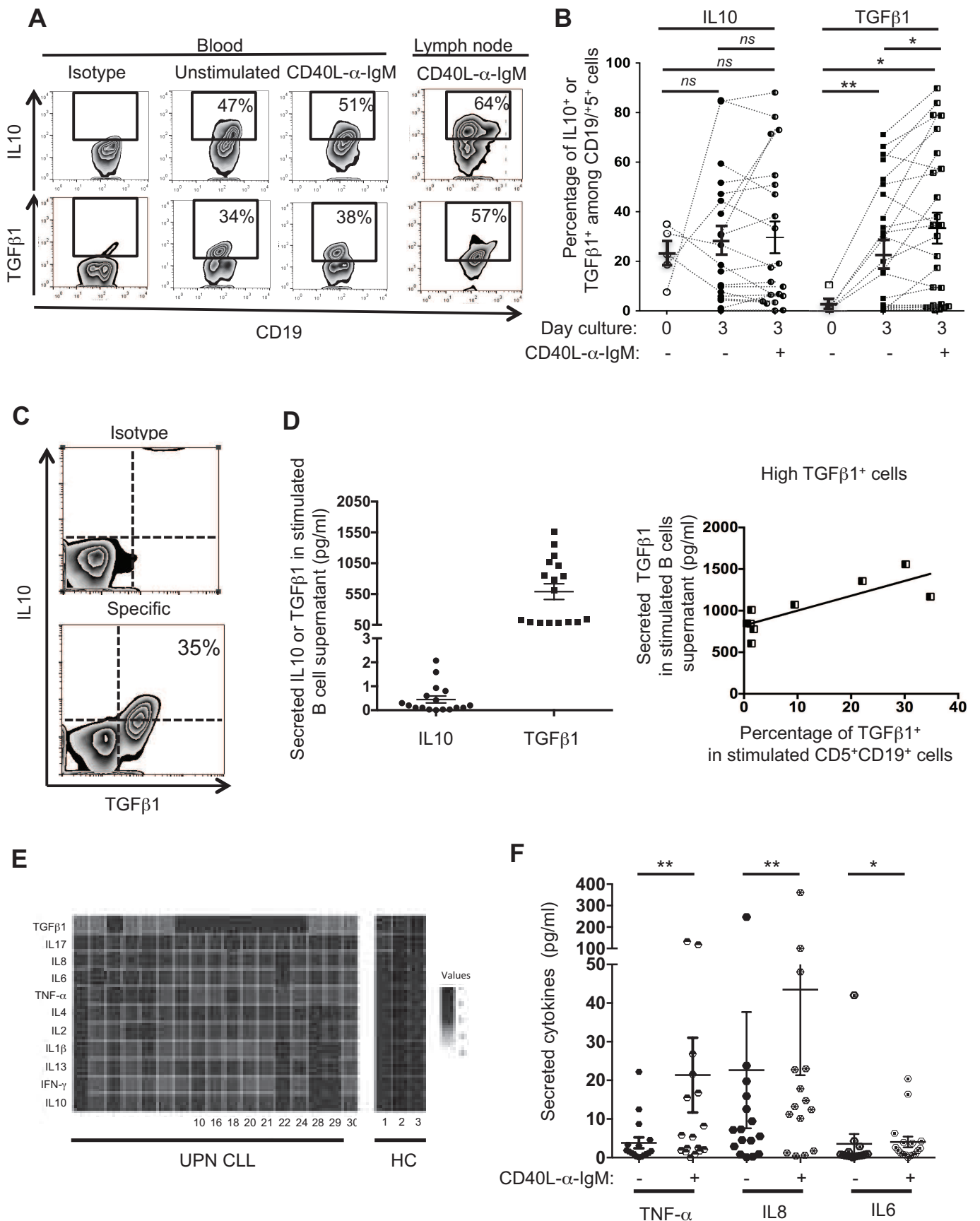
References

1. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145-62. doi: 10.1038/nrc.2016.8. PubMed PMID: 26911189.
2. Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(6):431-8. Epub 2010/10/27. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.09.006. PubMed PMID: 20920582.
3. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194(11):1639-47. PubMed PMID: 11733578; PubMed Central PMCID: PMCPMC2193523.
4. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194(11):1625-38. PubMed PMID: 11733577; PubMed Central PMCID: PMCPMC2193527.
5. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(2):356-65. doi: 10.1182/blood-2011-12-397158. PubMed PMID: WOS:000307412400020.
6. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res*. 2006;66(14):7158-66. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0085. PubMed PMID: 16849562.
7. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008;112(1):188-95. Epub 2008/02/21. doi: 10.1182/blood-2007-09-111344. PubMed PMID: 18292287.
8. Märklin M, Heitmann JS, Fuchs AR, Truckenmüller FM, Gutknecht M, Bugl S, et al. NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 2017;8(1):755. Epub 2017/10/02. doi: 10.1038/s41467-017-00830-y. PubMed PMID: 28970470; PubMed Central PMCID: PMCPMC5624906.
9. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17008. Epub 2017/02/09. doi: 10.1038/nrdp.2017.8. PubMed PMID: 28179635.

10. Taylor JG, Gribben JG. Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects. *Semin Cancer Biol.* 2015;34:36-45. Epub 2015/07/29. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.07.004. PubMed PMID: 26232774; PubMed Central PMCID: PMC4592463.
11. Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J, Wasik E. T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia--the three-color flow cytometry analysis. *Leuk Res.* 2002;26(7):657-60. PubMed PMID: 12008083.
12. Jitschin R, Braun M, Büttner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood.* 2014;124(5):750-60. Epub 2014/05/21. doi: 10.1182/blood-2013-12-546416. PubMed PMID: 24850760.
13. Inoue S, Mai A, Dyer MJ, Cohen GM. Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2006;66(13):6785-92. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4563. PubMed PMID: 16818655.
14. Gorosito Serrán M, Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Acosta Rodriguez EV, Montes CL, Gruppi A. The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. *FEBS Lett.* 2015;589(22):3362-9. Epub 2015/09/28. doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.048. PubMed PMID: 26424657.
15. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity.* 2015;42(4):607-12. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.005. PubMed PMID: 25902480.
16. Noh J, Choi WS, Noh G, Lee JH. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune Netw.* 2010;10(6):247-9. Epub 2010/12/31. doi: 10.4110/in.2010.10.6.247. PubMed PMID: 21286386; PubMed Central PMCID: PMC3026945.
17. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity.* 2014;41(6):1040-51. Epub 2014/11/04. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.016. PubMed PMID: 25484301.
18. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 2010;32(1):129-40. Epub 2010/01/14. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009. PubMed PMID: 20079667.
19. DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia.* 2013;27(1):170-82. Epub 2012/07/13. doi: 10.1038/leu.2012.165. PubMed PMID: 22713648; PubMed Central PMCID: PMC3742013.
20. Drennan S, D'Avola A, Gao Y, Weigel C, Chrysostomou E, Steele AJ, et al. 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.* 2017. Epub 2017/01/03. doi: 10.1038/leu.2016.356. PubMed PMID: 27890932.
21. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(1):34-46. Epub 2010/12/10. doi: 10.1038/nri2901. PubMed PMID: 21151033.
22. Horikawa M, Minard-Colin V, Matsushita T, Tedder TF. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4268-80. Epub 2011/10/24. doi: 10.1172/JCI59266. PubMed PMID: 22019587; PubMed Central PMCID: PMC3204847.

23. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. 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.* 2011;186(10):5569-79. Epub 2011/04/04. doi: 10.4049/jimmunol.1100284. PubMed PMID: 21464089.
24. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med.* 2013;5(173):173ra23. doi: 10.1126/scitranslmed.3005407. PubMed PMID: 23427243.
25. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol.* 2015;27(10):479-86. Epub 2015/06/12. doi: 10.1093/intimm/dxv038. PubMed PMID: 26071023; PubMed Central PMCID: PMC4587489.
26. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011;117(2):530-41. Epub 2010/10/20. doi: 10.1182/blood-2010-07-294249. PubMed PMID: 20962324; PubMed Central PMCID: PMC3031478.
27. Shalpour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature.* 2015;521(7550):94-8. Epub 2015/04/29. doi: 10.1038/nature14395. PubMed PMID: 25924065; PubMed Central PMCID: PMC4501632.
28. Hagn M, Blackwell SE, Beyer T, Ebel V, Fabricius D, Lindner S, et al. B-CLL cells acquire APC- and CTL-like phenotypic characteristics after stimulation with CpG ODN and IL-21. *Int Immunol.* 2014;26(7):383-95. Epub 2014/02/04. doi: 10.1093/intimm/dxu001. PubMed PMID: 24497611; PubMed Central PMCID: PMC4133571.
29. Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun.* 2015;59:53-60. Epub 2015/03/07. doi: 10.1016/j.jaut.2015.02.004. PubMed PMID: 25753821.
30. Hamblin TJ, Oscier DG. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev.* 1997;11(3):119-28. PubMed PMID: 9370043.
31. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J Exp Med.* 2011;208(1):67-80. Epub 2011/01/10. doi: 10.1084/jem.20101499. PubMed PMID: 21220451; PubMed Central PMCID: PMC3023138.
32. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:841-94. Epub 2001/12/19. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141018. PubMed PMID: 12615894.
33. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* 2013;73(8):2468-79. Epub 2013/02/05. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3450. PubMed PMID: 23384943.
34. Parekh VV, Prasad DV, Banerjee PP, Joshi BN, Kumar A, Mishra GC. 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.* 2003;170(12):5897-911. PubMed PMID: 12794116.
35. Jak M, Mous R, Remmerswaal EB, Spijker R, Jaspers A, Yagüe A, et al. Enhanced formation and survival of CD4+ CD25hi Foxp3+ T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(5):788-801. doi: 10.1080/10428190902803677. PubMed PMID: 19452318.

36. Vadasz Z, Peri R, Eiza N, Slobodin G, Balbir-Gurman A, Toubi E. The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *J Immunol Res.* 2015;2015:254245. Epub 2015/10/04. doi: 10.1155/2015/254245. PubMed PMID: 26504851; PubMed Central PMCID: PMC4609458.
37. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, et al. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol.* 2011;186(8):4835-44. Epub 2011/03/11. doi: 10.4049/jimmunol.1003050. PubMed PMID: 21398617.
38. Hossain DM, Panda AK, Manna A, Mohanty S, Bhattacharjee P, Bhattacharyya S, et al. FoxP3 acts as a cotranscription factor with STAT3 in tumor-induced regulatory T cells. *Immunity.* 2013;39(6):1057-69. Epub 2013/12/05. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.005. PubMed PMID: 24315995.
39. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun.* 2011;36(3-4):228-38. Epub 2011/02/12. doi: 10.1016/j.jaut.2011.01.005. PubMed PMID: 21316922.
40. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, Carter CR, Davison A, Hernandez-Fuentes M, et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(7):1575-85. Epub 2014/03/07. doi: 10.1681/ASN.2013080837. PubMed PMID: 24610932; PubMed Central PMCID: PMC4073434.
41. Larsen M, Arnaud L, Hié M, Parizot C, Dorgham K, Shoukry M, et al. 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.* 2011;41(9):2596-605. Epub 2011/08/04. doi: 10.1002/eji.201041131. PubMed PMID: 21688259.
42. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111(12):5446-56. Epub 2008/01/23. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906. PubMed PMID: 18216293; PubMed Central PMCID: PMC2972576.
43. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26 Suppl 5:v78-84. doi: 10.1093/annonc/mdv303. PubMed PMID: 26314781.



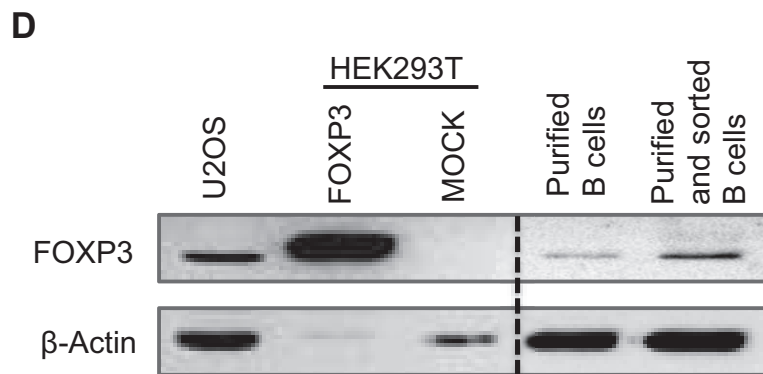
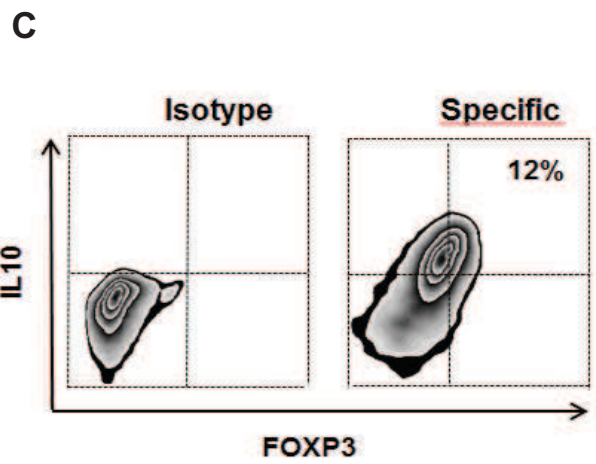
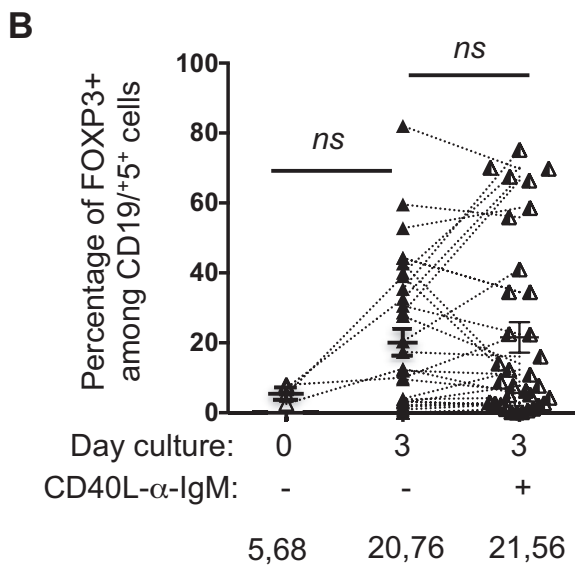
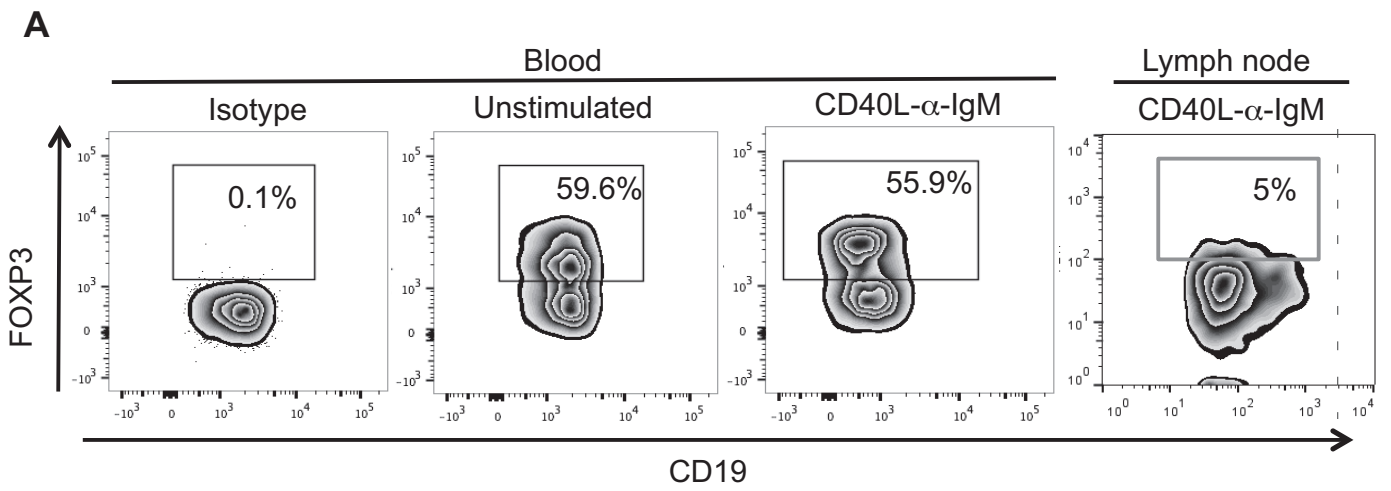


Figure 2

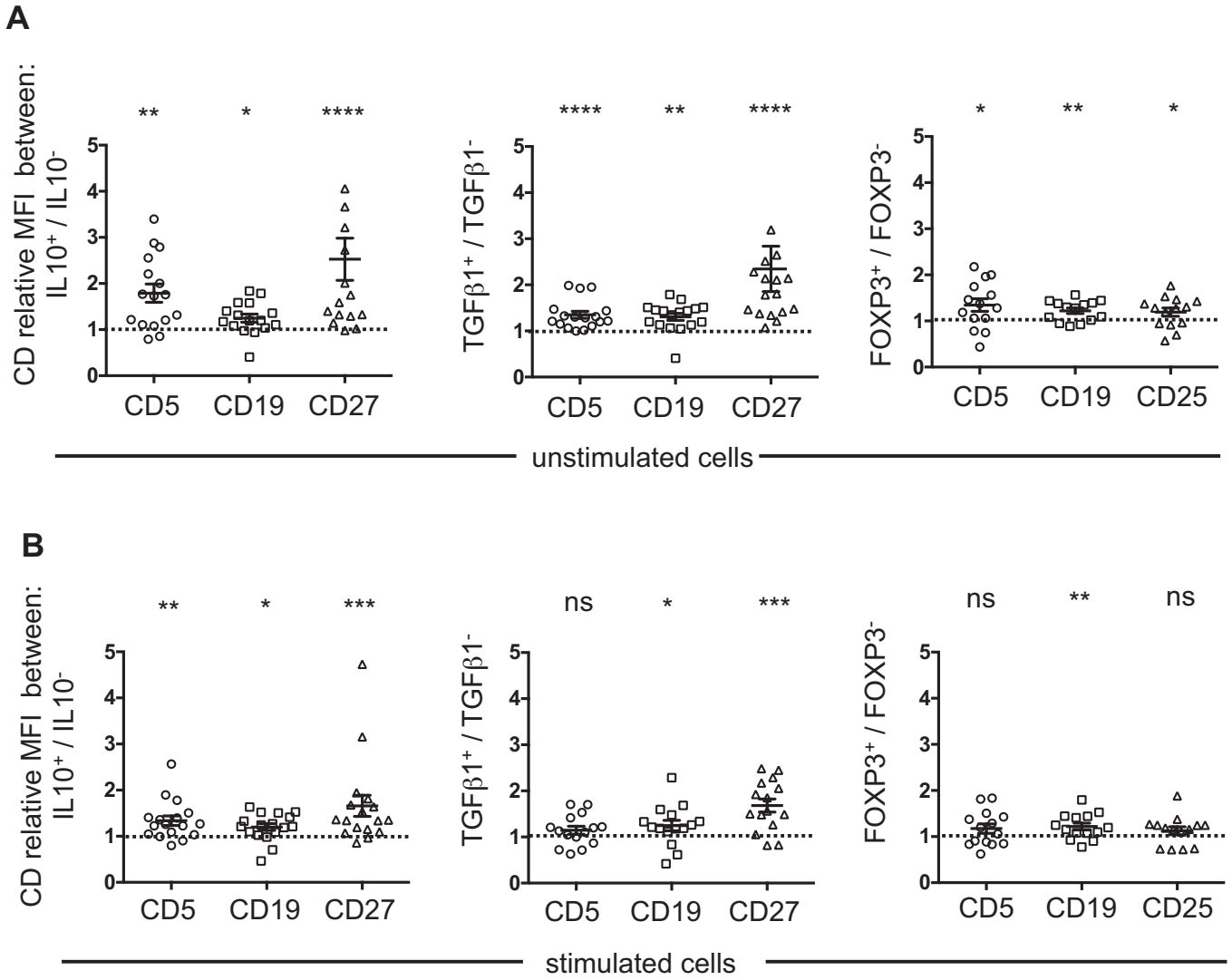


Figure 3

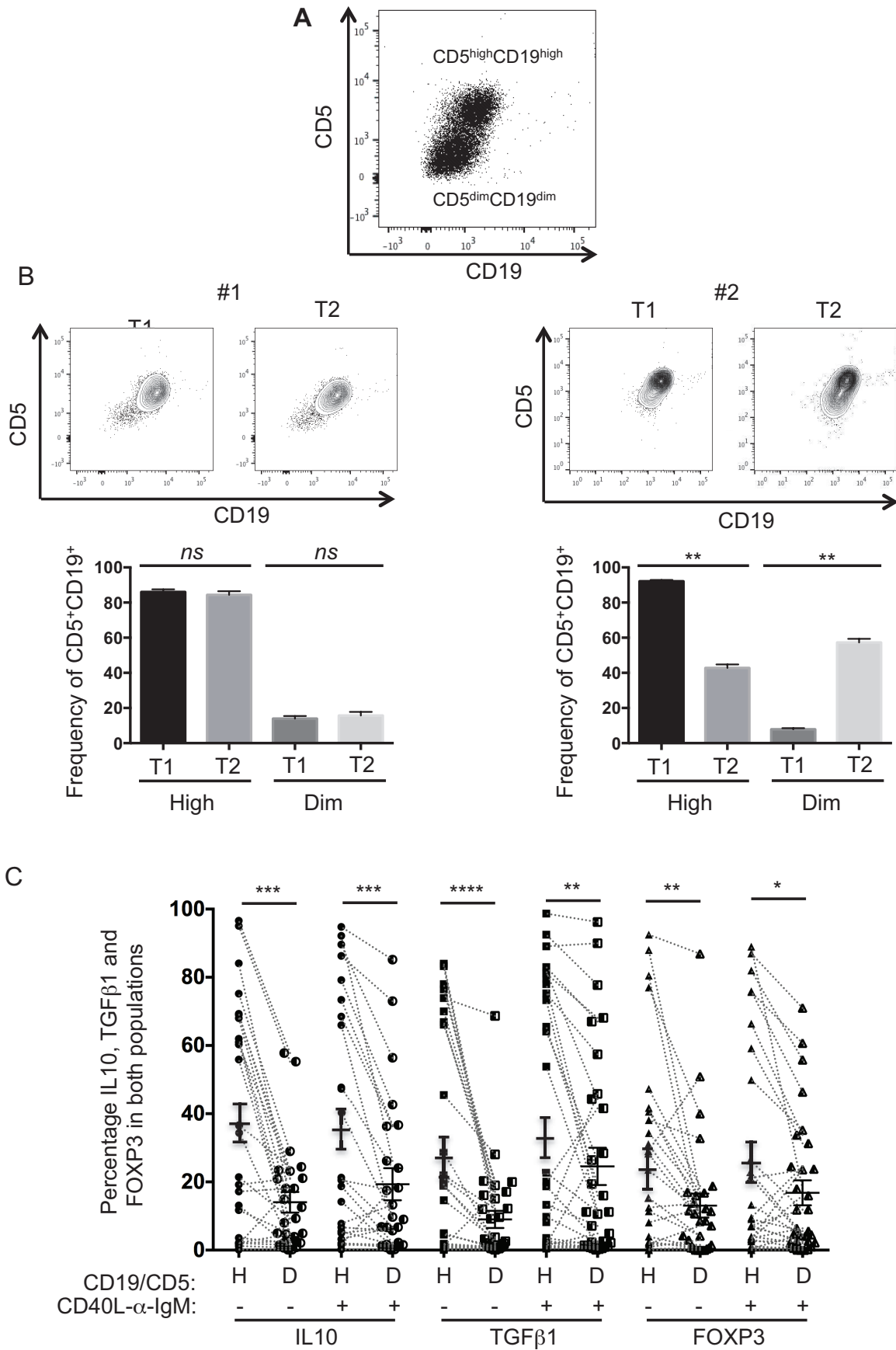


Figure 4

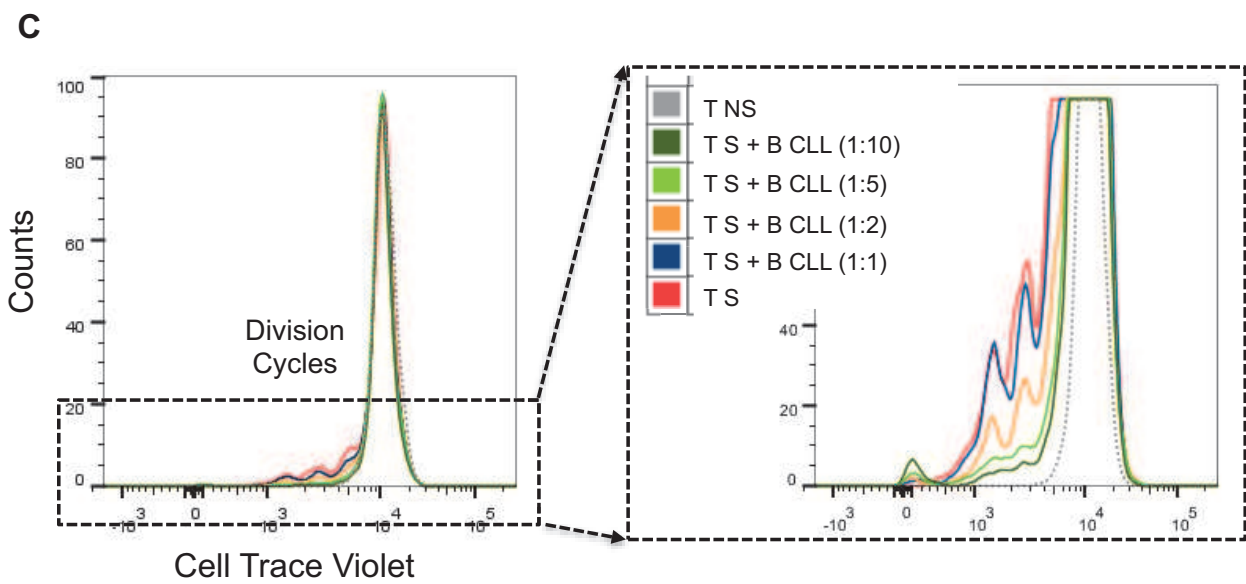
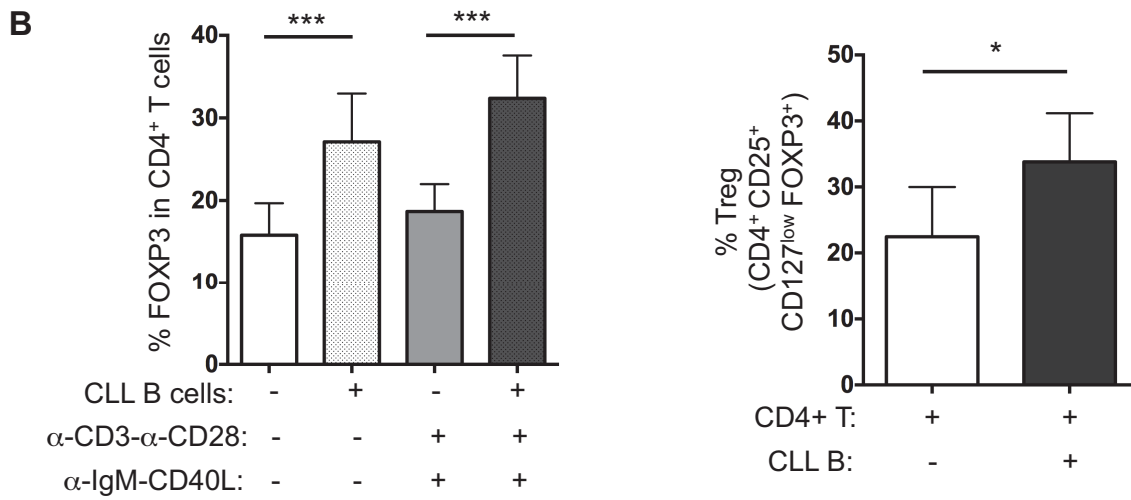
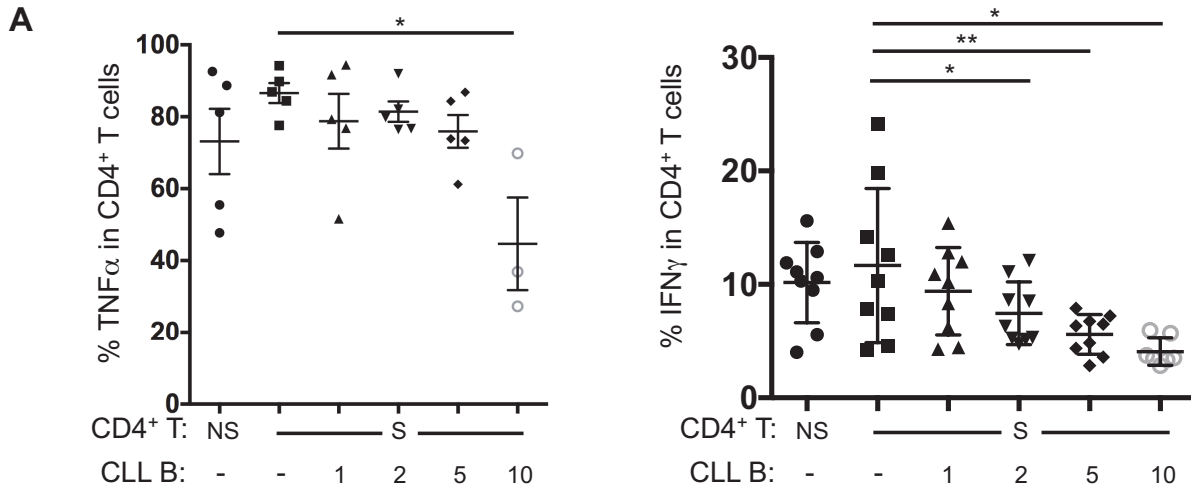
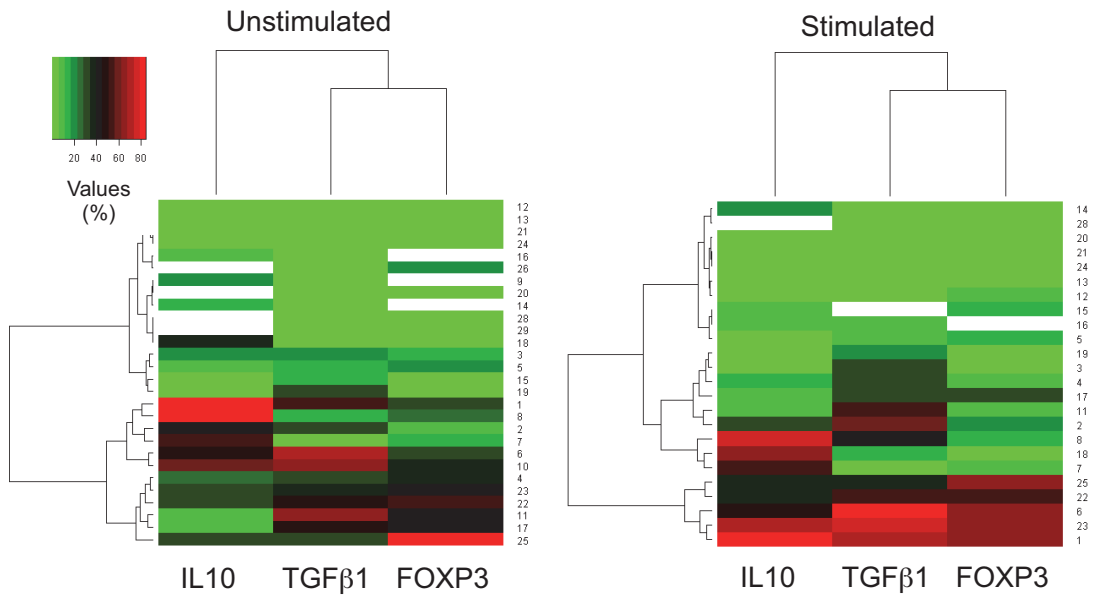
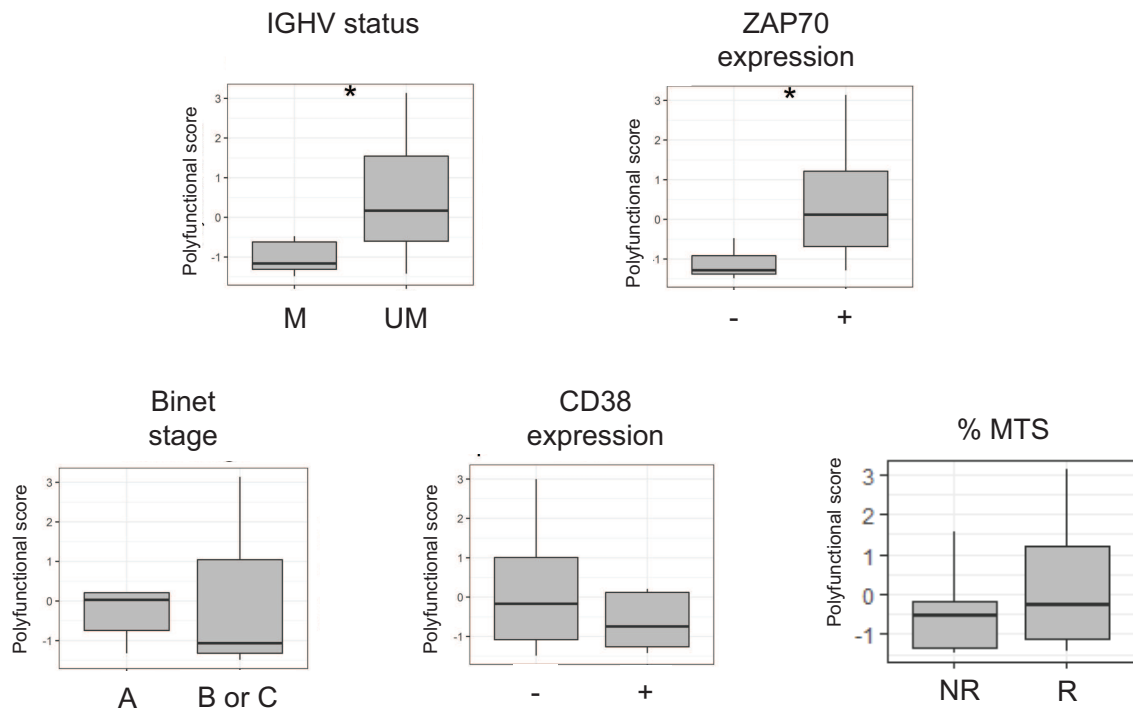
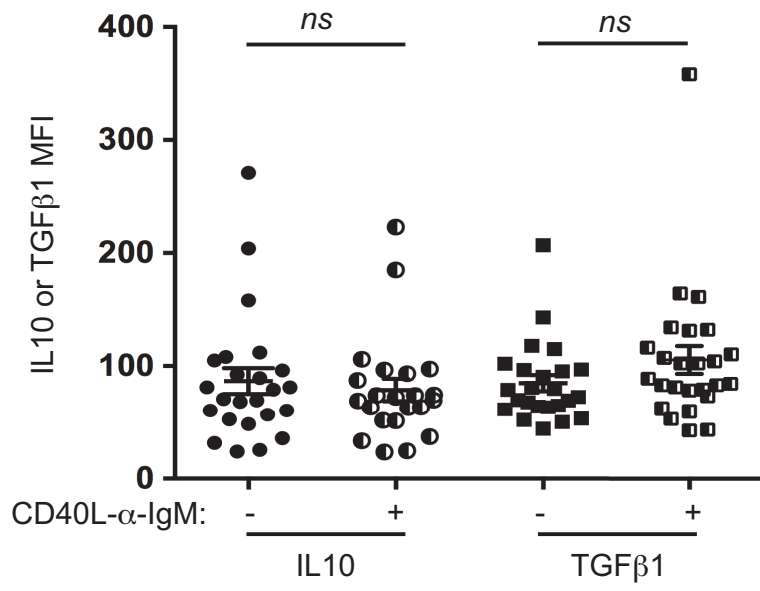
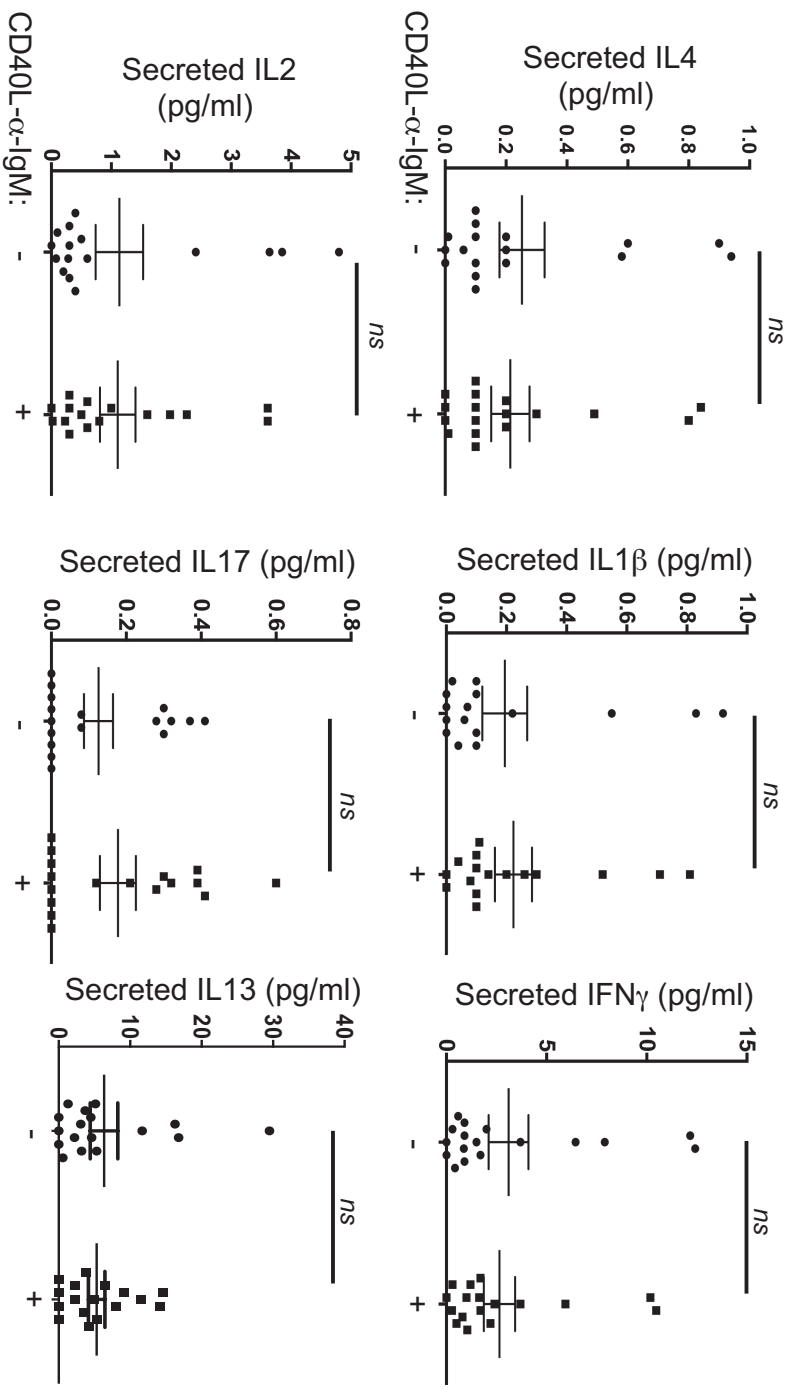
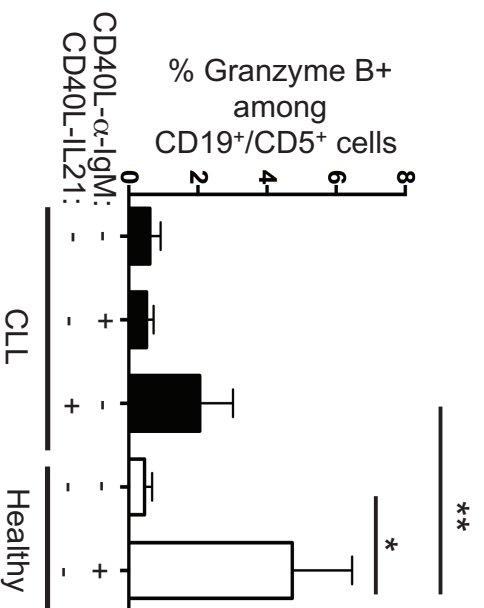


Figure 5

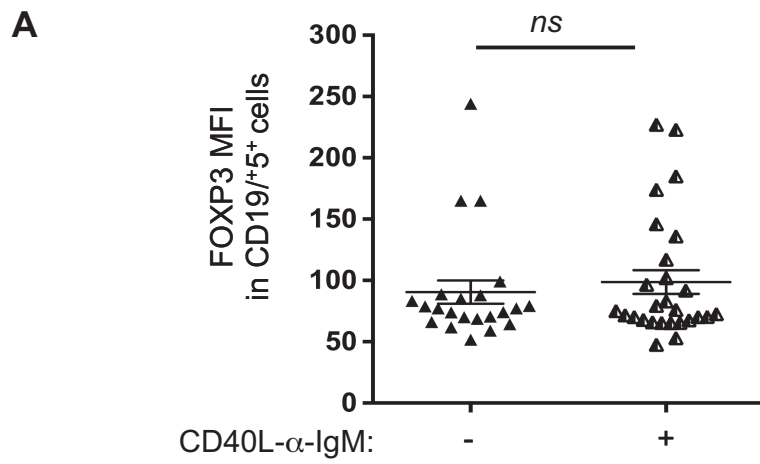
A**B****Figure 6**



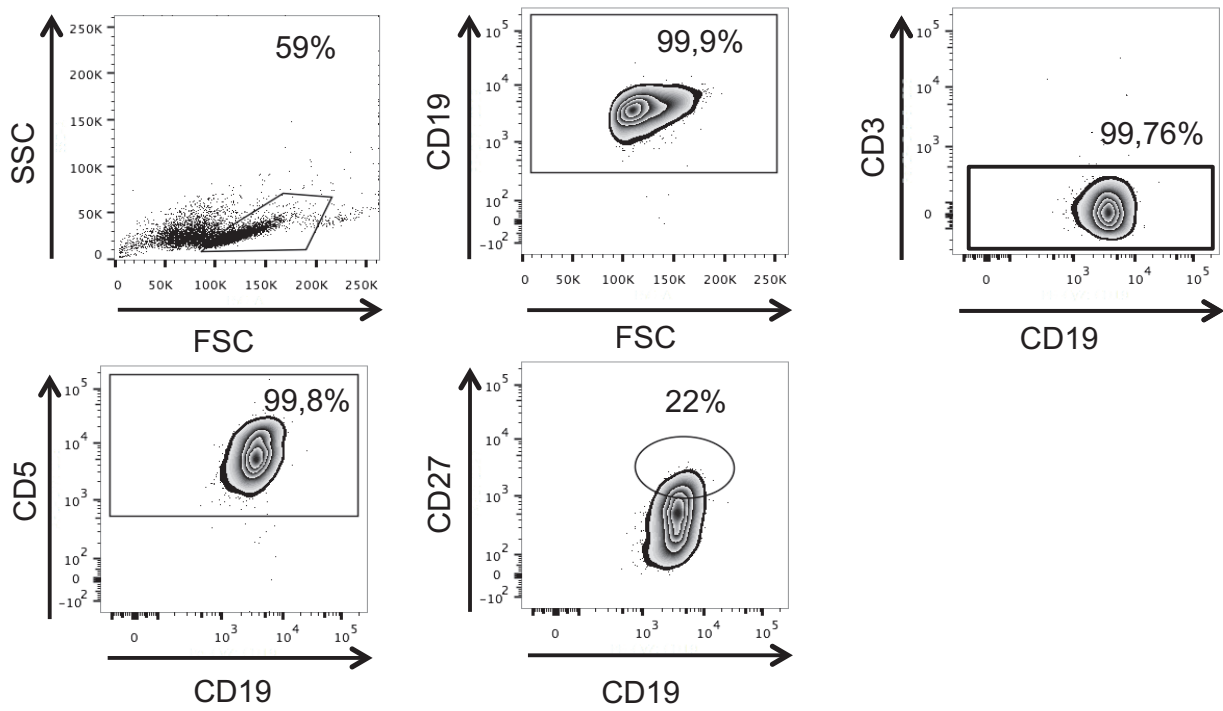
Supplementary Figure 1

A**B**

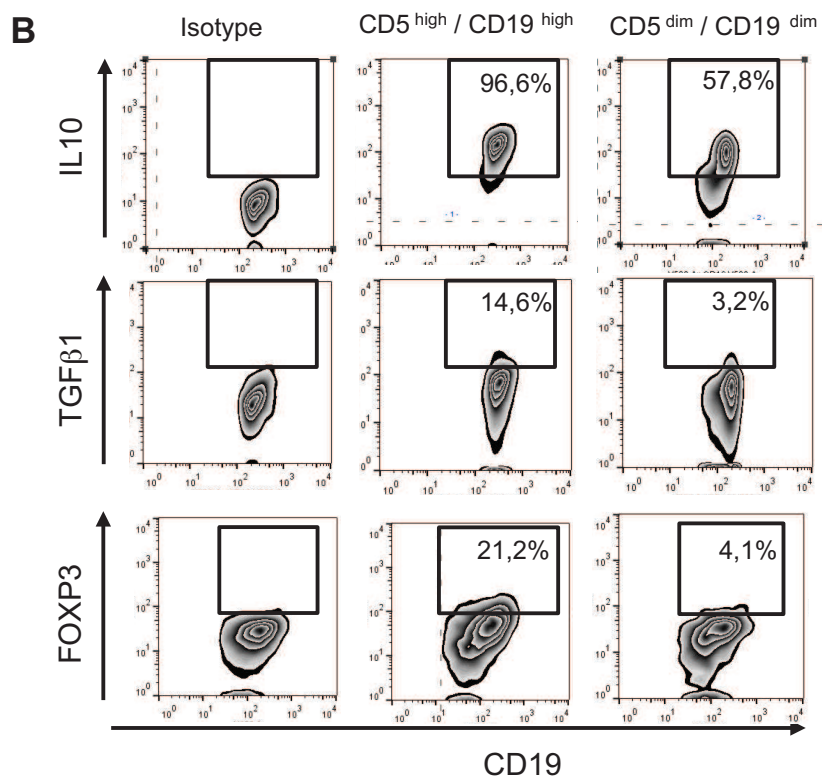
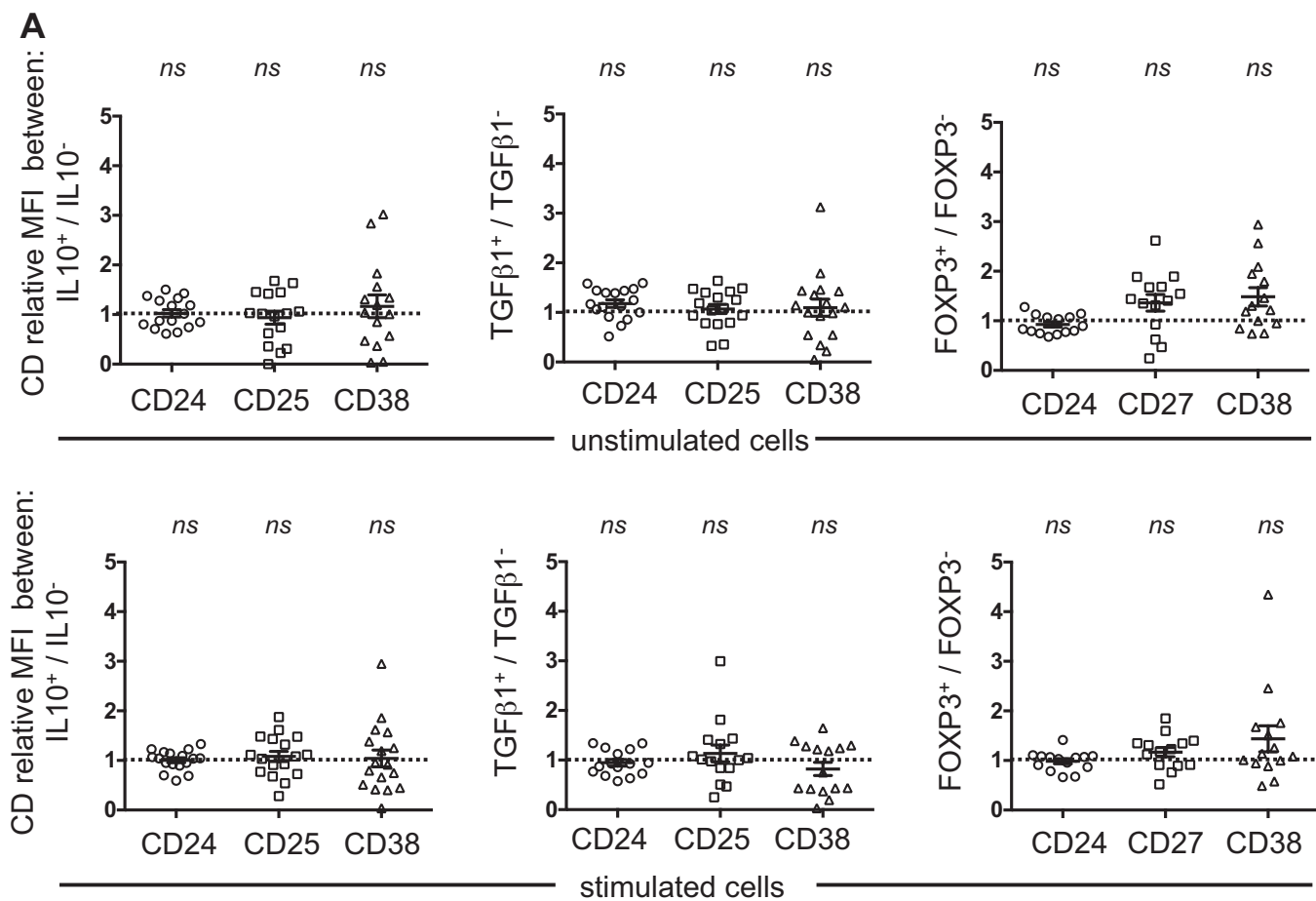
Supplementary Figure 2



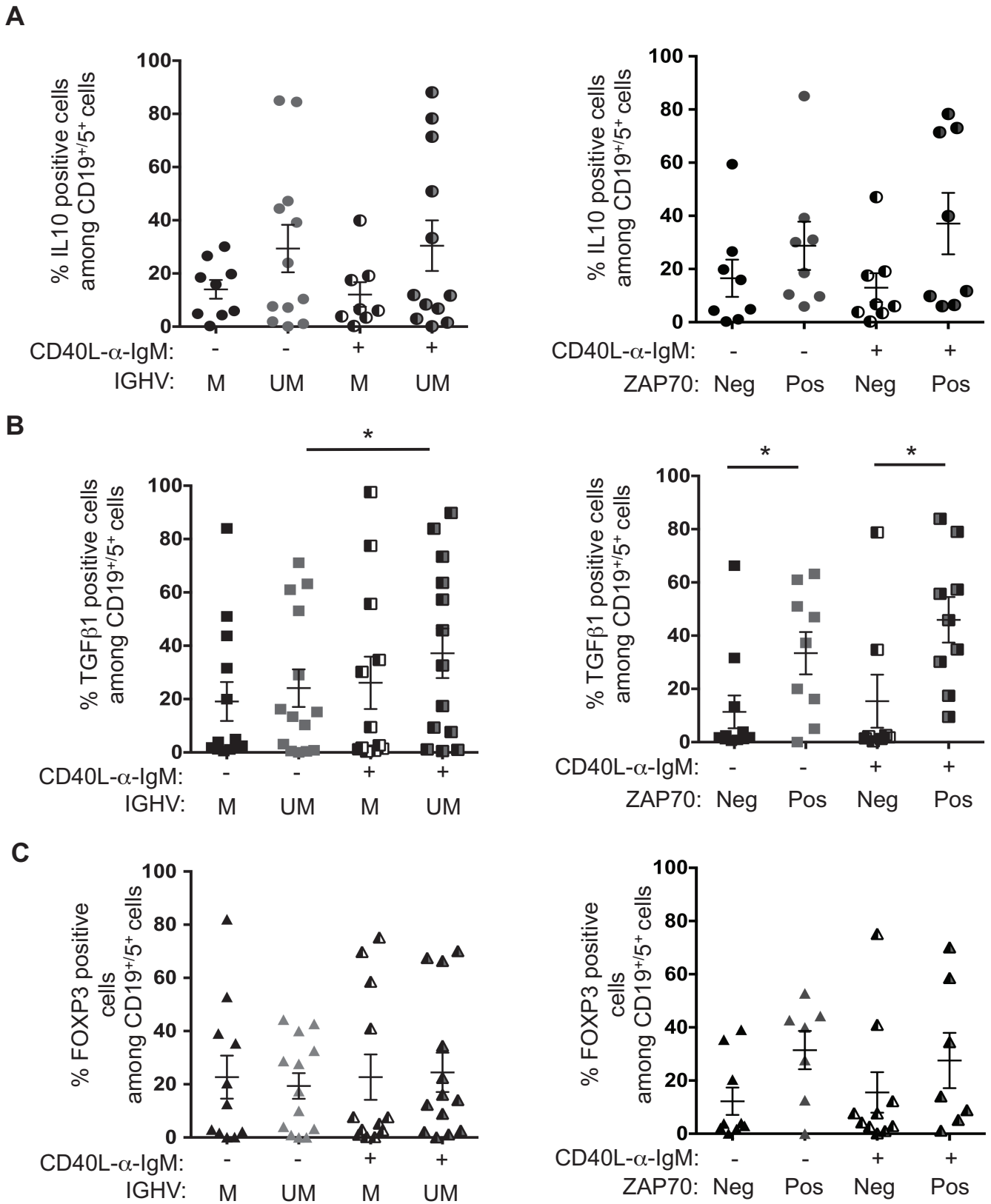
B



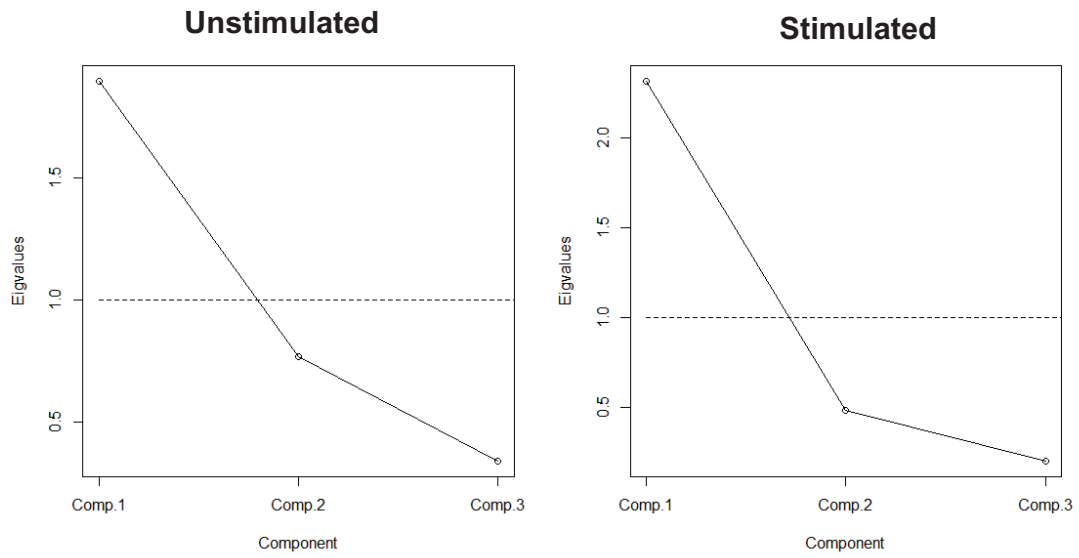
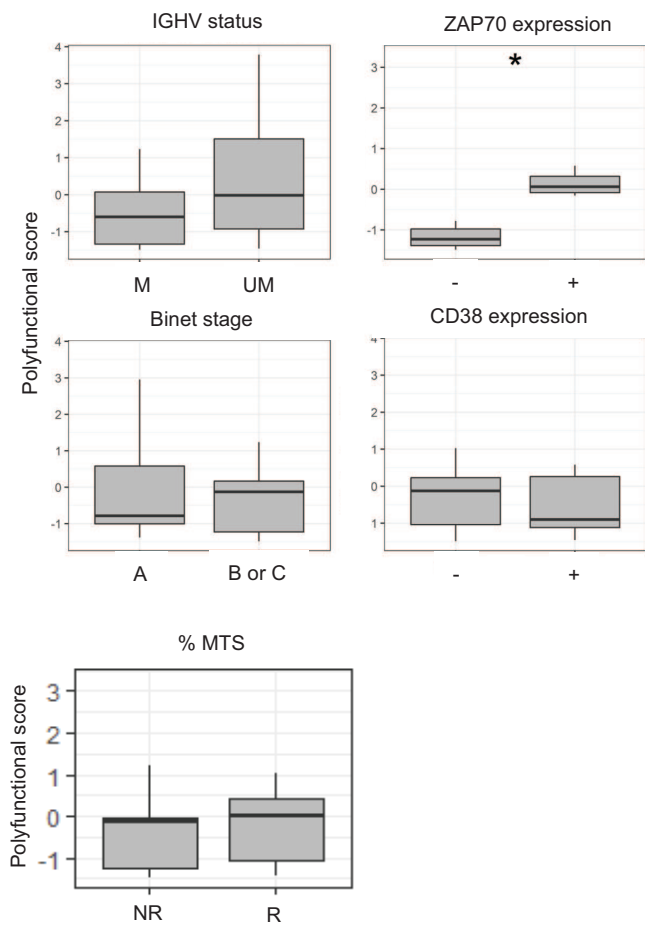
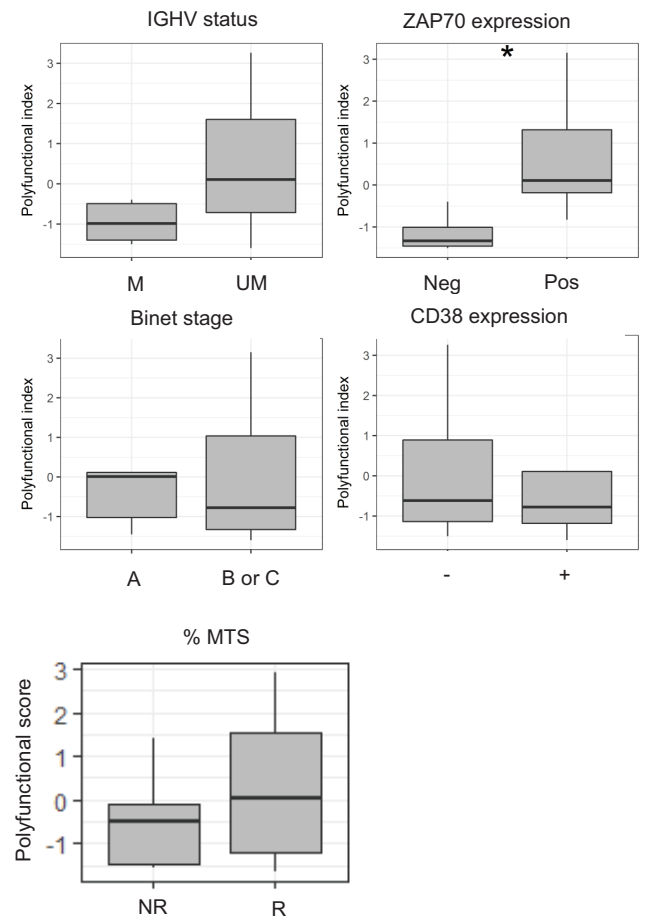
Supplementary Figure 3

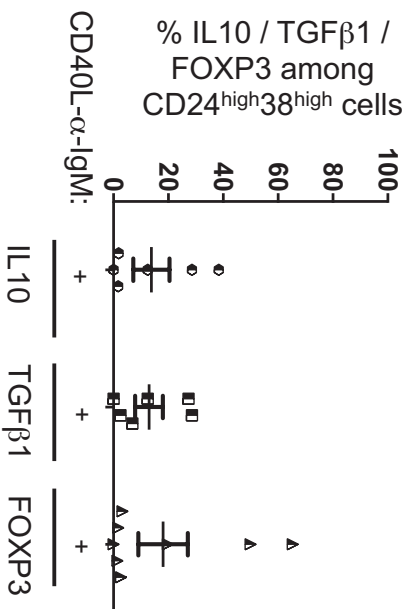
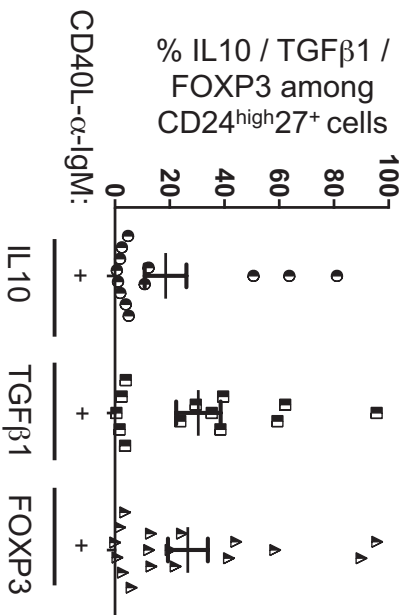
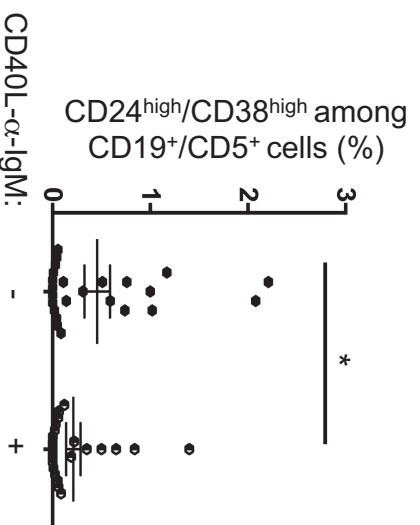
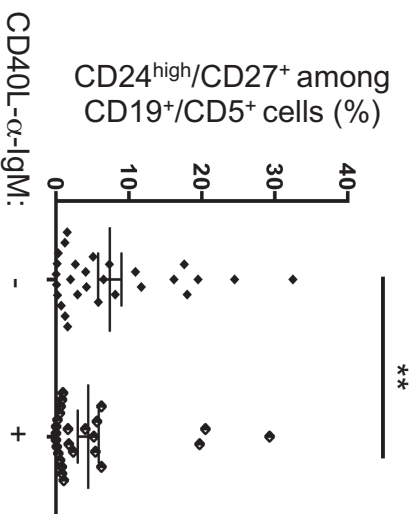


Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5

A**B****C****Supplementary Figure 6**



Supplementary Figure 7

Table 1. Summary of Patients' biological and clinical parameters.

Numbers of CLL patients	n=42
Age (years)	64.24 ± 10.76
Sexe (Female/Male)	15 / 27
Binet Stage at experiment (number and %)	
A	29/40 (69.05%)
B	7/40 (16.67%)
C	6/40 (14.28%)
IGHV unmutated	19/40 (47.5%)
ZAP70 positivity	13/29 (44.82%)
CD38 positivity	15/33 (45.45%)
MTS (R vs NR number and %)	19 vs 23 (45.24% vs 54.76%)

Table 2 : Detailed CLL patients's clinico-biological features

UPN	Age (years)	Sexe ^A	Binet stage	Lymphocytosis (G/L)	IGHV status ^B	Zap70 expression ^C	CD38 expression ^C	MTS (NR/R) ^D
1	60	F	C	19000	UM	ND	NEG	ND
2	72	F	A	107000	UM	ND	NEG	R
2	74	F	C	300000				
3	68	F	A	9000	M	POS	POS	NR
4	78	F	A	10450	M	NEG	NEG	R
5	45	M	C	57250	UM	ND	POS	R
6	48	M	C	57000	UM	ND	POS	R
7	59	M	A	13000	ND	ND	NEG	NR
8	70	F	A	13880	UM	POS	ND	R
8	70	F	C	75480				
9	71	F	A	56430	M	NEG	NEG	R
10	64	M	A	14000	M	NEG	ND	NR
11	49	M	C	11940	UM	POS	POS	NR
12	66	M	B	90950	M	NEG	POS	R
13	55	M	A	5830	UM	ND	POS	R
13	56	M	A	15000				
14	56	F	A	29000	M	NEG	POS	R
14	58	F	A	41000				NR
15	59	F	B	11310	UM	NEG	NEG	NR
16	48	M	A	43000	M	POS	NEG	R
16	50	M	B	120000				NR
17	74	F	C	13000	UM	POS	POS	NR
18	61	M	B	28350	UM	POS	POS	NR
19	58	M	C	25000	UM	ND	POS	R
20	56	M	A	139970	ND	NEG	NEG	NR
21	75	M	A	9250	M	NEG	ND	NR
22	53	M	A	12000	M	POS	NEG	NR
22	55	M	A	15000				
23	63	M	A	14900	UM	POS	POS	R
24	85	F	A	8000	M	NEG	NEG	NR
25	53	M	A	61000	M	ND	ND	R
26	55	M	A	41500	M	NEG	NEG	R
27	49	M	B	39930	UM	POS	NEG	R
28	64	M	A	4000	M	NEG	NEG	
28	68	M	A	4500				
29	65	M	B	24980	UM	ND	POS	NR

30	62	M	A	21000	M	ND	NEG	R
31	81	M	A	35100	UM	POS	ND	ND
32	90	F	A	6160	M	NEG	ND	NR
33	70	M	B	39000	UM	POS	POS	R
34	70	M	A	12100	UM	NEG	POS	NR
35	69	M	B	25300	UM	POS	ND	R
36	75	F	A	32900	M	ND	ND	NR
37	85	M	A	146000	M	ND	ND	NR
38	62	M	A	17340	UM	POS	POS	NR
39	58	M	A	18200	M	NEG	NEG	NR
40	59	F	A	47000	M	ND	NEG	NR
41	67	F	A	8190	M	NEG	NEG	NR
42	71	F	A	18100	M	NEG	NEG	R

Footnotes:

A. F: female and M: male

B. UM: unmutated; M: mutated; ND: not determined

C. POS: positive; NEG: negative

D. Metabolic activity in response to anti-IgM stimulation; R: Responder \geq 25%; NR: Non-Responder $<$ 25%

Table 3: CLL features and polyfunctional score

UPN	Treat- ment ^A	Binet stage ^B	Zap70 ^C	IGHV ^D	CD38 ^E	FISH ^F	TP53 ^G	Other Mut ^H	Score 0/1	Polyfunctional score
14	0	0	0	0	1	0	0	0	7/1	-0,8
14	0	0	0	0	1	0	0	0	7/1	-0,37
28	0	0	0	0	0	ND	0	1	6/1	-1,24
28	0	0	0	0	0	ND	0	1	6/1	-0,98
20	0	0	0	ND	0	0	ND	ND	5/0	-1,12
21	0	0	0	0	ND	0	ND	ND	5/0	-1,56
24	0	0	0	0	0	0	1	1	6/2	-1,57
13	0	0	ND	1	1	0	0	1	4/3	-1,73
13	0	0	ND	1	1	0	0	1	4/3	-1,26
12	1	1	0	0	1	0	1	1	3/5	-1,65
15	0	1	0	1	0	0	1	0	5/3	-1,26
16	0	0	1	0	0	0	0	1	6/2	-0,88
5	0	1	ND	1	1	ND	0	1	2/4	-0,66
19	1	1	ND	1	1	1	1	1	0/7	-0,79
3	0	0	1	0	1	0	ND	ND	4/2	-0,47
4	0	0	0	0	ND	1	1	0	5/2	0,84
17	1	1	1	1	1	1	0	1	1/7	1,1
11	1	1	1	1	1	0	0	1	2/6	1,52
2	0	0	ND	1	0	0	0	1	5/2	0,21
2	0	1	ND	1	0	0	0	1	4/3	1,02
8	0	0	1	1	ND	0	0	1	4/3	1,18
8	0	1	1	1	ND	0	0	1	3/4	2,26
18	ND	1	1	1	1	0	0	0	3/4	-1,02
7	0	0	ND	1	0	0	ND	ND	4/1	-0,36
25	1	0	ND	0	ND	0	1	1	3/3	2,3
22	ND	0	1	0	0	0	0	0	6/1	1,87
6	1	1	ND	1	1	0	0	1	2/5	2,02
23	0	0	1	1	1	1	0	0	3/4	1,11
1	1	1	ND	1	0	0	0	1	3/4	2,36

E. 0: no treatment at experiment time; 1: treatment at the experiment

F. 0: A at the experiment time; 1: B or C treatment at the experiment

G. 0: Zap70 negative; 1: Zap70 positive

H. 0: IGVH mutated; 1: IGVH unmutated

I. 0: CD38 negative; 1: CD38 positive

J. 0: del17 and/or del11 negative; 1: del17 and/or del11 positive

K. 0: TP53 WT; 1: TP53 mutated

L. 0: no mutated; 1: at least one mutated gene (*NOTCH1*, *POT1*, *RPS15*, *SF3B1*, *BIRC3*, *FBW7*, *ATM*, *MYD88*, *PLCG2*)

Expression de FOXP3 par les lymphocytes B de LLC

Les sous-populations de lymphocytes B de LLC décrites dans cet article présentent de nombreuses similitudes à la fois phénotypiques et fonctionnelles avec les cellules B régulatrices. Les lymphocytes B régulateurs expriment des facteurs dont l'expression est partagée avec les lymphocytes T régulateurs. FOXP3 est un facteur de transcription caractéristique de ces Tregs et qui a longtemps été considéré comme un marqueur spécifique de cette population. Plusieurs travaux ont tenté de caractériser, à l'image de ceux effectués sur les Tregs, un facteur de transcription spécifique des Bregs. La capacité des lymphocytes B régulateurs à exprimer FOXP3 a été très peu analysée. Une seule étude montre que des populations lymphocytaires de sujets sains exprimant le CD5 peuvent aussi exprimer FOXP3 ([241](#)).

Dans cet article, nous démontrons pour la première fois, la capacité des lymphocytes B de LLC à exprimer le facteur FOXP3.

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la mise en évidence de FOXP3 dans les cellules B de LLC, tout d'abord par cytométrie en flux, en identifiant une sous-population de lymphocytes B de LLC CD19⁺CD5⁺FOXP3⁺ constitutive mais dont la fréquence varie d'un patient à l'autre (**Article 1**). J'ai ensuite confirmé cette expression par western blot. L'expression de la protéine dans les cellules B purifiées à partir de sang périphérique est plus importante dans les cellules B de LLC mémoires, triées CD19⁺CD5⁺CD27^{hi}. Cette sous-population de cellules B de LLC exprime également de manière plus importante que les autres cellules tumorales les autres facteurs immunorégulateurs décrits précédemment (**Article 1**). La population FOXP3 positive exprime également des niveaux plus importants du facteur CD25, un autre marqueur de cellules régulatrices que les cellules FOXP3⁻.

Bien que les expériences de cytométrie en flux nous aient permis de révéler des sous-populations de lymphocytes B de LLC exprimant à la fois l'IL-10 et FOXP3, le lien entre ces deux facteurs immunorégulateurs et le rôle de FOXP3 dans la fonction régulatrice des lymphocytes B de LLC restent indéterminés.

II. Régulation de l'IL-10 et de l'IL-6 dans la LLC et relevance physiopathologique

Comme nous avons pu le voir dans l'**Article 1** et comme cela a été montré par certains travaux, les cellules B de LLC présentent des propriétés immunosuppressives et altèrent la réponse immunitaire anti-tumorale via la production d'IL-10 ([102](#), [195](#)). La production de facteurs immunosuppresseurs comme l'IL-10 pourrait ainsi permettre le maintien voir l'expansion clonale des lymphocytes B de LLC.

Si l'effet de l'IL-10 produit par les cellules de LLC sur les lymphocytes T et l'immunité anti-tumorale a été étudié, l'effet direct de cette cytokine sur ces cellules B tumorales elles-mêmes a très peu été décrit.

Cependant, plusieurs études ont montré que les cytokines produites, après liaison à leurs récepteurs, peuvent intervenir comme des facteurs autocrines ou paracrines de survie dans les cellules immunitaires dont les lymphocytes B.

L'IL-10 et l'IL-6 sont deux cytokines capables d'activer STAT3 et d'induire leur propre production comme cela a été montré par notre équipe, dans le lymphome à cellules du manteau, un second lymphome composé de cellules B ([163](#)). À l'inverse de leur production plus importante d'IL-10, les cellules de LLC secrètent des niveaux plus faibles d'IL-6 par rapport aux cellules B normales (**Article 1**) même si des niveaux élevés d'IL-6 ont été décrits dans le sérum de patients atteints de LLC et corrélés à un mauvais pronostic ([162](#), [226](#)). Les lymphocytes B sont donc capables de sécréter ces cytokines mais aussi d'exprimer leurs récepteurs ce qui peut conduire à une meilleure survie des cellules tumorales et donc à la progression de la pathologie.

Le principal objectif de ma thèse a été d'étudier cette balance cytokinique entre l'IL-10 et l'IL-6, les effets de ces cytokines sur la survie des lymphocytes B de LLC ainsi que sur leur propre production.

Dans ce second **Article**, nous avons démontré un effet pro-survie de l'IL-10 sur les lymphocytes B de LLC ainsi qu'une régulation autocrine de la cytokine *via* l'activation de STAT3. Ainsi, l'IL-10 joue un rôle clé dans le maintien de ces cellules leucémiques, en agissant aussi bien sur les cellules du microenvironnement tumoral que sur les cellules leucémiques elles-mêmes.

Article 2

IL10 production allows self-activation of Chronic lymphocytic leukemia cells

Maïssa Mhibik (1, 2), Laure Aubard (1, 2), Alireza Ghasemizadeh (1, 2), Nicolas Dumoitier (5,6), Stéphanie Le Coquil (1, 2), Lionel Guittat (1, 2), Luc Mouthon (5,6), Florence Ajchenbaum-Cymbalista (1,2,3), Vincent Lévy (4), Christine Le Roy (1, 2), Denis Lesage* (1, 2) and Nadine Varin-Blank* (1, 2).

IL10 production allows self-activation of Chronic lymphocytic leukemia cells

(76 characters 9 words)

Maïssa Mhibik (1, 2), Laure Aubard (1, 2), Alireza Ghasemizadeh (1, 2), Nicolas Dumoitier (5,6), Stéphanie Le Coquil (1, 2), Lionel Guittat (1, 2), Luc Mouthon (5,6), Florence Ajchenbaum-Cymbalista (1,2,3), Vincent Lévy (4), Christine Le Roy (1, 2), Denis Lesage* (1, 2) and Nadine Varin-Blank* (1, 2).

(1) INSERM, U978, Bobigny, France

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

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

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

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

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

* Co-senior and corresponding authors

Correspondence and reprints to: Nadine Varin-Blank and Denis Lesage

UMR InsermU978/ Université Paris 13

UFR SMBH

74 Rue Marcel cachin

93000 Bobigny

France

Email: nadine.varin@inserm.fr and denis.lesage@univ-paris13.fr

Original Article

Abbreviations: CLL: chronic lymphocytic leukemia; Ab: antibody, PMA: Phorbol myristate acetate; BFA: BrefeldinA; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia is a CD5⁺ B cell lymphoma that presents with a heterogeneous clinical outcome. Antigenic stimulation is a major driver of this heterogeneity. A subset of the leukemic cells exhibits regulatory properties with the production of IL10. In line with this secretion, CLL patients exhibit immune defects toward the recognition and suppression of the leukemic cells. This study addressed the potential impact of IL10 production on CLL-B cells survival. IL10⁺ sub-population was present in larger proportions in CLL *versus* healthy donor samples. Cases with the highest percentages of IL10⁺ cells associated a parallel reduction of the IL6⁺ subset. The cells expressed higher levels of the cytokines receptors and responded to exogenous IL10, and in much weaker extents to IL6, allowing tyrosine phosphorylation of STAT3. Subsequently, IL10 only, induced anti-apoptotic genes expression. Remarkably, IL10 stimulation up-regulated also the *IL10* own-transcription resulting in enhanced metabolic activity. IL6 did not exert such activation. The existence of an IL10-driven autocrine loop was demonstrated using anti-IL10R blocking antibody. Incubation with the antibody prevented STAT3 activation and inhibited the metabolic activity generated under IL10 production. These results shed lights on the self-activation mechanism that gives a survival advantage to the IL10⁺ subset. IL10 production by CLL-B cells is therefore both immunoregulatory toward other immune cells but also self-activating for the leukemic clone. Therapeutic strategy targeting IL10R in addition to BCR-mediated pathways could foster the IL10⁺ subset triggering.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a mature B cell neoplasm prevalent in the western countries. Elderly-patients present with a heterogeneous clinical outcome ranging from an asymptomatic lymphocytosis to lymphoid organs massive infiltration illustrative of indolent or progressive diseases, respectively ([260](#)). While indolent patients show no decrease of life expectancy, patients with an evolving disease need rapid therapeutic options.

CLL results from the accumulation of quiescent CD5⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD23⁺ B cells with further clonal expansion of proliferative sub-populations ([261](#)). A number of studies showed that CLL survival and expansion *in vivo* are highly dependent on activation signals provided by the surrounding microenvironment in blood, lymph nodes and bone marrow ([232](#)). As a result, purified CLL-B cells enter rapidly in apoptosis when cultured alone *ex vivo*. Survival signals are generated both by direct cellular contacts within tissues and production of soluble factors including chemokines, cytokines and growth factors. Interactions and cross-talks have been described with bone marrow and lymph nodes stromal cells, T cells, monocytic-derived cells as well as blood-derived nurse-like cells and leukemic cells themselves ([237](#), [262-264](#)).

Pro-survival and growth factors derive from these surrounding cells, upon interaction or not, and from the activated tumor cells. These factors comprise chemokines such as CCL21/19, CXCL12, CXCL13, CCL3, CCL4, cytokines such as IL4, IL6, IL8, IL10, IL17, IL21, BAFF and APRIL among others. Various combinations of these molecules upon exogenous treatments or in co-culture experiments improve survival and growth of the leukemic cells ([133](#), [134](#), [265-267](#)). Moreover, several factors show elevated levels in the serum of CLL patients and proved their survival benefit *ex vivo*. In parallel, elevated levels of several cytokines and chemokines comprising notably CCL3, CCL4 and IL10 in the patients' serum correlated with worst outcome. Reversely, low levels of IL4, IL6, IL8 or IL17 were observed in those sera while more abundant in patients with a good prognosis ([134](#), [267](#), [268](#)). These factors are, at least partially, also produced and secreted by CLL-B cells upon activation of membrane receptors including Toll-like receptors (TLR), BAFF receptor TACI, chemokine receptors, CD40, CD5 and, of outmost importance in the heterogeneous signaling profile of CLL-B cells, the antigen receptor (BCR). Importantly, two essential cytokines in the survival *versus* apoptosis of B cells, IL6 and IL10, are regulated in CLL-B cells upon triggering of these receptors ([145](#), [150](#), [196](#), [198](#), [243](#), [269](#)).

Recent studies have highlighted the importance of an IL10-producing subpopulation in the immunological alterations encountered in CLL patients. Characterization of the subpopulation

showed phenotypic features such as CD5 and CD24 markers shared with regulatory B cells named B10. Indeed, IL-10⁺ CLL subset exhibited regulatory properties toward other hematological counterparts such as monocytic and lymphoid T cells accounting for the profound immune dysfunction observed in CLL patients ([101](#), [102](#), [237](#), [243](#), [264](#)). This sub-population showed biased T cell subsets similar to regulatory B cells described in autoimmune diseases with a large decrease of CD4⁺ T cells expressing IFN γ or TNF α and increase of CD25⁺ CD127^{low} FOXP3⁺ regulatory T cells further elevating secreted IL10 ([50](#), [52](#), [102](#)). Of note, the presence of CD5 at the membrane of CLL-B cells has also been shown accounting for IL10 production ([150](#)).

IL10 is not only considered as an immunoregulatory factor but also allows activation of various cellular subsets including B cells through binding to its cognate receptor (IL10R) and subsequent activation of the Janus kinase (JAK)/ Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) pathway. STAT3 is predominantly associated with IL10 signaling and is found constitutively activated in CLL-B cells ([269](#), [270](#)). This activation leads notably to the expression of anti-apoptotic genes of the Bcl2 family and promotes B cells proliferation ([174](#)). Targeting this pathway using blocking antibodies against IL10R has proved an efficient therapeutic strategy in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) ([175](#)). An elevated production of both IL10 and IL6 has also been described in Mantle cell lymphoma (MCL), another CD5⁺ B-cell lymphoma, where an autocrine loop, including activation of NF κ B and STAT3 was demonstrated ([271](#)). In CLL, activation of these transcription factors was suggested upon *in vitro* culture with engagement of CD160 leading to the production of IL6. This regulation was further correlated with the expression of STAT3 target genes of the Bcl2 family that accounted for the reduced apoptosis observed under such culture conditions ([269](#), [272](#)).

In the present study, we investigated in a cohort of patients at various disease stages the relevant production of IL6 and IL10 cytokines by malignant B cells in terms of self-activation survival mechanisms. We report an inverse-correlation between proportions of cells expressing either one or the other cytokine with a prevalence for the IL10⁺ sub-population. Our results further demonstrate the existence of an autocrine loop that allows activation of STAT3 at its tyrosine 705 (Y705), in addition to the constitutive activation of its serine 727 (S727). The resultant self-activation leads to increased metabolic activity through the expression of anti-apoptotic proteins and, importantly, induces IL10 *de novo* expression.

Results

CLL-B cells exhibit inverse proportions of IL10⁺ versus IL6⁺ cells

A subset of CLL-B cells has been described to express regulatory cytokines and factors including IL10 and TGFβ1 ([102](#)). A cohort of CLL patients was screened for IL10 expressing cells and compared to healthy donors (HC). A rather dim proportion of CD19⁺ cells purified from HC expressed IL10 (mean 4%, n=17). Comparatively, CD19⁺ cells from CLL patients exhibited significantly higher percentages of IL10⁺ cells (ranging from 5.3 to 50.6%, mean 27%, n=17). Moreover, IL10 expression was increased in CD19⁺ cells from CLL patients as compared to HC (Figure 1A and supplementary Figure 1A). To confirm the prevalence of CLL cells to express regulatory cytokines, we investigated the frequency of CD19⁺ cells expressing the survival and pro-inflammatory cytokine IL6. Quantification showed an opposite situation with very low proportion of cells expressing IL6 in CLL patients (< 3.5%, n=14) as compared to healthy controls (from 1.3 to 17.5 %, n=14). Indeed, IL6 expression was also very low in CLL-B cells in contrast with normal CD19⁺ cells (Figure 1B and supplementary Figure 1B). CD5⁺CD19⁺ tumor cells evaluated for both cytokines expression confirmed an inversed link between the percentages of cells expressing either IL10 or IL6 in individual patients. The proportion of IL10⁺ cells was clearly higher than IL6⁺ cells and the latter were very few in CLL samples (Figure 1C, n=6).

Stimulation of IL10 receptors increased the metabolic activity of CLL-B cells

Expression of IL10 is linked to regulatory properties targeting other immune cells toward decreased tumor recognition ([101](#), [102](#), [174](#)). Meanwhile, a self-activating loop was previously evidenced in mantle cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma leading to the constitutive activation of STAT3 transcription factors *via* the BCR-dependent production and secretion of IL10 and IL6 ([175](#), [273](#), [274](#)). PS727 STAT3 is also constitutively activated in CLL cells ([207](#)). Therefore, we analyzed in CLL cells the expression of the two cytokines receptors. The level of receptors expression was compared between IL10⁺ and IL10⁻ CD5⁺CD19⁺ tumor cells from the same patient. We observed a significant increase of both IL10R and IL6R expressed at the membrane in IL10⁺ versus IL10⁻ cells (Figure 2A). Likewise, membrane markers, including CD5, IgM and CD40, described as potential activator of IL10 expression, were differentially increased in IL10⁺ CLL B cells compared with IL10⁻ (Figure 2B). A differential expression of IL10R and IL6R was also observed when CD19⁺ CLL cells were compared with healthy controls (Figure 2C, n=12).

Altogether these results suggest that IL10⁺ CLL B cells express higher levels of receptors to respond to IL10 stimulation and may trigger IL10 production.

Next, the response of CLL cells to these cytokines stimulation was deciphered. When cells were cultured for 24 h in the presence of IL10 (40 ng/ml) a relevant activation of the cells, as measured using a MTT assay, was found. In contrast, IL6 triggering drove an irrelevant enhancement of the cell metabolic activity. Of note, the IL-10 dependent cellular activation remained at lower levels compared with those observed upon CpG triggering (Figure 2D, n=10).

IL10 or IL6 stimulation of CLL-B cells activates STAT3

Since both IL10 and IL6 triggering may activate STAT3, a set of patient samples was examined for STAT3 phosphorylation (pSTAT3) at two important activation residues. In unstimulated cells, a basal phosphorylation at S727 residue was found for every individual case although at weaker extents than two control cell lines. Inversely, Y705 phosphorylation was undetectable from all cases analyzed, very weak in the Hg3 CLL cell line and positive in U2OS cells (Figure 3A). Dose-response stimulation with IL10 or IL6 (5 to 120 ng/ml) was then applied to the cells for 15 min and phosphorylation of both S727 and Y705 residues was analyzed. S727pSTAT3 present in unstimulated cells was not significantly modified upon triggering by IL10 or IL6 and even high doses (120ng/ml) of the cytokines did not improve S727 phosphorylation for several samples (n=3). In reverse, IL10 or IL6 stimulation (15 min) led to a dose-dependent phosphorylation at Y705 residue. Moreover, up to 40 ng/ml a significant difference was observed between the two cytokines with a clear advantage for IL10 stimulation (Supplemental Figure 2A-B). A kinetic experiment confirmed the dominant effect of IL10 over IL6 and the importance of Y705 phosphorylation. A relevant phosphorylation of S727STAT3, already visible after 5 min of IL10 stimulation (40 ng/ml) reached more than 10 fold increase at 15-30 min whereas IL6 triggering enhanced S727 phosphorylation to weaker extents (up to 3 fold, n= 6, Figure 3B). The levels of activation reached for Y705pSTAT3 were 10 fold higher upon IL10 stimulation with a very rapid kinetic leading to maximal phosphorylation after 5-15 min and sustained over 24 h. Moreover, a very important difference was observed upon IL6 stimulation for which less than 25 fold induction was found after 30 min stimulation with a rapid decrease after 1 h (Figure 3C).

Altogether, these results argue for an important capacity of CLL cells to activate STAT3 in response to IL10-mediated triggering and to a much lesser extent to IL6.

IL10 stimulation induces cytokines and anti-apoptotic genes expression

STAT3 is an important transcription factor that regulates cytokines, cell-cycle and pro-survival factors expression. Its activation induces both IL10 and IL6 transcription in various lymphoid cells (273, 275). Then, STAT3 target genes expression was evaluated upon IL10 or IL6 (40 ng/ml for 24 h) stimulations in CLL patients' samples with TLR-mediated CpG stimulation as a positive control. As shown in Figure 4, IL10 stimulation induced *IL10* gene expression by 2.5 fold, indicative of a self-activating loop in malignant B cells.

Enhanced transcription of two major anti-apoptotic genes was also evidenced in these cells with increase of both Bcl-xL (2 fold) and Bcl-2 (2 fold). In contrast, cyclin D1, another target of STAT3, and *IL6* gene were not induced by IL10 stimulation. When tumor B cells from the same patients were stimulated by IL6, none of the various genes was induced to significant levels (n= 10). These data show that IL10 stimulation specifically induces several important pro-survival genes and, importantly, mediates its own transcriptional activation.

Anti-IL10R treatment antagonizes CLL-B cells activation and survival

Finally, preventing binding of the cytokine to its cognate receptor was used to challenge the IL10-mediated cellular activation. Patient samples were pre-incubated with the blocking anti-IL10R antibody (Ab) (clone 3F9, 20 µg/ml) prior to stimulation with IL10 (40 ng/ml). Indeed, the levels of pS727- and pY705-STAT3 were first analyzed under such conditions. While the blocking Ab did not alter the basal level of pS727STAT3, it tended to prevent the activation induced upon IL10 triggering. Nonetheless, the low levels of induction seen upon stimulation did not allow detecting a significant decrease of pS727STAT3 (Figure 5A, graph n=5). Meanwhile, preventing IL10 binding to its receptor strongly inhibited induced phosphorylation at Y705STAT3 (Figure 5B n=6). Such culture conditions with the blocking Ab prior to stimulation with IL10 during 24 h dramatically decreased the survival of the cells as evaluated using a MTT assay (Figure 5C, n=9). These results shed lights on the self-activating regulation of CLL cells through the production of IL10 and the subsequent activation of its cognate receptor powering survival of the tumor cells.

Discussion

In this study we demonstrate, for the first time, the existence of an autocrine loop mediated by the production of IL10 that serves amplifying the metabolic activity of CLL-B cells and the expression of anti-apoptotic mediators. Remarkably, we confirm in a second independent cohort of patients our previous findings showing an important increase of an IL10-producing subpopulation in CLL-B cells

(A. Mekinian, submitted; [\(102\)](#)). In the same time, CLL presented with a rather low percentage of cells expressing IL6 as compared to healthy controls. When compared in a single patient, the relative proportion of each subset of cells was inversely linked. This is also in agreement with our initial study where the levels of IL6 and other pro-inflammatory cytokines secreted in culture supernatants of CLL-B cells were very low as compared to healthy donor cells, while IL10 levels were increased. These results support the analysis of serum levels in CLL patients that allowed clustering of differentially expressed cytokines. The unsupervised analysis showed that IL6 and IL10 belonged to two separate clusters of cytokines. Furthermore, the opposite representation of the clusters correlated with the patients overall survival and time to first treatment. Patients with the highest levels of “IL10 cluster” of serum cytokines experienced the worst outcome. Reversely, patients with indolent disease had more pro-inflammatory cytokines ([\(134\)](#)). Our results underline the presence of a regulatory sub-population in CLL, expressing IL10 rather than IL6, as described in several immunosuppressive pathological contexts ([\(68, 102\)](#)). Moreover, IL10 secreting regulatory B cells are important facilitators of progression for the malignancy ([\(101, 276, 277\)](#)). Indeed, immunosuppression and immune dysfunction have been demonstrated in CLL patients and the actual therapies tend to target such regulatory functions of the B cells in order to restore immune recognition of the leukemic cells ([\(195, 201, 237, 278\)](#)).

IL10 production in CLL-B cells was complemented by an increased expression of several receptors that were shown to promote IL10 induction. Comparison between IL10⁻ and IL10⁺ cells showed in the latter more membrane IgM, CD40 and CD5. All these B- and CLL-cells specific markers are important IL10 inducers upon triggering ([\(150, 196, 227, 243, 279, 280\)](#)). We also found a differential expression of both IL10R and IL6R in favor of IL10⁺ versus IL10⁻ cells. This disparity was also found and even reinforced between CLL and healthy control cells. These results suggested that CLL cells might develop a better answer to IL10 and IL6 stimulation by up-regulating their cognate receptors that still share some downstream effectors. This hypothesis was confirmed since incubation with exogenous IL10 or IL6 triggered an increased phosphorylation of STAT3. Moreover, a better survival response was observed for IL10, which further suggested an important role for this cytokine on the expansion of the tumor clone.

The differential effect of the two cytokines was nevertheless more profound when activation of STAT3, was analyzed in more details. While some S727 phosphorylation of the transcription factor was observed in all samples studied, Y705 phosphorylation was only modulated upon cytokinic stimulation. Stimulation with exogenous IL10 or IL6 strengthened the discrepancy between the two signals. In spite of some transient effect of the cytokines on pS727STAT3, although more visible for

IL10 than IL6 triggering, a major difference of pY705STAT3 was seen between IL10 and IL6. The distinction was both in terms of duration and magnitude of the signal. Moreover, pre-incubation of the cells with a blocking Ab directed against IL10R proved the importance of the Y705 residue in this strong activation mediated by the cytokines. While the blocking Ab did not affect significantly S727 phosphorylation, it almost completely prevented Y705 phosphorylation.

These experiments proved the dominant effect of IL10 toward IL6 in the activation of STAT3 in our pathological model. Duration and intensity were in agreement with studies showing a differential activation pattern of STAT3 for both cytokines (188). It gives also credit for an opposite role of the cytokines in cell survival and tumor growth as seen in cellular models in which IL10 might exert its regulatory function (278). Meanwhile these data indicate that S727 phosphorylation is not the main target of cytokine-mediated signals; a previous report showing increase of pS727STAT3 upon CpG incubation of indolent CLL-B cells (243). Another study indicated that BCR-mediated signal, as IL10 or IL6, allows Y705 phosphorylation in CLL-B cells, but with a delayed kinetic beginning at 4-5 h stimulation while cytokine-mediated signal is already maximal after 15 min (196). These results suggested the necessity of production of additional intermediates to potentiate the BCR-mediated signal in terms of STAT3 activation and the subsequent cell survival. Indeed, several transcriptional partners of STAT3, among which NFκB, were described as responsible for both cytokine and anti-apoptotic proteins expression in CLL cells (269). Our results are in agreement with this sequential kinetic of activation but the constitutive and inducible activation of STAT3 seen in CLL-B cells and their impact on transcriptional regulation still remain to be further investigated.

The analysis of STAT3 gene targets upon IL10 activation showed the impact of the cytokine on the expression of the Bcl2 family anti-apoptotic proteins, which play an important role in CLL-B cells survival. Our data also indicate a role for CpG/pS727STAT3 pathway in their expression. Interestingly, IL10, but not IL6, stimulation potentiated IL10 expression by the cells as well. This important finding argues for the existence of an autocrine loop in IL10⁺ CLL-B subset that further potentiate IL10 production by the cells and therefore its regulatory impact toward the tumor microenvironment. Interrupting this autocrine loop by blocking the IL10R resulted in a drop of metabolic activity not only in the presence of exogenous IL10 but also in conditions where only CLL-derived IL10 was present. This result shows that the production of IL10 by CLL-B cells is oriented both toward the regulation of the surrounding immune cells and to self-activating mechanisms that potentiate tumor cell survival over normal counterparts by synthesis of anti-apoptotic proteins and by further increasing its own expression. These data are in agreement with a

recent study showing a biased T cell repertoire where increased Treg/Th17 ratios were correlated with disease progression (277).

Altogether, these results argue for a synergy between BCR- and IL10R-mediated survival signals in the maintenance of the tumor cells. IL10R targeting has already shown improved therapy for DLBCL (175). Therefore, since targeting BCR pathways is actually a promising therapy, interrupting self-activation mechanisms might further impact long term relapse.

Patients and Methods

B cells isolation and culture

CLL blood samples were obtained from untreated patients, after informed consent and validation by the local research ethics committee of the Avicenne Hospital (Bobigny, France), in accordance with the Declaration of Helsinki (Supplementary Table 1). Healthy controls (HC) peripheral blood was obtained from the « Etablissement Français du Sang » (Saint-Antoine Hospital, Paris, France). CLL and HC B cells were purified by negative selection using the magnetic isolation kit II from Miltenyi Biotec (Paris, France). B cells were cultured freshly or after viable thawing in RPMI 1640 supplemented with 10 % FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine (PAA, Les Mureaux, France).

CLL B cells (10^7 cells/well/12-wells plate) were incubated with either purified recombinant human premium grade Interleukin-6 (IL-6), research grade Interleukin-10 (IL-10) at the concentration indicated in legend figures or in the presence of CpG (ODN 2006, 10 µg/ml), purchased from Miltenyi Biotech. IL10 receptor neutralization was performed using a blocking IL10 receptor antibody (Rat anti-CD210, clone 3F9, Biolegend) or a control isotype (Rat IgG2a,κ, 20 µg/ml) for 1 h prior to IL10 stimulation for 24 h.

Flow cytometry analyses

HC or CLL purified B cells (1×10^6 /ml) were treated with Phorbol Myristate Acetate (PMA, 50 ng/ml), 1 µg/ml Ionomycin and Brefeldin A (BFA, 1 µg/ml) (Sigma-Aldrich) for 4 h at 37°C. Cells were then stained with a viability marker using BD510 Live/Dead staining (BD Biosciences) and with the following Abs: anti-CD3 (REA, PerCP-Vio700), anti-CD5 (clone UCHT2, APC-Vio770), anti-CD19 (REA, PE-Vio770) from Miltenyi Biotech, anti-CD40 (clone 5C3, FITC, BD Biosciences) and anti-IgM (F(ab')₂, PE) from DAKO. Interleukin 10 and 6 receptors were respectively stained with anti-human CD210 (clone 3F9, PE, BD Biosciences) and a biotinylated anti-IL-6Rα (clone UV4) followed by Streptavidin-coupled BV421 Ab from Biolegend.

Intracellular analysis was performed after membrane staining of the cells that were fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences). Cells were further stained with anti-human IL10 (JES3-19F1, APC) or IL6 (MQ2-6A3, PE) from BD Biosciences. Flow cytometry was performed using a FACS Canto II (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). The gating strategy was based on isotype controls staining.

Metabolic Activity

Two million CLL B cells were cultured for 24 h in 24-well plates stimulated or not with IL10 (40 ng/ml), IL6 (40 ng/ml), CpG (ODN 2006, 10 µg/ml) or treated first with anti-IL10R Ab as described above. Metabolic activity was determined using CellTiter 96AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Metabolic fold increase ([percentage of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], inner salt [MTS]) was determined as follows: [(absorbance stimulated t = 24 hours) – (absorbance unstimulated t = 24 hours)]/(absorbance unstimulated t = 24 hours) × 100 ([144](#)).

Western Blot

After stimulation or treatment as indicated in figure legends, B cells were lysed in 1% Nonidet P-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 10 % Glycerol), supplemented with proteases inhibitors (Sigma-Aldrich). Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to nitrocellulose membrane.

After transfer, equal loading was checked by Ponceau staining. Membranes were blocked with 5 % skim milk in Tris-buffer saline and incubated with the following antibodies: mouse anti-phospho-Tyr705 STAT3 (clone 3E2), rabbit anti-phospho-Ser727 STAT3, mouse total STAT3 (clone 79D7) from Cell Signaling Technology. Anti-β-Tubulin (Sigma-Aldrich) or anti-Actin (Santa Cruz) were used as controls. Detection was achieved using chemi-luminescence (ECL, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) and visualized using the ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Densitometric analysis of immunoblots was performed using the ImageLab software (Bio-Rad).

RNA isolation, reverse transcription and Q-PCR

Total RNAs were isolated from cells using Trizol reagent (Invitrogen, Saint Aubin, France), purified (QIAGEN, Courtaboeuf, France) and quantified by spectrophotometry. Total RNAs (500 µg) were

retro-transcribed using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) following the manufacturer's protocol (5 min at 25°C, 30 min at 42°C, 5 min at 85°C). Quantitative real-time PCR (Q-PCR) was performed using a StepOnePlus Real Time PCR System™ (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). Complementary DNAs, 3 µM gene-specific sense and anti-sense primers (Supplementary Table 2), and PCR Master Mix containing 1x Power SYBR Green PCR Master Mix were mixed in a 10 µL volume. The reactions were performed in triplicates as follow: 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. Actin was used as internal gene control.

Relative quantification of each gene expression was determined using the $\Delta\Delta C_t$ method and values are expressed as relative fold change $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Statistical analysis

All analyses were carried out using Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) with statistical significance defined as: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$, *ns*, not significant $P > 0.05$.

Figure legends

Figure 1: Inversely associated production of IL10 and IL6 in CLL-B cells

Expression of IL10 (A) or IL6 (B) in purified blood CD19⁺ B cells from Healthy Donors (HC) or CLL patients (CLL) by flow cytometry. Purified B cells were stimulated with PMA (50 ng/ml), Ionomycin (1 µg/ml) and Brefeldin A (1 µg/ml) for 4 h before staining.

Graphic representation of the percentage of IL10⁻ (n=17) or IL6⁻ (n=14) positive cells are shown on the left. Mean of fluorescence intensity (MFI) of IL10⁺ (A) or IL6⁺ (B) relative to respective control isotypes are presented (Right).

(C) Graphic representation of the percentage of IL10⁺ and IL6⁺ cells in tumor CD5⁺CD19⁺ cells. Dotted lines link individual patient samples (n= 6). Means SEM are depicted. (A-B) Mann-Whitney U test. (C) Wilcoxon signed-rank test. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 2: Stimulation of IL10 receptors increased the metabolic activity of CLL-B cells

(A-B) Purified CD5⁺CD19⁺ tumor cells were stained for the indicated membrane markers and for IL10. MFI of IL10R, IL6R (A), CD5, IgM, CD40 were compared between IL10⁺ and IL10⁻ cells (n=15). Ratio of membrane markers MFI between positive and negative cells are graphed. (C) CD19⁺ cells from CLL patients or HC were stained for IL6R and IL10R (n=12). Ratio of receptors

MFI between CLL and HC cells are graphed. (D) Metabolic activity was performed on patient purified B cells by MTS assay upon IL-6 (40 ng/mL), IL-10 (40 ng/mL) or CpG (10 µg/mL) stimulation for 24 h. Means SEM are depicted. (A-B and D) Wilcoxon signed-rank test; (C) Mann-Whitney U test. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$, *ns*, not significant $P > 0.05$.

Figure 3: IL10 or IL6 stimulation of CLL-B cells activates STAT3

Phosphorylation of STAT3 at two activating residues (S727 and Y705) in patient purified B cells was analyzed by western blotting. (A) Basal phosphorylation in 5 CD5⁺CD19⁺ B cells from CLL patients (UPN) and in two cell lines (Hg3 and U2OS). 20 µg protein extracts were analyzed by western blotting using the indicated Abs; β-tubulin is used as loading control. (B-C) Purified CLL B cells were stimulated or not (-) with IL10 or IL6 for the indicated period of time and further analyzed by western Blotting as described in A. One representative experiment (UPN 17) is shown. pS727STAT3 (B) or pY705STAT3 (C) levels relative to total STAT3 and unstimulated conditions are graphed (n=6). 2 way-Anova test. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P < 0.001$; *ns*, not significant $P > 0.05$.

Figure 4: IL10 stimulation induces its own expression and anti-apoptotic genes expression

(A-B) mRNA levels of IL10, IL6 (A) or Bcl-xL, Bcl2 and Cyclin D1 were analyzed by Q-PCR in purified CLL B cells in culture for 24 h in absence (-) or presence of IL10, IL6 or CpG. Fold induction relative to unstimulated conditions are graphed (n=9). Wilcoxon signed-rank test. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *ns*, not significant $P > 0.05$.

Figure 5: Anti-IL10R treatment antagonizes activation and survival of CLL-B cells

Phosphorylation of STAT3 at S727 (A) and Y705 (B) was analyzed in patient purified B cells by western blotting. Cells were left untreated (-) or pretreated for 1 h with either a blocking anti-IL-10 receptor Ab (anti-IL10R, 20 µg/mL) or control IgG (20 µg/mL). Cells were then stimulated or not (-) with IL-10 (40 ng/mL) and cultured for 24 h. One representative experiment is shown (left). pS727STAT3 (A) or pY705STAT3 (B) levels relative to total STAT3 and unstimulated conditions are graphed pS727STAT3 (n=5) and pY705STAT3 (n=6). (C) Metabolic activity was performed on the same patients purified B cells by MTS assay with similar conditions after 24 h and graphed relative to untreated and unstimulated conditions. Wilcoxon signed-rank test. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *ns*, not significant $P > 0.05$.

Supplementary Figure 1: Intracellular IL10 or IL6 staining in purified B cells

(A) Gating strategy purified B cells from CLL patients or HC were stained with a viability marker altogether with anti-CD19 and anti-CD3 Abs to verify purity. After permeabilization cells were labeled with anti-IL10 Ab or control isotype. (B) Purified B cells from CLL patients or HC stained for CD19 were permeabilized before staining for IL10, IL6 or their respective control isotypes. Representative dot plots of the IL10⁺ or IL6⁺ subpopulations are presented with the percentage of cells observed.

Supplementary Figure 2: IL10 and IL6 dose-dependant activation of STAT3

Phosphorylation of STAT3 at S727 (A) and Y705 (B) residues in patient purified B cells was analyzed by western blotting. Purified CLL B cells were stimulated or not (-) with IL10 or IL6 at the indicated doses for 15 min. One representative experiment (UPN 17) is shown. 20 µg protein extracts were analyzed by western blotting using the indicated Abs; β-tubulin was used as loading control. pS727STAT3 (A) or pY705STAT3 (B) levels relative to total STAT3 and unstimulated conditions are graphed (n=3). 2 way-Anova test. * P≤0.05, *** P< 0.001; *ns*, not significant P>0.05.

Author Contributions: MM, LA, AG, ND, SLC, DL and LG performed the experiments. DL, CLR, NVB conceived the project, analyzed the data, generated figures and wrote the manuscript. MM and CLR performed the statistical analysis and contributed figures. LM provided expertise on cytokine profiles. FAC and VL assumed follow-up of the patients, provided patients samples and contributed patients clinical and biological parameters.

Acknowledgments

This work benefits from the financial support of the Labex INFLAMEX, contract ANR11 IDEX00502 and from the Fondation Laurette Fugain. MB was the recipient of a MRT fellowship during her PhD. LA and ND were under contract of the Labex INFLAMEX. We thank the FLAP13 cytometry and cell sorting facilities for assistance.

References

1. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26 Suppl 5:v78-84. doi: 10.1093/annonc/mdv303. PubMed PMID: 26314781.
2. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Koltz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 2005;115(3):755-64. doi: 10.1172/JCI23409. PubMed PMID: 15711642; PubMed Central PMCID: PMCPMC548318.
3. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145-62. doi: 10.1038/nrc.2016.8. PubMed PMID: 26911189.
4. Kay NE, Shanafelt TD, Strega AK, Lee YK, Bone ND, Raza A. Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch". *Leuk Res*. 2007;31(7):899-906. Epub 2007/01/22. doi: 10.1016/j.leukres.2006.11.024. PubMed PMID: 17241660; PubMed Central PMCID: PMCPMC2505044.
5. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:71-81. Epub 2013/09/07. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.011. PubMed PMID: 24018164.
6. Taylor JG, Gribben JG. Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects. *Semin Cancer Biol*. 2015;34:36-45. Epub 2015/07/29. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.07.004. PubMed PMID: 26232774; PubMed Central PMCID: PMCPMC4592463.
7. Hanna BS, McClanahan F, Yazdanparast H, Zaborsky N, Kalter V, Röbner PM, et al. Depletion of CLL-associated patrolling monocytes and macrophages controls disease development and repairs immune dysfunction in vivo. *Leukemia*. 2016;30(3):570-9. Epub 2015/11/02. doi: 10.1038/leu.2015.305. PubMed PMID: 26522085.
8. Yan XJ, Dozmorov I, Li W, Yancopoulos S, Sison C, Centola M, et al. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(19):5201-10. Epub 2011/09/12. doi: 10.1182/blood-2011-03-342436. PubMed PMID: 21911837; PubMed Central PMCID: PMCPMC3217404.
9. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, Vallario A, Camporeale A, Granziero L, et al. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:135-45. PubMed PMID: 16323430.
10. Schröttner P, Leick M, Burger M. The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact. *Ann Hematol*. 2010;89(5):437-46. Epub 2009/12/18. doi: 10.1007/s00277-009-0876-6. PubMed PMID: 20020127.
11. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, Marolleau JP. A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. *PLoS One*. 2013;8(3):e60370. Epub 2013/03/26. doi: 10.1371/journal.pone.0060370. PubMed PMID: 23555960; PubMed Central PMCID: PMCPMC3608602.
12. Bomstein Y, Yuklea M, Radnay J, Shapiro H, Afanasyev F, Yarkoni S, et al. The antiapoptotic effects of blood constituents in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2003;70(5):290-5. PubMed PMID: 12694164.
13. Wickremasinghe RG, Ganeshaguru K, Jones DT, Lindsay C, Spanswick VJ, Hartley JA, et al. Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2001;114(3):608-15. PubMed PMID: 11552986.
14. Drennan S, D'Avola A, Gao Y, Weigel C, Chrysostomou E, Steele AJ, et al. 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*. 2017. Epub 2017/01/03. doi: 10.1038/leu.2016.356. PubMed PMID: 27890932.
15. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, et al. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol*. 2011;186(8):4835-44. Epub 2011/03/11. doi: 10.4049/jimmunol.1003050. PubMed PMID: 21398617.
 16. Liu FT, Jia L, Wang P, Wang H, Farren TW, Agrawal SG. STAT3 and NF- κ B cooperatively control in vitro spontaneous apoptosis and poor chemo-responsiveness in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(22):32031-45. doi: 10.18632/oncotarget.8672. PubMed PMID: 27074565; PubMed Central PMCID: PMCPMC5077994.
 17. Rozovski U, Wu JY, Harris DM, Liu Z, Li P, Hazan-Halevy I, et al. Stimulation of the B-cell receptor activates the JAK2/STAT3 signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2014;123(24):3797-802. Epub 2014/04/28. doi: 10.1182/blood-2013-10-534073. PubMed PMID: 24778152; PubMed Central PMCID: PMCPMC4055926.
 18. Saulep-Easton D, Vincent FB, Quah PS, Wei A, Ting SB, Croce CM, et al. The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. *Leukemia*. 2016;30(1):163-72. Epub 2015/07/03. doi: 10.1038/leu.2015.174. PubMed PMID: 26139429; PubMed Central PMCID: PMCPMC4606984.
 19. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(2):356-65. doi: 10.1182/blood-2011-12-397158. PubMed PMID: WOS:000307412400020.
 20. DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia*. 2013;27(1):170-82. Epub 2012/07/13. doi: 10.1038/leu.2012.165. PubMed PMID: 22713648; PubMed Central PMCID: PMCPMC3742013.
 21. Horikawa M, Minard-Colin V, Matsushita T, Tedder TF. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4268-80. Epub 2011/10/24. doi: 10.1172/JCI59266. PubMed PMID: 22019587; PubMed Central PMCID: PMCPMC3204847.
 22. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol*. 2015;27(10):479-86. Epub 2015/06/12. doi: 10.1093/intimm/dxv038. PubMed PMID: 26071023; PubMed Central PMCID: PMCPMC4587489.
 23. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117(2):530-41. Epub 2010/10/20. doi: 10.1182/blood-2010-07-294249. PubMed PMID: 20962324; PubMed Central PMCID: PMCPMC3031478.
 24. Valle Oseguera CA, Spencer JV. cmvIL-10 stimulates the invasive potential of MDA-MB-231 breast cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(2):e88708. Epub 2014/02/10. doi: 10.1371/journal.pone.0088708. PubMed PMID: 24520416; PubMed Central PMCID: PMCPMC3919807.
 25. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015;367(2):103-7. Epub 2015/07/15. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.009. PubMed PMID: 26188281.
 26. Béguelin W, Sawh S, Chambwe N, Chan FC, Jiang Y, Choo JW, et al. IL10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs. *Leukemia*. 2015;29(8):1684-94. Epub 2015/03/03. doi: 10.1038/leu.2015.57. PubMed PMID: 25733167.
 27. Baran-Marszak F, Magdoud H, Desterke C, Alvarado A, Roger C, Harel S, et al. Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;116(26):5961-71. doi: 10.1182/blood-2009-12-256768. PubMed PMID: WOS:000285583400027.

28. Liu FT, Giustiniani J, Farren T, Jia L, Bensussan A, Gribben JG, et al. CD160 signaling mediates PI3K-dependent survival and growth signals in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(15):3079-88. Epub 2010/02/17. doi: 10.1182/blood-2009-08-239483. PubMed PMID: 20164468; PubMed Central PMCID: PMCPMC5292590.
29. Lam LT, Wright G, Davis RE, Lenz G, Farinha P, Dang L, et al. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2008;111(7):3701-13. Epub 2007/12/26. doi: 10.1182/blood-2007-09-111948. PubMed PMID: 18160665; PubMed Central PMCID: PMCPMC2275028.
30. Baran-Marszak F, Boukhiar M, Harel S, Laguillier C, Roger C, Gressin R, et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica-the Hematology Journal*. 2010;95(11):1865-72. doi: 10.3324/haematol.2009.019745. PubMed PMID: WOS:000284438200012.
31. Hazan-Halevy I, Harris D, Liu Z, Liu J, Li P, Chen X, et al. STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood*. 2010;115(14):2852-63. Epub 2010/02/12. doi: 10.1182/blood-2009-10-230060. PubMed PMID: 20154216; PubMed Central PMCID: PMCPMC2918366.
32. Coppo P, Gouilleux-Gruart V, Huang Y, Bouhhal H, Bouamar H, Bouchet S, et al. STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2009;23(9):1667-78. Epub 2009/05/07. doi: 10.1038/leu.2009.91. PubMed PMID: 19421230; PubMed Central PMCID: PMCPMC2796333.
33. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest*. 2017;127(3):772-9. Epub 2017/03/01. doi: 10.1172/JCI85113. PubMed PMID: 28248202; PubMed Central PMCID: PMCPMC5330739.
34. Balkwill F, Montfort A, Capasso M. B regulatory cells in cancer. *Trends Immunol*. 2013;34(4):169-73. Epub 2012/12/01. doi: 10.1016/j.it.2012.10.007. PubMed PMID: 23206438.
35. Pang N, Zhang R, Li J, Zhang Z, Yuan H, Chen G, et al. Increased IL-10/IL-17 ratio is aggravated along with the prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int Immunopharmacol*. 2016;40:57-64. Epub 2016/08/29. doi: 10.1016/j.intimp.2016.07.008. PubMed PMID: 27584054.
36. Shaim H, Estrov Z, Harris D, Hernandez Sanabria M, Liu Z, Ruvolo P, et al. The CXCR4-STAT3-IL-10 Pathway Controls the Immunoregulatory Function of Chronic Lymphocytic Leukemia and Is Modulated by Lenalidomide. *Front Immunol*. 2017;8:1773. Epub 2018/01/15. doi: 10.3389/fimmu.2017.01773. PubMed PMID: 29379494; PubMed Central PMCID: PMCPMC5775272.
37. Kondo K, Shaim H, Thompson PA, Burger JA, Keating M, Estrov Z, et al. Ibrutinib modulates the immunosuppressive CLL microenvironment through STAT3-mediated suppression of regulatory B-cell function and inhibition of the PD-1/PD-L1 pathway. *Leukemia*. 2017. Epub 2017/10/03. doi: 10.1038/leu.2017.304. PubMed PMID: 28972595.
38. Lee BR, Kwon BE, Hong EH, Shim A, Song JH, Kim HM, et al. Interleukin-10 attenuates tumour growth by inhibiting interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 signalling in myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Lett*. 2016;381(1):156-64. Epub 2016/07/16. doi: 10.1016/j.canlet.2016.07.012. PubMed PMID: 27431309.
39. García-Muñoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann Hematol*. 2012;91(7):981-96. Epub 2012/04/12. doi: 10.1007/s00277-012-1460-z. PubMed PMID: 22526361; PubMed Central PMCID: PMCPMC3368117.
40. Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Jain P, Veletic I, et al. Constitutive Phosphorylation of STAT3 by the CK2-BLNK-CD5 Complex. *Mol Cancer Res*. 2017;15(5):610-8. Epub 2017/01/27.

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0291. PubMed PMID: 28130399; PubMed Central PMCID: PMC5415425.

41. Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Jain P, Veletic I, et al. Activation of the B-cell receptor successively activates NF- κ B and STAT3 in chronic lymphocytic leukemia cells. *Int J Cancer*. 2017;141(10):2076-81. Epub 2017/08/04. doi: 10.1002/ijc.30892. PubMed PMID: 28722170; PubMed Central PMCID: PMC5749978.

42. Braun DA, Fribourg M, Sealfon SC. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. *J Biol Chem*. 2013;288(5):2986-93. Epub 2012/11/19. doi: 10.1074/jbc.M112.386573. PubMed PMID: 23166328; PubMed Central PMCID: PMC3561523.

43. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res*. 2006;66(14):7158-66. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0085. PubMed PMID: 16849562.

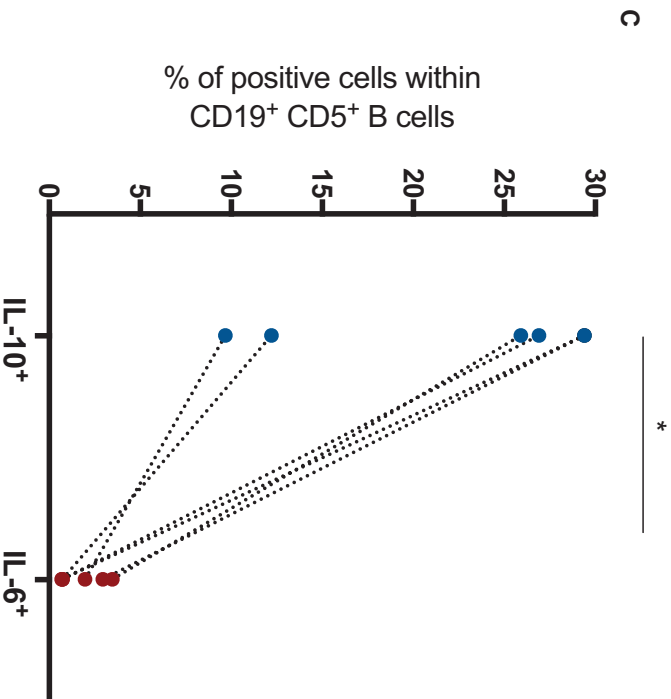
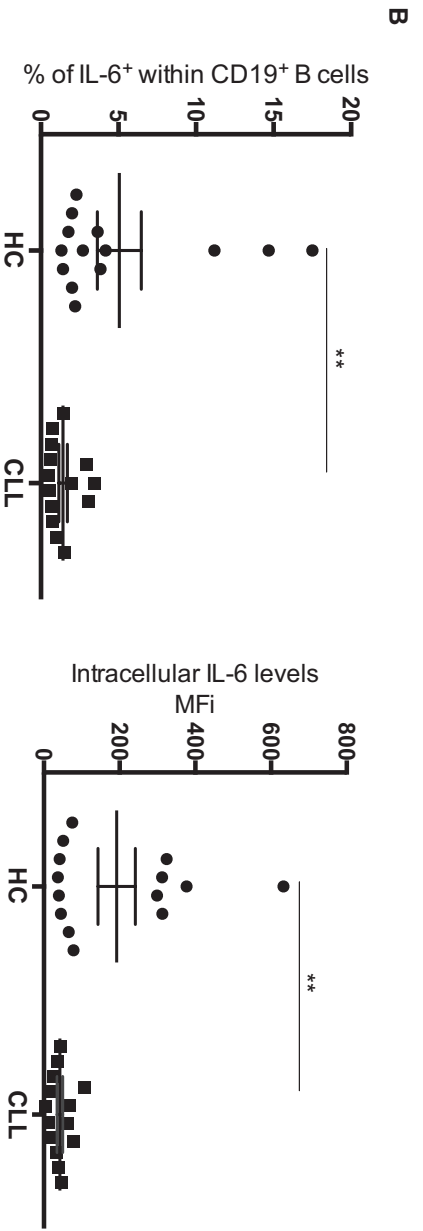
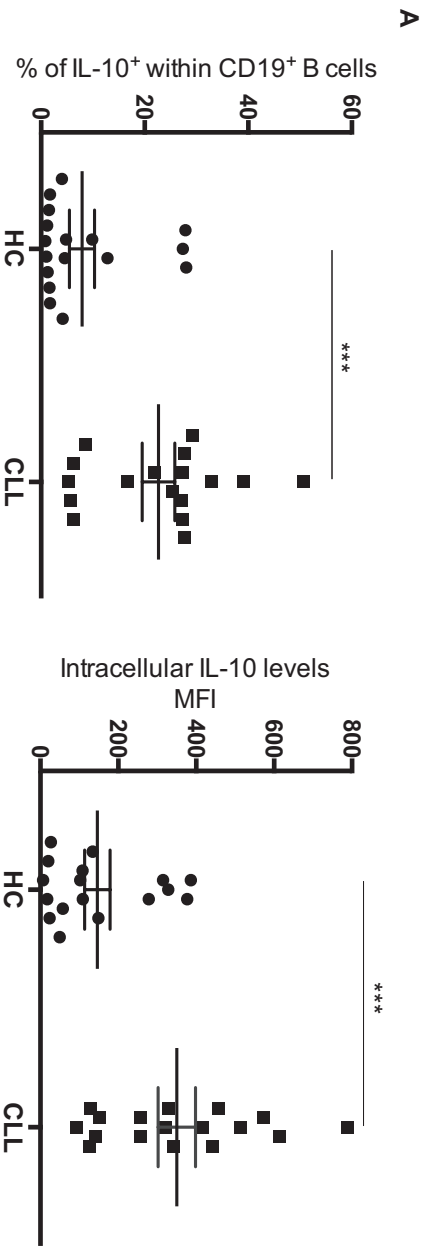


Figure 1

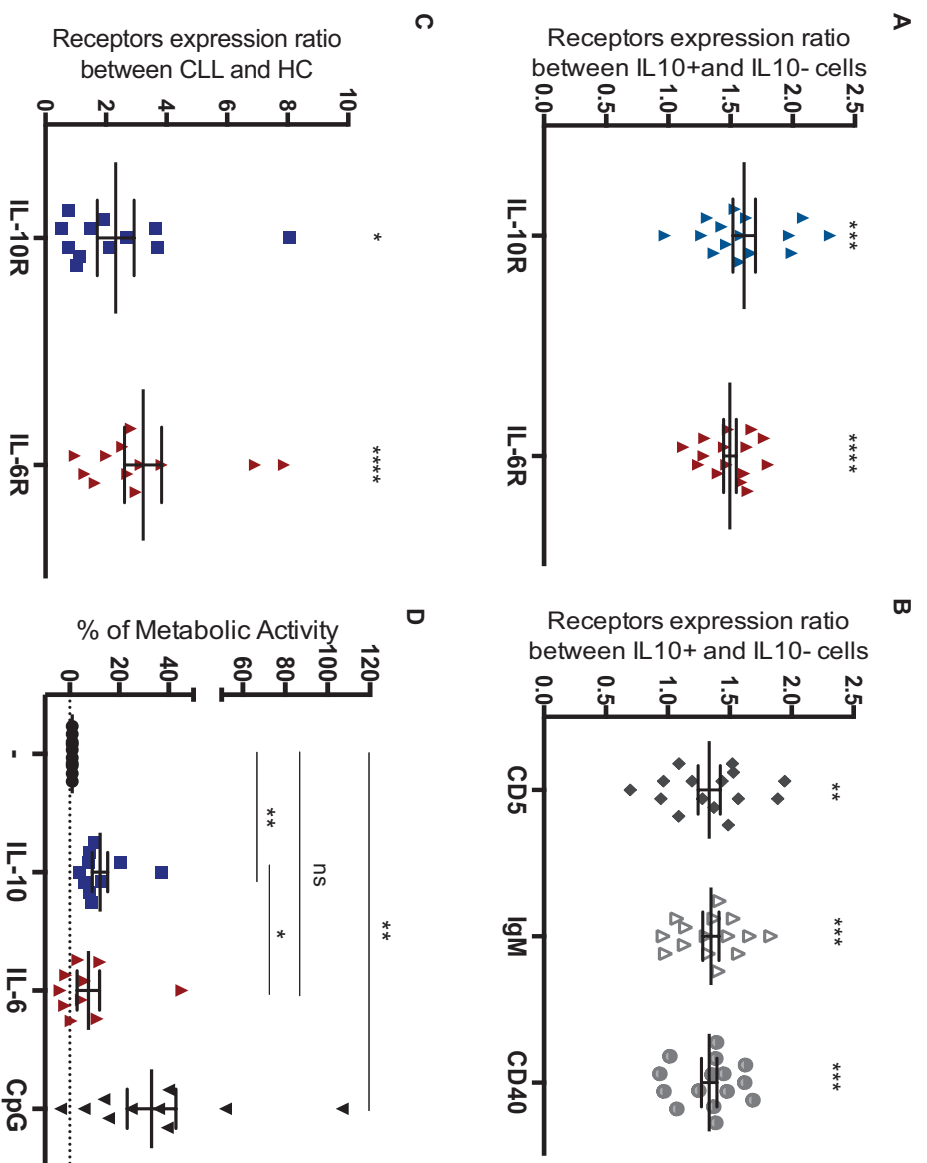


Figure 2

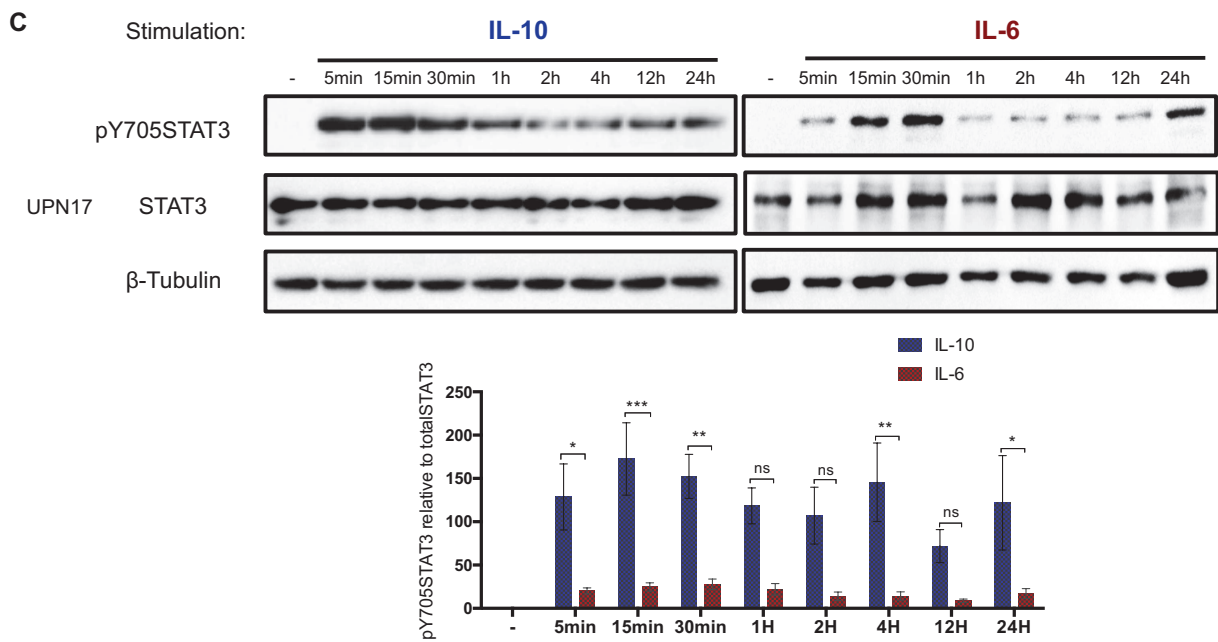
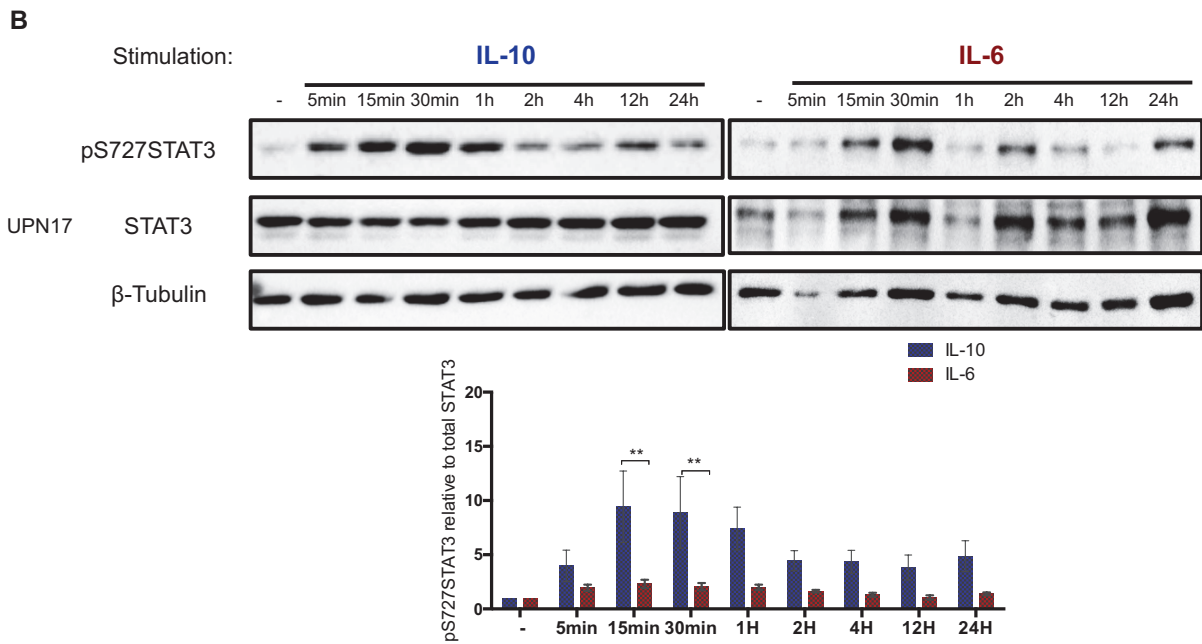
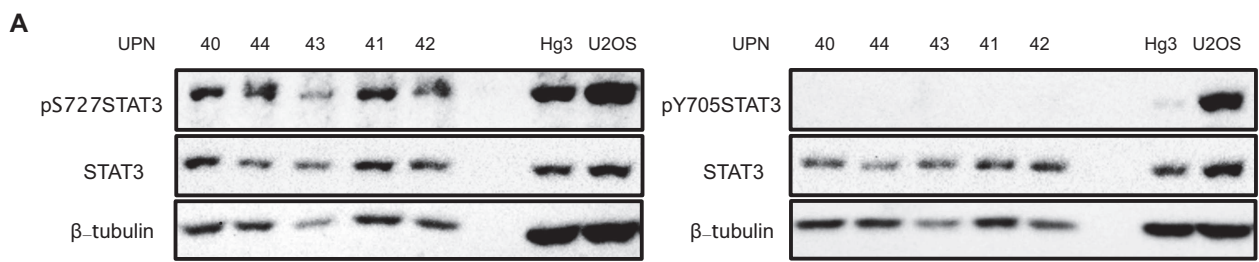
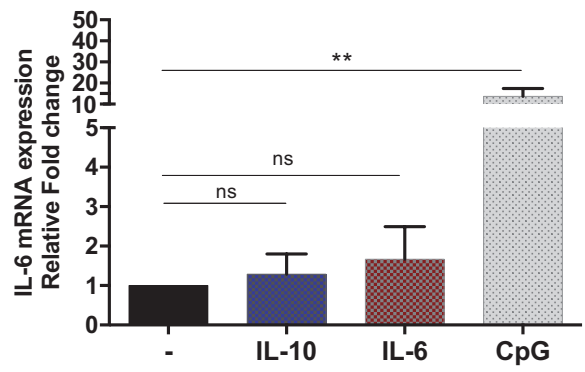
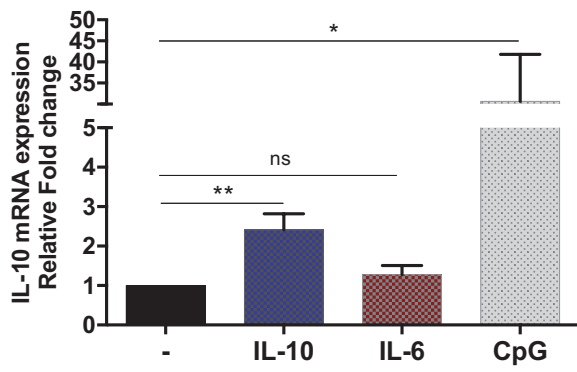


Figure 3

A



B

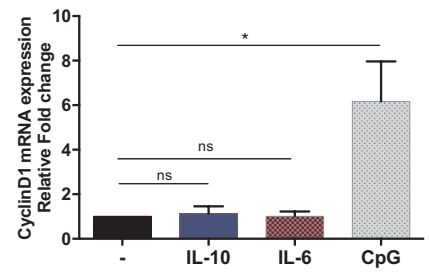
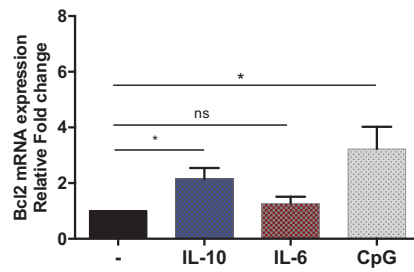
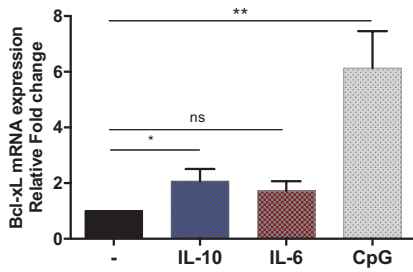


Figure 4

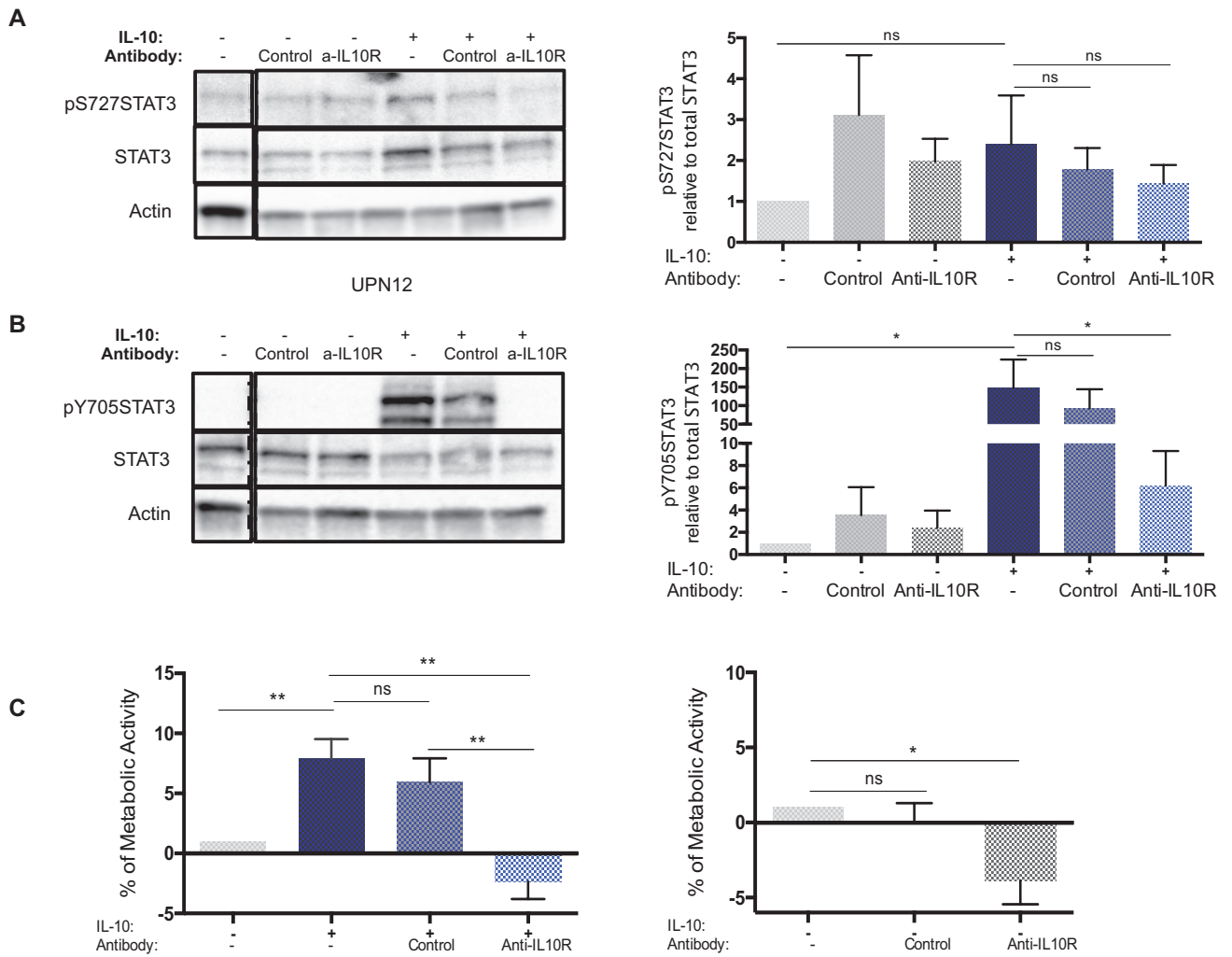
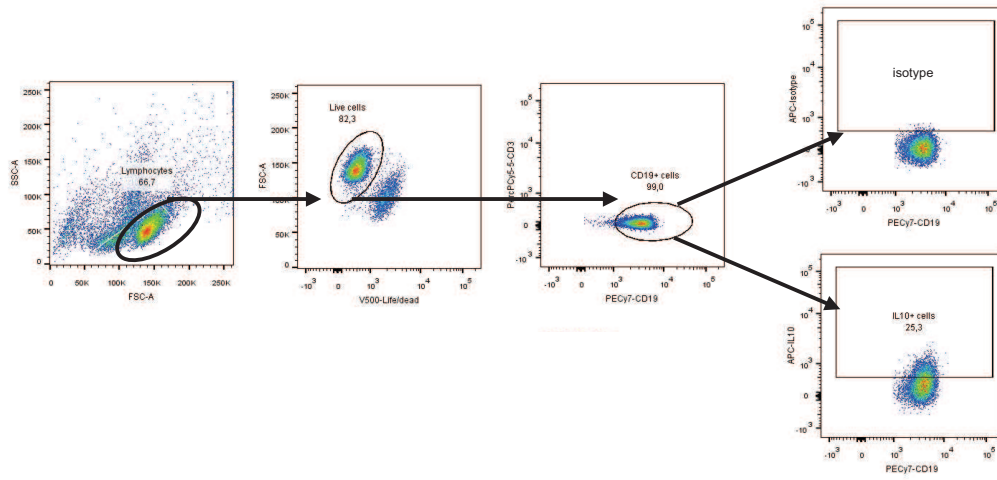
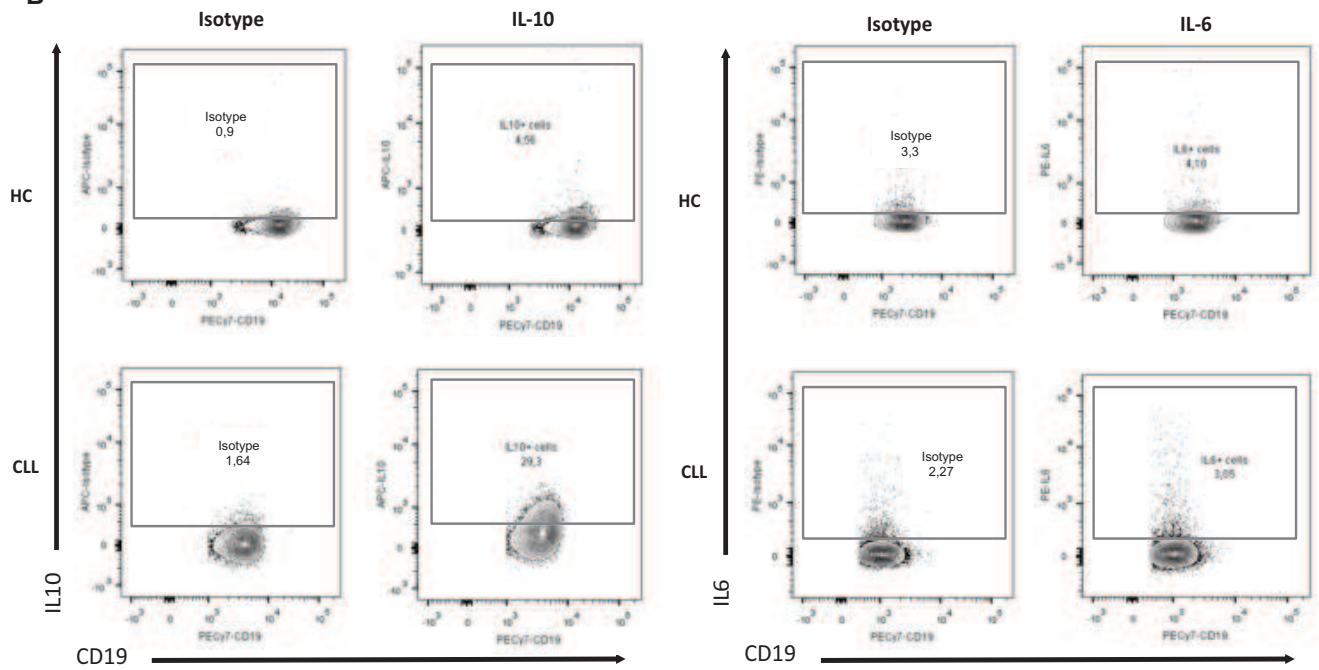


Figure 5

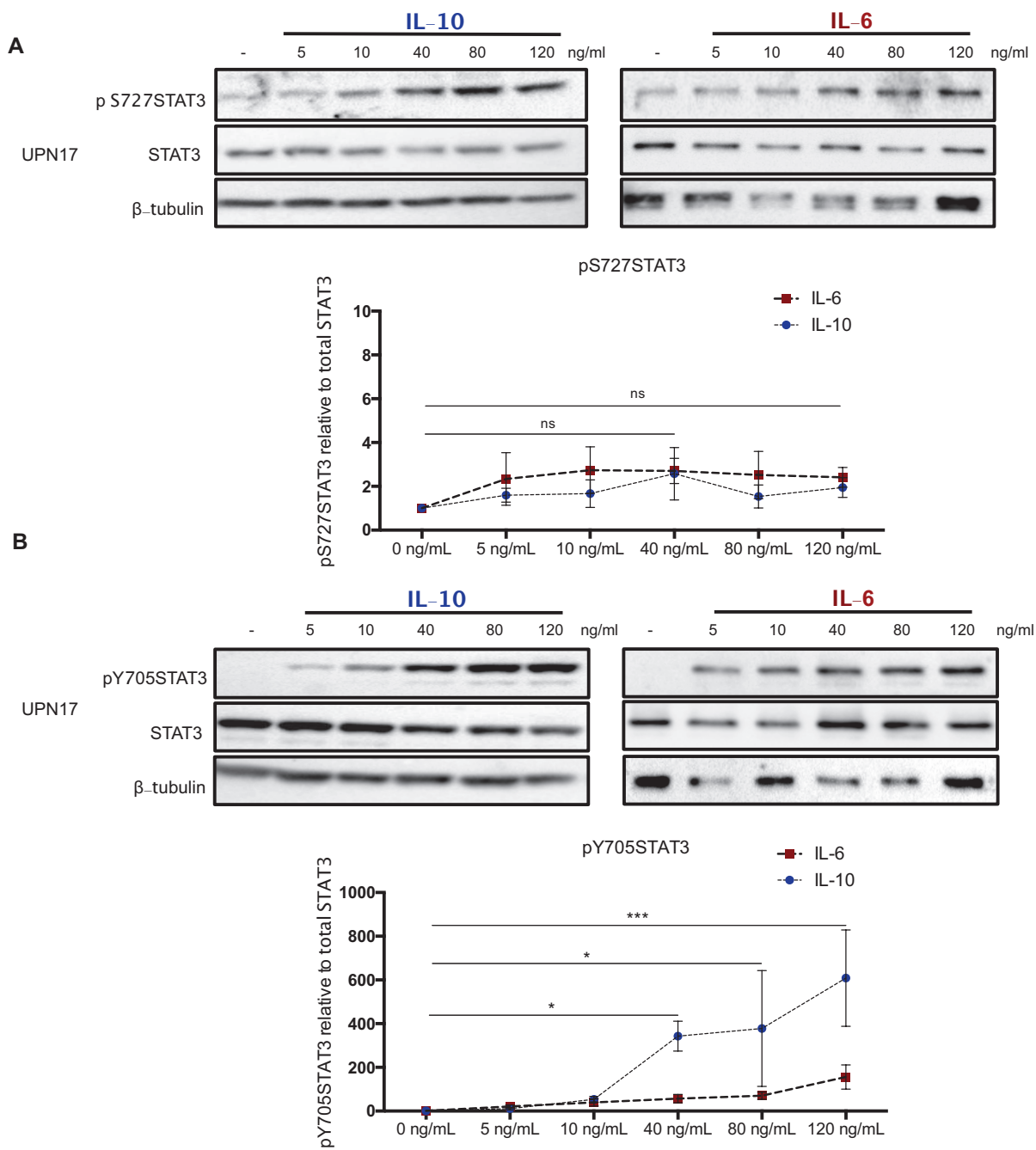
A



B



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

Numbers of CLL patients	n=45
Age (years)	72.1 ± 9.038
Sexe (Female/Male)	25 / 20
Binet Stage at experiment (number and %)	
A	13/14 (92.85%)
B	1/14 (7.14%)
IGHV unmutated	11/33 (24.4%)
ZAP70 positivity	7/20 (35%)
CD38 positivity	9/23 (39.13%)
MTS (R vs NR number and %)	17 vs 28 (37.77% vs 62.22%)

Supplementary Table 1. Summary of Patients' biological and clinical parameters.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
IL-10	5'-CCAAGCCTTGTCTGAGATGA-3'	5'-TGAGGGTCTTCAGGTTCTCC-3'
IL-6	5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3'	5'-GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3'
BclxL	5'-TCCTTGTCTACGCTTTCACAG-3'	5'-GGTCGCATTGTGGCCTTT -3'
Bcl2	5'-GGGTATGAAGGACCTGTA-3'	5'-CATGCTGATGTCTCTGGAATC-3'
CyclinD1	5'-ACCTGGATGCTGGAGGTCT-3'	5'-GCTCTTTTTTCACGGGCTCCA-3'
β -Actin	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

Supplementary Table 2. Primer sequences used for quantitative RT-PCR experime

III. Une signature cytokinique comparée à celle de cellules de SSc

L'étude des productions de cytokines par les lymphocytes B de LLC menée au cours de cette thèse, s'inscrit dans le cadre d'une étude comparative des profils cytokiniques de cellules de différentes pathologies chroniques.

Alors qu'une importante production d'IL-10 est retrouvée dans les cancers comme la LLC, un déséquilibre en faveur de l'IL-6 est retrouvé dans de nombreuses pathologies inflammatoires.

Durant cette thèse, j'ai participé à l'étude de la production de cytokines des lymphocytes B de patients atteints de Sclérodémie systémique (SSc) avec l'équipe du Pr. Luc Mouthon (**Article 3**).

Dans ce modèle, nous avons mis en évidence par cytométrie en flux, une augmentation de la fréquence de cellules B productrices d'IL-6 alors que la proportion de cellules productrices d'IL-10 est similaire à celle retrouvée chez les donneurs sains (HC) (**Figure**).

Ainsi dans cette pathologie les lymphocytes B présentent une production de cytokine en faveur d'une réponse inflammatoire avec une sous-population IL-6⁺ majoritaire. Cette cytokine produite de manière importante par les lymphocytes B participe à l'activation des fibroblastes et joue un rôle clé dans la physiopathologie de la SSc. Dans cette pathologie chronique, cette importante production de cytokines telles que l'IL-6 et le TGFβ1, contribue à la non résolution des processus d'inflammation caractéristiques de la SSc.

À l'inverse, dans la LLC, les cellules présentent une signature cytokinique en faveur de l'immunorégulation avec un effondrement de la fréquence des cellules IL-6⁺ alors que la proportion de cellules productrices d'IL-10 est augmentée (**Article 1**). Dans cette autre pathologie chronique, les facteurs immunosuppresseurs comme l'IL-10 contribuent à l'inhibition des processus immunitaires anti-tumoral.

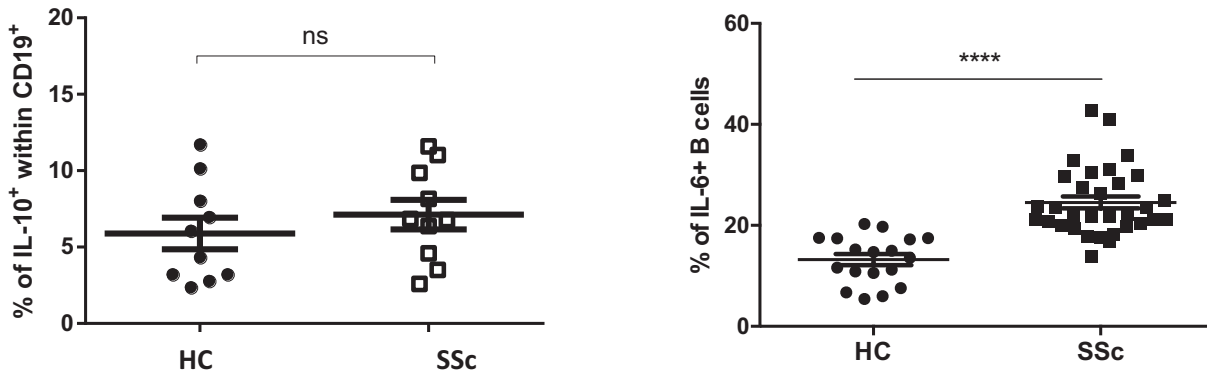


Figure 31 : Signature cytokinique des cellules de SSc

Le pourcentage de cellules IL-10⁺ ou IL-6⁺ a été analysé suite à la détection d'IL-10 intracellulaire dans les cellules B CD19⁺ de 11 HC et 12 SSc ou suite au marquage de l'IL-6 dans les lymphocytes B de 18 HC et 32 SSc.

From Dumoitier N., Chaigne B*, Régent A*, Lofek S., Mhibik M., et al., *Arthritis&Rheumatology*. 2017

Selon le contexte pathologique, les lymphocytes B vont donc présenter une balance cytokinique en faveur de l'immunosuppression ou de l'inflammation qui va jouer un rôle clé dans le développement et le maintien de ces différentes pathologies.

Article 3

Scleroderma Peripheral B Lymphocytes Secrete Interleukin-6 and Transforming Growth Factor β and Activate Fibroblasts.

Dumoitier, N., Chaigne, B., Régent, A., Lofek, S., **Mhibik, M.**, Dorfmueller, P., Terrier, B., London, J., Bérezné, A., Tamas, N., Varin-Blank, N. and Mouthon, *Arthritis & Rheumatology, 2017*

Scleroderma Peripheral B Lymphocytes Secrete Interleukin-6 and Transforming Growth Factor β and Activate Fibroblasts

Nicolas Dumoitier,¹ Benjamin Chaigne,² Alexis Régent,² Sébastien Lofek,³ Maissa Mhibik,⁴ Peter Dorfmueller,⁵ Benjamin Terrier,² Jonathan London,⁶ Alice Bérezné,⁷ Nicolas Tamas,³ Nadine Varin-Blank,⁸ and Luc Mouthon⁹

Objective. To study the role of B lymphocytes in systemic sclerosis (SSc).

Methods. Peripheral B cell subpopulations and the production of interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor β (TGF β) were analyzed using flow cytometry and multiplex assay. The fibroblast proliferation rate upon incubation with supernatants from B cells isolated from SSc patients or healthy controls was assessed using XTT, bromodeoxyuridine, and Ki-67. Collagen production was assessed using a collagen assay.

Results. Ninety untreated patients (12 males) fulfilling the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for SSc (23 with diffuse cutaneous SSc [dcSSc] and 67 with limited cutaneous SSc [lcSSc]) and 30 healthy controls were recruited. Increased proportions of B cells expressing CD69 and CD95

were identified among the patients with SSc. B lymphocytes from dcSSc patients versus lcSSc patients and healthy controls expressed increased proportion of cells positive for CD5 (mean \pm SD 24.12 \pm 7.93% versus 14.09 \pm 6.58% [P = 0.03] and 14.21 \pm 5.34% [P = 0.01]), CD86 (39.89 \pm 22.11% versus 17.72 \pm 13.98% [P = 0.0007] and 11.68 \pm 11.09% [P < 0.001]), IL-6 receptor (IL-6R; 33.64 \pm 23.12% versus 17.91 \pm 13.62% [P < 0.0001] and 12.08 \pm 8.68% [P = 0.0009]), or IL-21R (32.55 \pm 20.19% versus 5.76 \pm 4.40% [P < 0.0001] and 5.93 \pm 3.29% [P < 0.0001]). In addition, the levels of IL-6 (mean \pm SD 314.3 \pm 317.8 pg/ml versus 6.10 \pm 2.58 pg/ml; P = 0.0007) and TGF β (mean \pm SD 1,020 \pm 569 pg/ml versus 163.8 \pm 98.69 pg/ml; P = 0.001) secreted by B lymphocytes from patients with SSc were increased compared to healthy controls. Fibroblast proliferation and collagen production were also significantly increased in the presence of B cell supernatant from SSc patients as compared to healthy controls.

Conclusion. The numbers of activated B cells were increased in SSc patients, and the up-regulation of CD5, CD86, IL-6R, and IL-21R discriminated between

Mr. Dumoitier's work was supported by the Centre of Excellence, LabEx Inflammex, Université Paris-Diderot, Paris, France (ANR-11-IDEX-0005-02).

¹Nicolas Dumoitier, MSc: INSERM U1016, Institut Cochin, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, LabEx Inflammex, Université Sorbonne Paris Cité and Université Paris Diderot, Paris, France; ²Benjamin Chaigne, MD, Alexis Régent, MD, PhD, Benjamin Terrier, MD, PhD: INSERM U1016, Institut Cochin, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité and Service de Médecine Interne, Centre de Référence Maladies Systémiques Autoimmunes Rares, Vascularites Nécosantes et Sclérodémie Systémique, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France; ³Sébastien Lofek, MSc, Nicolas Tamas: INSERM U1016, Institut Cochin, CNRS UMR 8104 and Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ⁴Maissa Mhibik, MSc: Université Paris XIII, UFR Santé Médecine Biologie Humaine and INSERM U978, Bobigny, France; ⁵Peter Dorfmueller, MD, PhD: Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Marie Lannelongue, INSERM UMR-S 999, LabEx LERMIT, Le Plessis-Robinson, France; ⁶Jonathan London, MD: Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité and Service de Médecine Interne, Centre de Référence Maladies Systémiques Autoimmunes Rares, Vascularites Nécosantes et Sclérodémie Systémique, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France; ⁷Alice Bérezné, MD: Service de Médecine Interne, Centre de Référence Maladies Systémiques Autoimmunes Rares, Vascularites Nécosantes et Sclérodémie Systémique, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France; ⁸Nadine Varin-Blank, PhD: LabEx Inflammex, Université Sorbonne

Paris Cité, Paris, and Université Paris XIII, UFR Santé Médecine Biologie Humaine and INSERM U978, Bobigny, France; ⁹Luc Mouthon, MD, PhD: INSERM U1016, Institut Cochin, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, LabEx Inflammex, Université Sorbonne Paris Cité and Service de Médecine Interne, Centre de Référence Maladies Systémiques Autoimmunes Rares, Vascularites Nécosantes et Sclérodémie Systémique, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France.

Drs. Chaigne and Régent contributed equally to this work.

Dr. Terrier has received consulting fees and honoraria from Roche (less than \$10,000). Dr. Mouthon has received consulting fees (less than \$10,000) and grants from Roche.

Address correspondence to Luc Mouthon, MD, PhD, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, 8 Rue Mechain, 75014 Paris, France (e-mail: luc.mouthon@aphp.fr); or to Nadine Varin-Blank, PhD, UFR SMBH, INSERM U978, 74 Rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France (e-mail: nadine.varin@inserm.fr).

Submitted for publication January 18, 2016; accepted in revised form November 29, 2016.

patients with dcSSc and those with lcSSc. Peripheral B lymphocytes from SSc patients secreted both IL-6 and TGF β , and they activated fibroblasts in vitro.

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterized by fibroblast activation, increased extracellular matrix synthesis, and vascular remodeling (1). Activation of fibroblasts and endothelial cells, together with increased oxidative stress, represent the hallmarks of SSc pathogenesis. SSc is classified according to the extent of skin involvement as either limited cutaneous SSc (lcSSc), with skin lesions essentially limited to the hands and face, or diffuse cutaneous SSc (dcSSc), with skin lesions occurring proximal to the elbows and knees and with frequent visceral involvement. Although autoantibodies have been detected in the serum of patients with SSc and are helpful in the diagnosis and evaluation of the prognosis, the role of B lymphocytes in the pathogenesis of SSc is still poorly defined (2,3).

Circulating B lymphocytes from SSc patients differ from those from healthy controls by the presence of increased proportions of naive B cells and decreased numbers of memory B cells and plasma cells (4). In addition, signaling alterations, including overexpression of both CD19 and CD21, two activating coreceptors of the B cell antigen receptor, have been detected both in the TSK-1 mouse model of SSc and in naive and memory B lymphocytes from patients with SSc. Moreover, the activation receptors CD80, CD86, and CD95 are up-regulated in memory B cells from SSc patients, suggesting their participation in the pathogenic process (4).

High levels of BAFF have been measured in the serum of SSc patients, as well as overexpression of BAFF receptor at the surface of peripheral B cells from the same patients (5). BAFF acting through the NF- κ B pathway promotes B cell survival and participates in autoreactive B cell differentiation (6). B cell infiltrates have also been detected in the dermis of SSc patients (7,8), and serum levels of interleukin-6 (IL-6) have been shown to be increased and to correlate with the extent of skin fibrosis both in humans with SSc and in the TSK-1 mouse model (9,10). IL-6 stimulates collagen secretion by fibroblasts and might therefore be an intermediate for fibroblast activation (11).

Recent studies in which a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody was used to deplete B cells, showed that this treatment allowed for the improvement of skin fibrosis and prevented the loss of pulmonary function in patients with SSc (12). In a prospective randomized trial in which the IL-6 receptor (IL-6R) was targeted with tocilizumab, there was a promising effect of this treatment on skin involvement (13,14).

In the present study, we found abnormal phenotype patterns of peripheral B lymphocytes in patients with SSc, notably between those with lcSSc and those with dcSSc. We also identified increased cytokine production leading to fibroblast activation.

PATIENTS AND METHODS

Patients. Peripheral blood was obtained from 90 patients with SSc who fulfilled the American College of Rheumatism (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) criteria for the diagnosis of SSc (15) and whose cases were followed at Cochin Hospital in the Department of Internal Medicine. The clinical characteristics of the study patients are available upon request from the corresponding author. Skin thickening in areas solely distal to the elbows and knees, with or without facial involvement, was defined as lcSSc. Skin thickening proximal as well as distal to the elbows and knees, with or without facial or truncal involvement, was defined as dcSSc (16). Patients evaluated during the first 12 months after the first non-Raynaud's phenomenon symptom of SSc were defined as having early SSc. Peripheral blood was obtained from 30 healthy blood donors (controls) whose samples were included at the Etablissement Français du Sang (St. Antoine Hospital, Paris, France).

All patients and healthy controls gave written informed consent. Sera and peripheral blood mononuclear cells were collected with the approval of the ethics committee of the Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière. The study conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The work was performed within the Département Hospitalo-Universitaire, Autoimmune and Hormonal Diseases.

Fibroblast culture and functional studies. Biopsies of involved skin of 4 patients with SSc were performed. Normal human dermal fibroblasts were cultured from skin biopsy samples obtained from 4 healthy controls. Biopsy specimens were cut into small pieces and seeded into petri dishes and then into 175-cm² plastic flasks. Patients and healthy control fibroblasts were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Eurobio) in an atmosphere containing in 5% CO₂.

At the third passage, fibroblasts from healthy controls or SSc patients were plated in 96-well plates at a concentration of 5×10^4 cells/ml. After 24 hours, fibroblasts were synchronized by replacing the FCS-supplemented DMEM with DMEM without FCS. After 24 hours of synchronization, media were replaced with FCS-supplemented DMEM with or without 8 representative supernatants of B lymphocytes obtained from 4 healthy controls or 4 patients with dcSSc (performed in triplicate). After 3 days of culture, the viability of fibroblasts was measured using a Colorimetric Cell Viability Kit III (XTT) from (PromoKine), proliferation was quantified using a bromodeoxyuridine cell proliferation enzyme-linked immunosorbent assay (Roche), and indirect immunofluorescence of Ki-67 was evaluated using anti-Ki-67 antibody (Abcam) and fluorescein isothiocyanate-coupled anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). Collagen content was quantified after 5 days of culture using a Sircol assay kit (Biocolor) according to the manufacturer's protocol.

Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using 2.5×10^4 fibroblasts cultured in a 24-well plate at the same concentration as described above. RNA was extracted

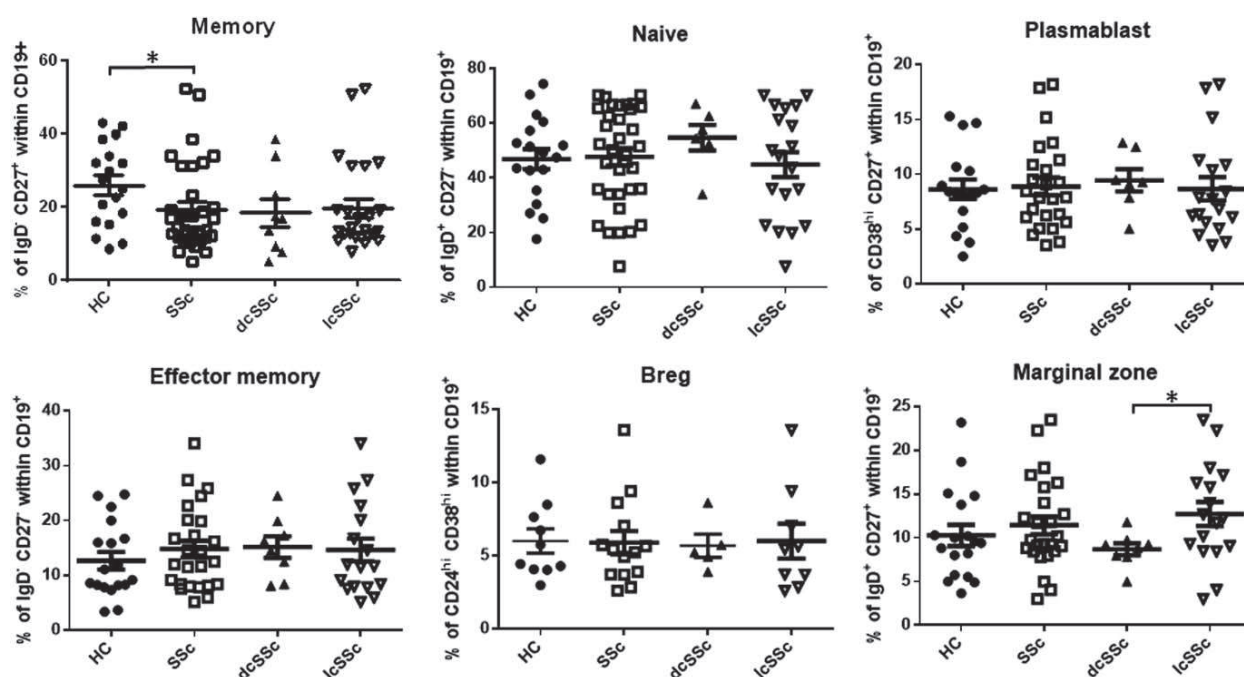


Figure 1. Maturation status of B lymphocyte populations derived from healthy controls (HC) and patients with systemic sclerosis (SSc). B lymphocyte subsets were analyzed in 21 healthy controls (HC) and 34 patients with SSc, including 9 with diffuse cutaneous (dcSSc) and 25 with limited cutaneous (lcSSc) disease. The percentages of the following B lymphocyte subpopulations were quantified: memory/plasmablasts (IgD⁻CD19⁺CD27⁺ cells), naive B lymphocytes (IgD⁺CD19⁺CD27⁻ cells), plasmablasts (CD19⁺CD38^{high}CD27⁺ cells), effector memory B cells (IgD⁻CD19⁺CD27⁻ cells), Breg cells (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} cells), and marginal-zone B cells (IgD⁺CD19⁺CD27⁺ cells). Each symbol represents an individual subject; horizontal lines with bars show the mean \pm SD. * = $P < 0.05$, by Mann-Whitney U test.

using an RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and then quantified using NanoVue (GE Healthcare Life Science). Four hundred nanograms of total RNA was retrotranscribed in complementary DNA (cDNA) using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) and following the manufacturer's protocol. Expression of mRNA for α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen, Snail, and vimentin was quantified in comparison to β_2 -microglobulin as the housekeeping gene. Real-time PCR was performed using a Power SYBR Green quantitative PCR (qPCR) kit on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Primers were obtained from Eurogentec (list of primers available upon request from the corresponding author).

Immunohistochemical study. Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded lung samples: 4- μ m sections were dewaxed and rehydrated progressively. EDTA buffer (pH 9.0) or citrate buffer (pH 6.0) was used for antigen retrieval; endogenous peroxidase was quenched with hydrogen peroxide. Sections were blocked with 5% bovine serum albumin and incubated for 32 minutes with polyclonal antibody against CD20 (reference BSB5195; Bio SB) or CD69 (reference ab202909; Abcam), as recommended by the manufacturer. After incubation with a biotinylated secondary antibody, detection was performed with horseradish peroxidase-streptavidin and diaminobenzidine solution.

Statistical analysis. All analyses were carried out using GraphPad Prism 6 software, with 4 levels of statistical

significance: $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, and $P < 0.0001$. Non-parametric tests, including the Mann-Whitney U test, were used for 2-group independent comparisons. Correlations of protein expression were performed using Spearman's correlation coefficient. Comparisons between fibroblast responses to B lymphocyte stimulation were analyzed using paired t -tests.

RESULTS

Differential peripheral B lymphocyte maturation in patients with SSc. The overall number of B cells and T cells was similar between healthy controls and SSc patients, despite a larger dispersal of T cells, which was mainly observed in patients with lcSSc (data available upon request from the corresponding author). Similarly, B lymphocyte subpopulation counts, including naive cells, effector memory cells, Breg cells, and plasmablasts, were equivalent among the healthy control, total SSc, dcSSc, and lcSSc patient groups (Figure 1). In contrast, the proportion of IgD⁻CD27⁺ memory B lymphocytes was significantly decreased in patients with SSc as compared to healthy controls ($P = 0.04$) (Figure 1), with a similar distribution between SSc subsets. An additional differential proportion of marginal zone B cells was found between

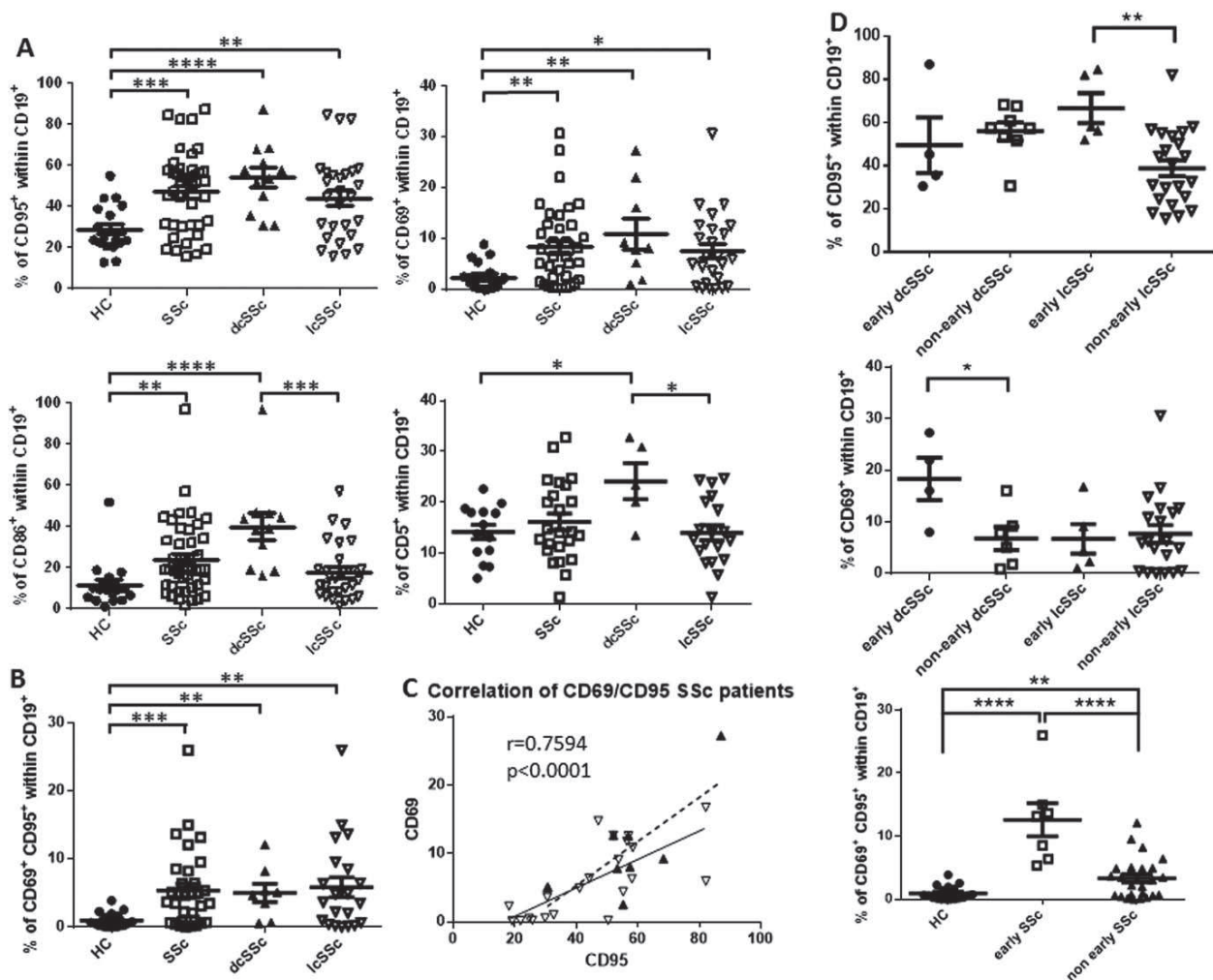


Figure 2. Activation markers of peripheral B lymphocytes from healthy controls (HC) and patients with systemic sclerosis (SSc). B lymphocyte activation markers were analyzed in 21 healthy controls and 43 patients with SSc, 11 with diffuse cutaneous (dcSSc) and 32 with limited cutaneous (lcSSc) disease. **A**, Percentages of CD95+, CD69+, CD86+, and CD5+ cells in total CD19+ B lymphocytes. **B**, Percentages of CD69+CD95+ double-positive cells in total CD19+ B lymphocytes. **C**, Correlation between CD69 and CD95 expression on peripheral CD19+ B lymphocytes from patients with dcSSc (broken line) and patients with lcSSc (solid line), as determined by Spearman's correlation coefficient. **D**, Percentages of CD95+ and CD69+ B cells in patients with early-onset SSc (<1 year after the first non-Raynaud's phenomenon symptom of SSc) versus those without early-onset SSc, by SSc subtype (CD95+ and CD69+ cells), as well as percentages of CD69+CD95+ double-positive B cells in patients with or without early SSc versus healthy controls. Each symbol represents an individual subject; horizontal lines with bars show the mean \pm SD. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; **** = $P < 0.0001$, by Mann-Whitney U test.

the dcSSc and lcSSc subgroups, but not between the total SSc group versus healthy controls. Specific analysis of mature B (Bm) cells showed the IgD-CD38+ early Bm5 subpopulation as a predominantly decreased memory B cell subset, irrespective of SSc subset origin ($P = 0.001$) (data available upon request from the corresponding author).

Activated peripheral B lymphocytes from SSc patients. Patients with SSc exhibited increased proportions of B lymphocytes expressing activation markers

CD95 ($P = 0.0004$), CD69 ($P = 0.002$), and CD86 ($P = 0.001$) as compared to healthy controls (Figure 2A). Similar results were obtained when the mean fluorescence intensity was quantified (data available upon request from the corresponding author). We also identified a B cell subpopulation expressing both CD69 and CD95 in SSc patients that was absent in healthy controls ($P = 0.0002$) (Figure 2B). Interestingly, subpopulations expressing CD69 were correlated with those expressing CD95 in SSc

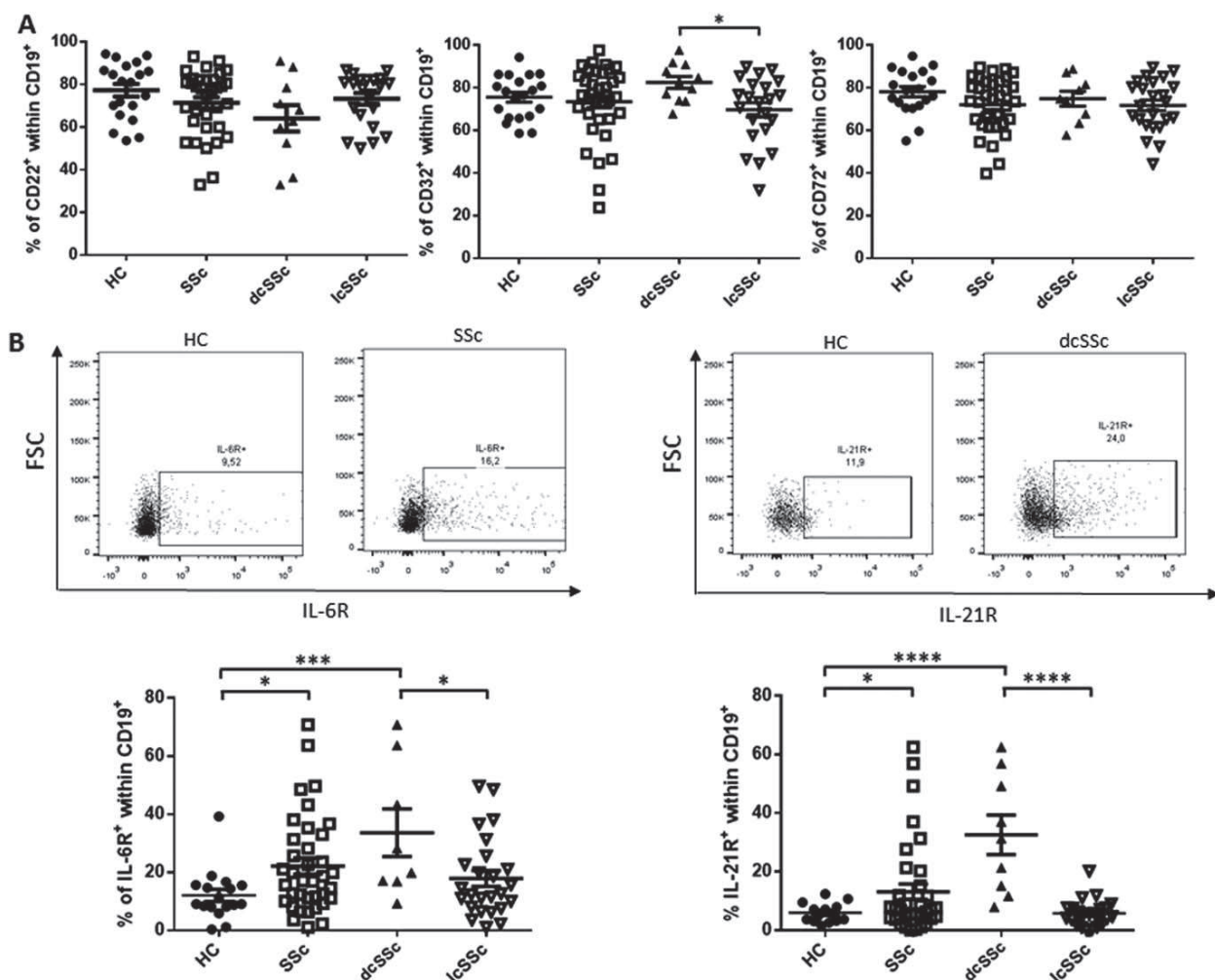


Figure 3. Receptor expression at the membrane of peripheral CD19⁺ B lymphocytes from healthy controls (HC) and patients with systemic sclerosis (SSc). **A** and **B**, Percentages of CD22⁺ (inhibitory), CD32⁺, and CD72⁺ receptors (**A**), as well as interleukin-6 receptor (IL-6R)-positive and IL-21R⁺ receptors (**B**) at the surface of CD19⁺ B lymphocytes from 20 healthy controls and 43 patients with SSc, including 11 with diffuse cutaneous (dcSSc) and 32 with limited cutaneous (lcSSc) disease. Typical dot plots of IL-6R and IL-21R expression are shown. Each symbol represents an individual subject; horizontal lines with bars show the mean \pm SD. * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$; **** = $P < 0.0001$, by Mann-Whitney U test.

patients, both in those with dcSSc and those with lcSSc ($r = 0.76$, $P < 0.0001$) (Figure 2C).

The percentages of CD95⁺ B cells were higher in patients with early lcSSc as compared to patients without early lcSSc ($P = 0.0027$) (Figure 2D). In contrast, the proportion of peripheral CD69⁺ B lymphocytes was higher in patients with early dcSSc as compared to those without early dcSSc ($P = 0.048$). Furthermore, when we analyzed these 2 activation markers in combination, the percentage of CD69⁺CD95⁺ B cells was higher in early SSc patients than in those without early SSc ($P < 0.0001$). No associations between other activation markers were found for the SSc patients and the healthy controls.

The proportions of cells expressing CD86 differed significantly between dcSSc and lcSSc patients ($P = 0.0007$) as well as for cells expressing CD5 ($P = 0.03$) (Figure 2A). CD86 and CD5 B cell subsets were not associated with autoantibody status (data not shown). Since these 2 receptors play a critical role in the B lymphocyte/T lymphocyte synapse, we investigated potential correlations between the proportions of CD5⁺ and CD86⁺ B lymphocytes and the proportions of Th1 (CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺), Th2 (CD3⁺CD4⁺IL-4⁺), Th9 (CD3⁺CD4⁺IL-9⁺), and Th17 (CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺) cells (data available upon request from the corresponding author). No correlation of the percentage of CD5⁺ or CD86⁺ cells with these

T cell subsets was found, except for a correlation between CD86 and the percentage of Th2 cells. Similar results were obtained when patients with dcSSc and lcSSc were analyzed separately.

In contrast, the proportions of cells expressing the inhibitory receptors CD22, CD32, and CD72 did not differ significantly between healthy controls and SSc patients, except for the comparison of CD32+ cells between dcSSc and lcSSc subsets ($P = 0.02$) (Figure 3A). Regarding membrane expression, B lymphocytes from SSc patients showed increased levels of the constitutively expressed activating coreceptor CD20 as compared to those from healthy controls ($P = 0.001$), whereas no significant variation was found for the expression of the inhibitory receptors CD22, CD32, or CD72 or of HLA-DR (data available upon request from the corresponding author). Concerning the crosstalk of B cells with the microenvironment, a slight decrease in BAFF receptor (BR3)-expressing cells was detected in SSc patients as compared to healthy controls ($P = 0.04$); however, this difference was not significant at the cellular level (data available upon request from the corresponding author). It is noteworthy that a remarkable increase in the populations expressing either IL-6R ($P = 0.01$) or IL-21R ($P = 0.02$) was observed in SSc patients versus controls, with major differences for IL-21R expression between dcSSc and lcSSc patients ($P < 0.0001$) regarding both subpopulation percentages (Figure 3B) and mean fluorescence intensity (data available upon request from the corresponding author).

In order to identify clinical manifestations of SSc that could be associated with B cell subsets, expression of activation markers and receptors were evaluated in the presence or absence of pulmonary arterial hypertension (PAH), interstitial lung disease (ILD), arthralgia (joint), and digital ulcers (data available upon request from the corresponding author). There was an increased proportion of B cells expressing CD86, which showed a slight association with PAH and digital ulcers in patients with SSc, while an increased subpopulation of CD95+ B cells was associated with arthralgias. More interestingly, patients with either arthralgias or PAH with or without ILD had increased proportions of B cells expressing the IL-6R. For these 2 late manifestations of SSc, similar proportions of B lymphocytes expressing IL-6R were observed, which allowed us to discriminate between patients with PAH and/or ILD and those without documented pulmonary involvement, who had a lower proportion of peripheral IL-6R+ B cells (data available upon request from the corresponding author).

Overall, we found no significant difference in B cell phenotypes based on autoantibody specificity (data not shown).

Detection of B lymphocytes in the lungs of patients with SSc-associated PAH. We performed immunostaining in lung samples from 3 patients with SSc-associated PAH and 3 healthy controls (normal lung tissue from patients with non-small cell lung carcinoma). In patients with SSc, a number of lymphoid follicles (mostly near bronchioles/small airways) were observed, whereas only scattered B lymphocytes were seen in the lung parenchyma of the control subjects, as assessed by anti-CD20 immunostaining. In lymphocyte-rich areas, scattered CD69+ cells were observed, whereas only faint staining of sparse cells was seen in control subjects (data available upon request from the corresponding author).

Consistency between phenotype characteristics of peripheral B cells and higher production of IL-6 and TGF β in SSc patients. A major increase in IL-6-producing cells was seen in SSc patients as compared to healthy controls ($P < 0.0001$) (Figure 4A). This difference was also found for both IgD+IL-6+CD27- naive B cells (1:2 ratio; $P < 0.0001$) and IgD-IL-6+CD27+ memory B cells (1:1.8 ratio; $P = 0.0003$) but not for marginal-zone or double-negative effector B cells (data not shown). We further analyzed the intracellular staining of IL-6 in both T lymphocytes (defined as CD27+CD19- cells) and monocytes (using forward scatter/side scatter parameters in CD19-CD27- cells) (data available upon request from the corresponding author). No difference in the percentages of IL-6+ T cells was observed in patients with SSc versus healthy controls, whereas a decreased proportion of monocytes expressed IL-6 in SSc patients as compared to healthy controls (data available upon request from the corresponding author). Thus, in patients with SSc, we identified B cells as the main source of IL-6 as compared to T lymphocytes and monocytes, which was not the case in healthy controls (data available upon request from the corresponding author).

We also investigated IL-10 and TGF β (Figures 4B and C) production by purified B lymphocytes after 3 days of culture with or without CpG stimulation. The number of IL-10-producing B cells did not differ significantly between the various samples under these conditions, and their phenotype corresponded to CD19+CD24^{high}CD27+/-CD38^{high}, predominantly CD5- (data available upon request from the corresponding author). More interestingly, peripheral B cells isolated from patients with SSc expressed increased proportion of TGF β +CD19+ B lymphocytes as compared to healthy controls, even in the absence of further stimulation of Toll-like receptor 9 through incubation with CpG ($P = 0.0002$) (Figure 4C). TGF β -expressing B lymphocytes were CD19+CD5-CD24^{low}CD27+CD38^{high} both in healthy controls and in patients with SSc, and did not

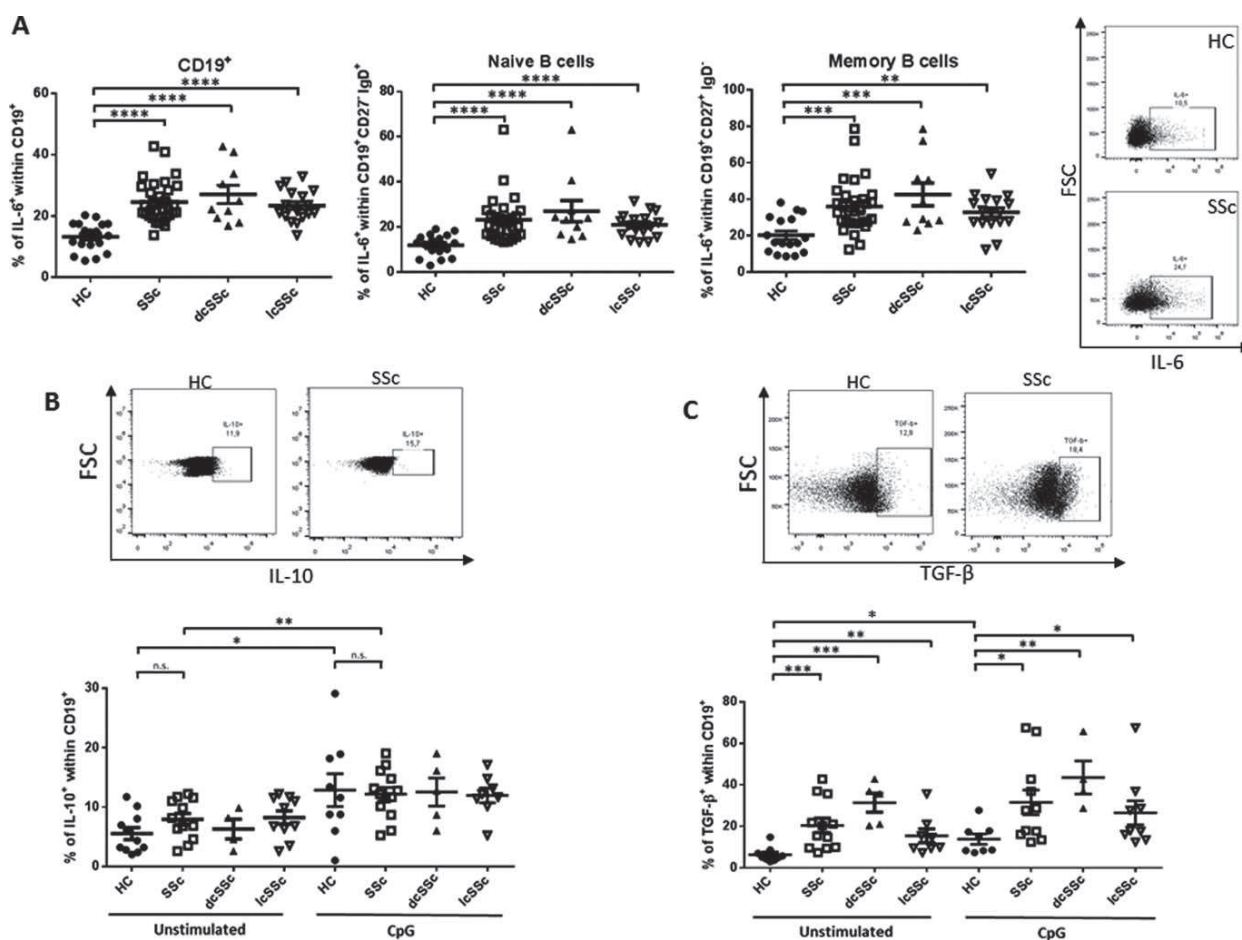


Figure 4. Intracellular cytokine staining of peripheral B lymphocytes from healthy controls (HC) and patients with systemic sclerosis (SSc). **A**, Intracellular interleukin-6 (IL-6) was analyzed in 18 healthy controls and 32 patients with SSc, including 10 with diffuse cutaneous (dcSSc) and 22 with limited cutaneous (lcSSc) disease. Percentages of IL-6⁺ cells were quantified in total B lymphocytes (CD19⁺), naive B cells (IgD⁺CD19⁺CD27⁺), and memory B cells (IgD⁺CD19⁺CD27⁺). A typical dot plot of IL-6 expression is shown at the right. **B** and **C**, Intracellular IL-10 (**B**) and transforming growth factor β (TGF β) (**C**) were analyzed in 11 healthy controls and 12 patients with SSc, including 4 with dcSSc and 8 with lcSSc. Percentages of IL-10⁺ cells were quantified in unstimulated total B lymphocytes or in CpG-containing oligonucleotide-stimulated B cells. Typical dot plots of IL-10 (**B**) and TGF β (**C**) staining are shown. Each symbol represents an individual subject; horizontal lines with bars show the mean \pm SD. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; **** = $P < 0.0001$, by Mann-Whitney U test. NS = not significant.

overlap with IL-10⁺ B lymphocytes (data available upon request from the corresponding author).

Secretion of higher amounts of IL-6 and TGF β and lower amounts of IL-10 by stimulated B cells from SSc patients. We detected higher levels of IL-6 in the serum of SSc patients as compared to healthy controls ($P = 0.01$) (Figure 5A). No significant differences in the levels of IL-10 or TGF β were found (Figure 5A). Interestingly, purified B cells obtained from SSc patients and incubated for 3 days with CpG or for 4 hours with a mix of phorbol myristate acetate (PMA)/ionomycin secreted increased amounts of IL-6, whereas those from healthy controls remained low ($P = 0.0007$)

(Figure 5B). We also detected slightly increased concentrations of IL-10 in B cell supernatants from the SSc patients as compared to the healthy controls after cell stimulation with PMA/ionomycin ($P = 0.01$) (Figure 5C). Unexpectedly, while CpG stimulation promoted a weak increase in IL-10 secretion in SSc patients, a strong increase was observed in healthy control cells under these conditions. According to the increased proportion of TGF β -producing cells, we noted increased amounts of TGF β in the supernatants of CpG-stimulated B cells from SSc patients as compared to healthy controls ($P = 0.001$) (Figure 5D), while PMA/ionomycin treatment did not significantly affect the

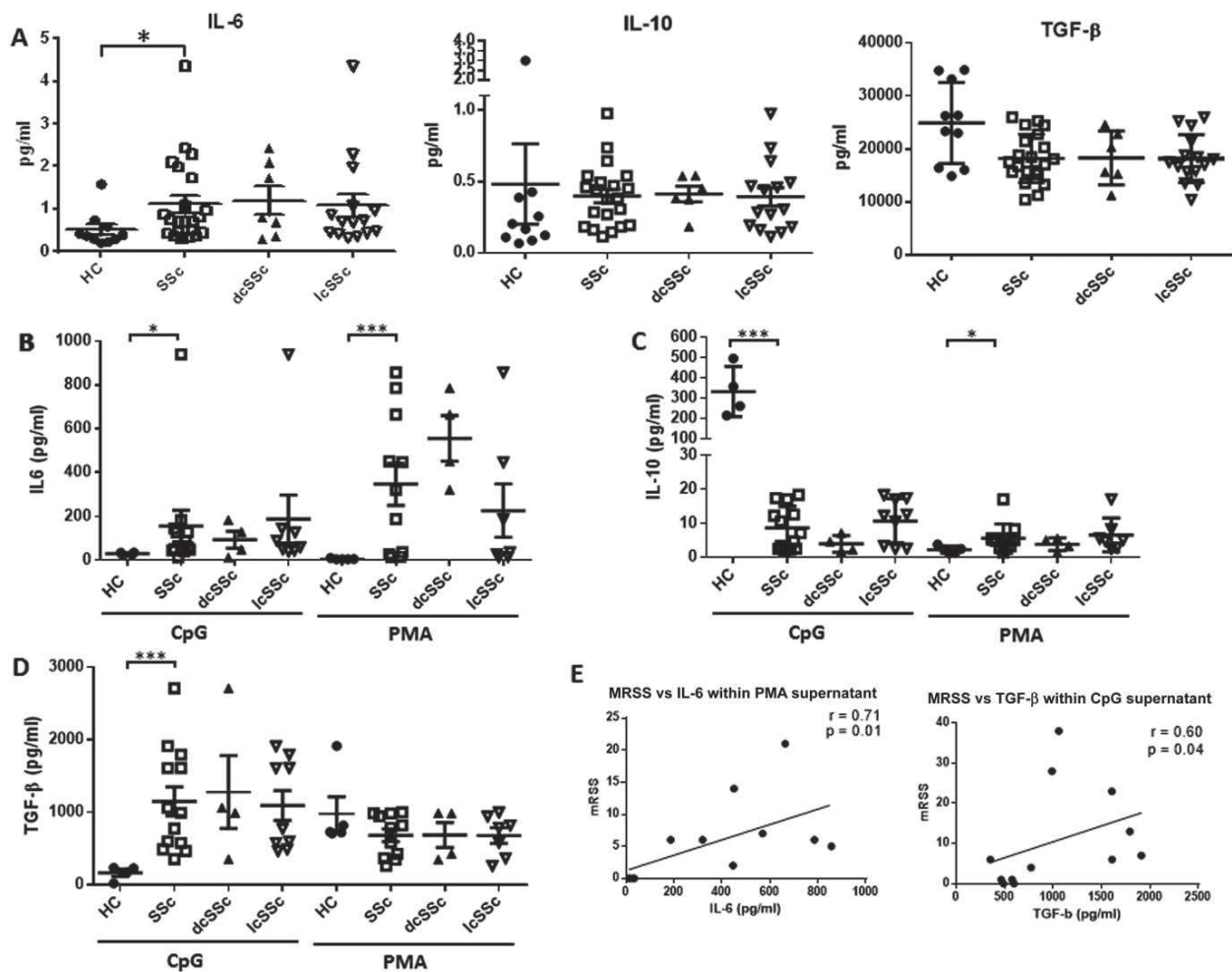


Figure 5. Cytokine concentrations in sera and supernatants of stimulated B cells from the peripheral blood of healthy controls (HC) and systemic sclerosis (SSc) patients. **A**, Levels of interleukin-6 (IL-6), IL-10, and transforming growth factor β (TGF β) in sera from 10 healthy controls and 22 SSc patients, 7 with diffuse cutaneous (dcSSc) and 15 with limited cutaneous (lcSSc) disease. **B–D**, Levels of IL-6 (**B**), IL-10 (**C**), and TGF β (**D**) in supernatants of purified B cells after 4 hours of stimulation with either CpG (4 healthy controls and 12 SSc patients, 4 with dcSSc and 8 with lcSSc) or phorbol myristate acetate (PMA)/ionomycin (6 healthy controls and 11 SSc patients, 4 with dcSSc and 7 with lcSSc). Each symbol represents an individual subject; horizontal lines with bars show the mean \pm SD. * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$, by Mann-Whitney U test. **E**, Correlations between the modified Rodnan skin thickness score (MRSS) and concentrations of IL-6 in purified PMA-stimulated B lymphocyte supernatants (left) and concentrations of TGF β in purified CpG-stimulated B lymphocyte supernatants (right) from 11 patients with SSc, as determined by Spearman’s correlation coefficient.

release as compared to unstimulated cells (data available upon request from the corresponding author).

We found a correlation between the modified Rodnan skin thickness score and the concentration of TGF β in culture supernatants from B cells stimulated with CpG ($r = 0.60$, $P = 0.04$) (Figure 5E). A similar correlation between the modified Rodnan skin thickness score and the concentration of IL-6 in supernatants from B cells stimulated for 4 hours with PMA/ionomycin ($r = 0.71$, $P = 0.01$) was also noted, suggesting a potential profibrotic role of B lymphocytes in SSc patients.

Increased proliferative and fibrotic phenotype after in vitro stimulation of B lymphocytes derived from the dermal fibroblasts of healthy controls and SSc patients. Fibroblasts from healthy control subjects or from the involved skin of SSc patients were cultured for 3 days in the presence of supernatants from B cells obtained from healthy controls. We found no significant influence of culture on the metabolic activity (Figure 6A) or the proliferation rate of the fibroblasts, as assessed by immunofluorescence using Ki-67 labeling (data available upon request from the corresponding author). A random increase in

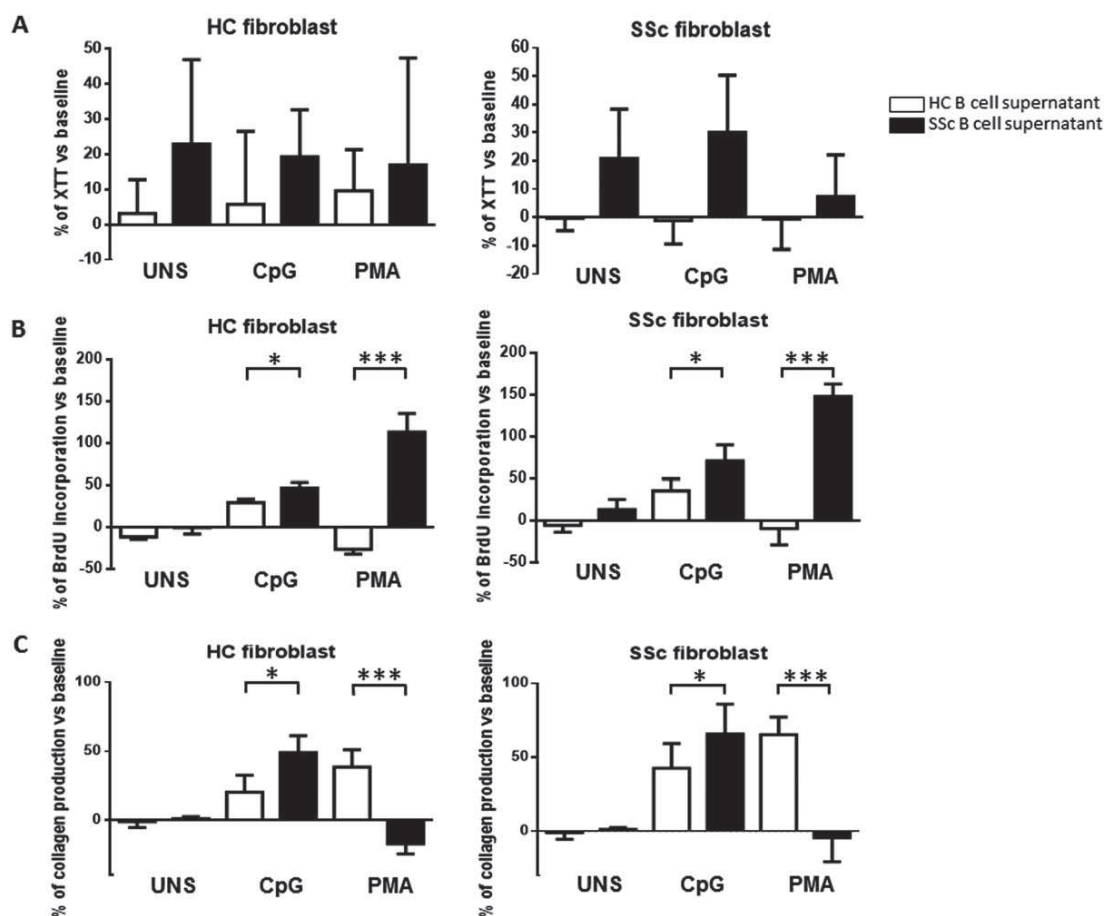


Figure 6. Effect of purified B lymphocyte supernatants from healthy controls (HC) and patients with systemic sclerosis (SSc) on fibroblast proliferation and collagen production. Fibroblasts from 4 healthy controls and 4 patients with SSc were cultured for 3 days in the presence of supernatants from 3-day cultures of unstimulated (UNS) purified B lymphocytes, 3-day cultures of CpG-stimulated purified B lymphocytes, or 4-hour cultures of phorbol myristate acetate (PMA)/ionomycin-stimulated purified B lymphocytes from 4 healthy controls and 4 patients with diffuse SSc (nonautologous). **A**, Viability of fibroblasts was quantified using an XTT reduction assay kit, and the results were expressed as the percentage of XTT reduction in stimulated versus unstimulated fibroblasts. **B**, Proliferation of fibroblasts was quantified using a bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay. Results were expressed as the percentage of BrdU incorporation by stimulated versus unstimulated fibroblasts. **C**, Collagen production by fibroblasts was quantified using a Sircol assay. Results were expressed as the percentage of collagen production by stimulated versus unstimulated fibroblasts. All experiments were performed twice, and the results were similar. Values are the mean \pm SD. * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$, by paired *t*-test.

viability was observed in all fibroblasts cultured in the presence of supernatants of B cells isolated from SSc patients, but the difference did not reach statistical significance (Figure 6A). Prior stimulation of B cells from healthy controls or SSc patients did not provide any additional effect on viability. However, supernatants from CpG- or PMA-stimulated SSc B cells significantly enhanced to various extents the proliferation of both healthy and SSc fibroblasts (Figure 6B). Consistent with their increased proliferation rate, fibroblasts from both healthy controls and SSc patients showed poor production of collagen in the presence of PMA-stimulated B cell supernatants from SSc

patients as compared to those from healthy controls (Figure 6C). When supernatants of CpG-stimulated purified B cells from healthy controls and SSc patients were used to stimulate fibroblasts in culture, collagen production was differentially increased in fibroblasts from both healthy controls and SSc patients (Figure 6C).

The expression of mRNA for α -SMA, type I collagen, Snail, and vimentin in stimulated fibroblasts from healthy controls and SSc patients was analyzed by qPCR and immunofluorescence. There was no consistent detection of α -SMA in fibroblasts from either healthy controls or SSc patients with either technique (data not shown).

However, when fibroblasts from each group were stimulated with either CpG- or PMA/ionomycin-stimulated purified B cell supernatants from SSc patients, we observed increased expression of vimentin. Increased expression of mRNA for the transcription factor Snail and for type I collagen was also detected when fibroblasts from either healthy controls or SSc patients were stimulated with CpG-stimulated B cell supernatants from SSc patients. These increases were abrogated when supernatants were preincubated with anti-TGF β antibody (for CpG supernatants) or anti-IL-6R antibody (for PMA supernatants). Incubation with anti-TGF β antibody or anti-IL-6R antibody induced a drastic decrease in fibroblast proliferation without any difference in cell viability, thus reinforcing the potential pathophysiologic role of B lymphocytes in SSc (data available upon request from the corresponding author).

DISCUSSION

In the present work, we found evidence of an increased peripheral B cell subpopulation in SSc patients as compared to healthy controls that expresses both activation markers and cytokine receptors as well as high levels of intracellular IL-6 and TGF β . We also established that supernatants of B lymphocytes from SSc patients activate both normal and scleroderma fibroblasts at higher levels than do those from healthy controls.

In the SSc patients, we observed increased expression of CD86 and CD95 on B cells, together with a lower proportion of peripheral memory B cells, which is consistent with the results reported by Sato et al (4). This decrease was found to be restricted to the early Bm5 memory peripheral B cell subpopulation, as previously noted in the peripheral blood of patients with Sjögren's syndrome (17). Interestingly, we found increased expression of CD69, IL-6R, and IL-21R on peripheral B lymphocytes from SSc patients, and we further correlated the increased proportions of CD69+ cells with a decreased proportion of CD95+ B lymphocytes. We also showed a major differential proportion of CD5+, CD86+, IL-6R+, or IL-21R+ B cells in the subgroups of patients with dcSSc and lcSSc. Indeed, patients with dcSSc had a higher proportion of these B cells as compared to both lcSSc patients and healthy controls. In contrast, both lcSSc and dcSSc patients showed increased proportions of CD69+ and CD95+ B cells as compared to healthy controls.

We found several correlations between B lymphocyte activation and disease duration in SSc patients, with higher expression of CD95 in the subgroup of patients with early lcSSc and an increased percentage of CD69+ cells in patients with early dcSSc. In addition, we detected a

double-positive subpopulation of CD69+CD95+ peripheral B cells in patients with early SSc, suggesting a possible link between B cell activation at an early stage of the disease and disease severity.

Of note, IL-6R expression was strongly associated with arthralgia, PAH, and/or ILD. There were similar proportions of B lymphocytes expressing IL-6R in patients with PAH and ILD. This finding allowed the discrimination of patients with versus those without lung involvement, the latter group exhibiting lower proportions of peripheral IL-6R+ B cells. In lung tissue from patients with SSc-associated PAH, we observed important numbers of B cells, with a number of lymphoid follicles, mostly in the vicinity of bronchioles/small airways, whereas only scattered B lymphocytes were seen in the lung parenchyma of control subjects, which provides further evidence implicating B cells in the lung involvement in SSc.

Taken together, our data support an activation profile of B lymphocytes in SSc patients, probably due to B cell receptor engagement via autoantigens, both for lcSSc and for dcSSc (18,19). Our data also suggest differential activation between dcSSc and lcSSc B lymphocytes, as was found for patients with PAH and/or ILD versus those without lung involvement. This differential activation could potentially occur through cytokine modulation, as suggested in a recent clinical study (20). We found no correlation between B lymphocyte activation and autoantibody status, probably because they represent additional markers of disease activity/severity. Since B cells from dcSSc patients with PAH and/or ILD are activated, these cells could be proposed as biomarkers.

Our findings also provide novel evidence of the production and secretion of cytokines. We identified both naive and memory B lymphocytes derived from SSc patients as major IL-6-secreting cells. However, a direct correlation between IL-6 levels in culture supernatants and IL-6R expression at the membrane of B lymphocytes was not observed. This result does not support an autocrine activating loop in SSc B lymphocytes, similar to the autostimulatory IL-6-driven B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus (21). The mechanisms leading to B lymphocyte overactivation might instead be due to the increased concentration of IL-6 in the serum of SSc patients versus healthy controls, as previously reported by Needleman et al (22). Moreover, we showed that IL-6 levels in supernatants of purified B cells from SSc patients also correlate with the modified Rodnan skin thickness score, suggesting a critical role of B lymphocytes in the induction of fibrosis. Monocytes have been proposed as the unique immune cells producing IL-6 in patients with SSc (23,24). We provide herein new evidence of the characterization of IL-6-producing B lymphocytes

in patients with SSc. These B lymphocytes might represent interesting treatment targets in these patients, since elevated levels of IL-6 in SSc patient sera have been shown to correlate with disease severity (9).

In contrast to the results of a previous study, we found elevated TGF β production and release by peripheral B lymphocytes from SSc patients as compared to healthy controls, both under steady-state conditions and upon specific TLR stimulation (25). These high levels of TGF β in supernatants of sorted B cells also correlated with the modified Rodnan skin thickness score, suggesting a role of B cells in the development of fibrosis. Indeed, Hasegawa et al (25) reported a lack of substantial increase in the release of TGF β by regulatory B cells, as well as activated T cells (26) or monocytes (27) in SSc patients, consistent with a nonimmune production of TGF β in those patients. In the present study, we identified a specific B lymphocyte subpopulation that secretes high levels of TGF β and exhibits a phenotype similar to those recently described in patients with graft-versus-host disease (28). The absence of IL-10 secretion by SSc B lymphocytes might also contribute to the loss of immunoregulation observed in SSc (29,30). Unfortunately, because of the limited amount of biologic samples available, we were not able to perform coculture experiments using B cells and T cells in order to evaluate these immunomodulatory roles or their potential interplay with T cells.

The pathogenic effects of the B lymphocytes in SSc remain poorly understood (2). Recent reports have addressed interesting therapeutic targeting, both in mouse models and in open studies of limited populations of patients with SSc (31–34). Notably, François and colleagues (35) reported a direct implication of normal B cells in increased proliferation and extracellular matrix production by fibroblasts from healthy controls and SSc patients. In the present study, we demonstrated that supernatants of B lymphocytes purified from SSc patients induce fibroblast activation even in absence of direct cell-to-cell interaction or autoantibody secretion, but more as a consequence of an increased secretion of IL-6 and TGF β . We also found that supernatants of purified B lymphocytes with the higher level of TGF β (CpG supernatant) induced an increased expression of vimentin and the transcription factor Snail, 2 proteins that have been associated with the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts (36–38). Moreover, incubation with either anti-TGF β or anti-IL-6R antibodies induced a dramatic decrease in fibroblast proliferation without any difference in viability, which suggests an implication of these pathways in B cell/fibroblast cross-talk in SSc.

These data further underscore a possible interplay between B lymphocytes and fibroblasts through new

secretory pathways that need to be further investigated in the pathogenesis of SSc. Furthermore, the recent results obtained with IL-6-targeted therapy in the mouse model of bleomycin-induced scleroderma and in patients with SSc highlight the prevalent role of this cytokine in the pathophysiology of SSc and reinforce interest in evaluating the IL-6 secretion capacity of peripheral B cells (22,34,39,40). Finally, these data also support interest in investigating the effects of IL-6-targeted therapy in patient with SSc, as the faSScinate study has shown interesting results using a monoclonal anti-IL-6R antibody (tocilizumab) (41). Our study, based on a consistent number of phenotypically characterized SSc patients who did not receive treatment with glucocorticoid or immunosuppressive drugs, provides new insights into the functional implication of B lymphocytes in SSc.

In conclusion, clinical studies have shown promising results for anti-CD20- and anti-IL-6R-based therapies in patients with SSc (22,40,41). We observed an increased activation of peripheral B cells in patients with dcSSc as compared to those with lcSSc. In vitro, B lymphocytes from SSc patients secreted high amounts of IL-6 and TGF β , which induced fibroblast proliferation, collagen secretion, and differentiation into myofibroblasts in fibroblasts from both healthy individuals and SSc patients. Our findings are the first to highlight differential B lymphocyte subpopulations in the two different SSc subtypes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to staff at the Cochin Cytometry and Immunobiology Facility. We thank Lionel Guitat for designing the primers.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Mouthon had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Terrier, Varin-Blank, Mouthon.

Acquisition of data. Dumoitier, Chaigne, Régent, Lofek, Mhibik, Dorfmueller, Terrier, London, Bérezné, Tamas.

Analysis and interpretation of data. Dumoitier, Chaigne, Lofek.

REFERENCES

1. Dumoitier N, Lofek S, Mouthon L. Pathophysiology of systemic sclerosis: state of the art in 2014. *Presse Med* 2014;43:e267–78.
2. Arnett FC. Is scleroderma an autoantibody mediated disease? *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:579–81.
3. Tyndall A, Fistarol S. The differential diagnosis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:692–9.
4. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol* 2004;41:1123–33.
5. Matsushita T, Sato S. The role of BAFF in autoimmune diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2005;28:333–42. In Japanese.

6. Liu Z, Davidson A. BAFF and selection of autoreactive B cells. *Trends Immunol* 2011;32:388–94.
7. Bosello S, Pers JO, Rochas C, Devauchelle V, de Santis M, Daridon C, et al. BAFF and rheumatic autoimmune disorders: implications for disease management and therapy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007;20:1–8.
8. Kraaij MD, van Laar JM. The role of B cells in systemic sclerosis. *Biologics* 2008;2:389–95.
9. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2001;27:140–6.
10. Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, Bouaziz JD, Uchida J, Fujimoto M, et al. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. *Am J Pathol* 2006;169:954–66.
11. Chizzolini C. T cells, B cells, and polarized immune response in the pathogenesis of fibrosis and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:707–12.
12. Bosello SL, de Luca G, Rucco M, Berardi G, Falcione M, Danza FM, et al. Long-term efficacy of B cell depletion therapy on lung and skin involvement in diffuse systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2015;44:428–36.
13. Elhai M, Meunier M, Maticci-Cerinic M, Maurer B, Riemekasten G, Leturcq T, et al. Outcomes of patients with systemic sclerosis-associated polyarthritis and myopathy treated with tocilizumab or abatacept: a EUSTAR observational study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1217–20.
14. Shima Y, Kuwahara Y, Murota H, Kitaba S, Kawai M, Hirano T, et al. The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2408–12.
15. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65:2737–47.
16. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets, and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202–5.
17. Bohnhorst JØ, Bjørgen MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol* 2001;167:3610–8.
18. Koncz G, Hueber AO. The Fas/CD95 receptor regulates the death of autoreactive B cells and the selection of antigen-specific B cells. *Front Immunol* 2012;3:207.
19. Petterson T, Jendholm J, Månsson A, Bjartell A, Riesbeck K, Cardell LO. Effects of NOD-like receptors in human B lymphocytes and crosstalk between NOD1/NOD2 and Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2011;89:177–87.
20. Bosello S, de Santis M, Lama G, Spanò C, Angelucci C, Tolusso B, et al. B cell depletion in diffuse progressive systemic sclerosis: safety, skin score modification and IL-6 modulation in an up to thirty-six months follow-up open-label trial. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R54.
21. Kitani A, Hara M, Hirose T, Harigai M, Suzuki K, Kawakami M, et al. Autostimulatory effects of IL-6 on excessive B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus: analysis of IL-6 production and IL-6R expression. *Clin Exp Immunol* 1992;88:75–83.
22. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor α , and interferon- γ levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992;35:67–72.
23. Crestani B, Seta N, de Bandt M, Soler P, Rolland C, Dehoux M, et al. Interleukin 6 secretion by monocytes and alveolar macrophages in systemic sclerosis with lung involvement. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1260–5.
24. Giacomelli R, Cipriani P, Danese C, Pizzuto F, Lattanzio R, Parzanese I, et al. Peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic sclerosis produce increased amounts of interleukin 6, but not transforming growth factor β 1. *J Rheumatol* 1996;23:291–6.
25. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of transforming growth factor- β by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 2004;296:89–93.
26. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, et al. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGF β expression. *PLoS One* 2009;4:e5981.
27. Baraut J, Grigore EI, Jean-Louis F, Khelifa SH, Durand C, Verrecchia F, et al. Peripheral blood regulatory T cells in patients with diffuse systemic sclerosis (SSc) before and after autologous hematopoietic SCT: a pilot study. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:349–54.
28. De Masson A, Bouaziz JD, le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, et al. CD24^{hi}CD27⁺ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2015;125:1830–9.
29. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity* 2010;32:129–40.
30. Yao Y, Simard AR, Shi FD, Hao J. IL-10-producing lymphocytes in inflammatory disease. *Int Rev Immunol* 2013;32:324–36.
31. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002;109:1453–62.
32. Smith V, van Praet JT, Vandooren B, van der Cruyssen B, Naeyaert JM, Decuman S, et al. Rituximab in diffuse cutaneous systemic sclerosis: an open-label clinical and histopathological study. *Ann Rheum Dis* 2010;69:193–7.
33. Jordan S, Distler JH, Maurer B, Huscher D, van Laar JM, Allanore Y, et al. Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1188–94.
34. Giuggioli D, Lumetti F, Colaci M, Fallahi P, Antonelli A, Ferri C. Rituximab in the treatment of patients with systemic sclerosis: our experience and review of the literature. *Autoimmun Rev* 2015;14:1072–8.
35. François A, Chatelus E, Wachsmann D, Sibilia J, Bahram S, Alsaleh G, et al. B lymphocytes and B-cell activating factor promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R168.
36. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003;200:500–3.
37. Franz M, Spiegel K, Umbreit C, Richter P, Codina-Canet C, Berndt A, et al. Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. *Histochem Cell Biol* 2009;131:651–60.
38. Park HY, Kim JH, Park CK. VEGF induces TGF- β 1 expression and myofibroblast transformation after glaucoma surgery. *Am J Pathol* 2013;182:2147–54.
39. Desallais L, Avouac J, Fréchet M, Elhai M, Ratsimandresy R, Montes M, et al. Targeting IL-6 by both passive or active immunization strategies prevents bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R157.
40. Fernandes das Neves M, Oliveira S, Amaral MC, Delgado Alves J. Treatment of systemic sclerosis with tocilizumab. *Rheumatology (Oxford)* 2015;54:371–2.
41. Khanna D, Denton CP, Jähreis A, van Laar JM, Frech TM, Anderson ME, et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial. *Lancet* 2016;387:2630–40.

IV. FOXP3 impliqué dans la production d'IL-10 ?

Le rôle de FOXP3 dans l'immunorégulation a plus été étudié dans les lymphocytes T régulateurs. Ce facteur joue un rôle clé dans la différenciation et le maintien des Tregs (40). Une sous-population de Tregs induits (iTregs) FOXP3⁺ a été décrite comme pouvant réguler les réponses inflammatoires et l'activité des lymphocytes T effecteurs via la production de cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-10 Groux (171). Dans un modèle de cancer du sein, Hossain et al., ont démontré l'implication de FOXP3 dans la production d'IL-10 par les iTregs. Dans cette étude, FOXP3 est décrit comme pouvant interagir avec le facteur de transcription STAT3 afin de former un complexe induisant la transcription de l'IL-10. Si l'interaction entre FOXP3 et STAT3 avait déjà été décrite dans les Tregs (281), Hossain et al., montrent pour la première fois, que FOXP3 peut agir comme co-facteur de transcription et réguler avec STAT3, l'expression de l'IL-10 (222).

1. STAT3 dans les B de LLC

Dans les cellules B de LLC, STAT3 est activé de manière constitutive par une phosphorylation d'un résidu sérine (Ser727) (207). Dans une étude plus récente, le BCR a été montré comme pouvant induire l'activation de STAT3 dans les cellules de LLC. La stimulation antigénique de ces cellules induit la phosphorylation de STAT3 sur le résidu tyrosine (Y705) mais augmente aussi la phosphorylation déjà présente de la sérine (196). Des résultats que nous avons retrouvés en stimulant le BCR et le CD40 des cellules B de patients (Figure 29). Nous avons démontré dans la première partie, une augmentation de la capacité des cellules B de patients à produire de l'IL-10 et du TGFβ1, en réponse à ces stimulations (Article 1). L'implication de STAT3 dans la production d'IL-10 a déjà été montrée dans de nombreux modèles dont la LLC (150, 195, 199). Néanmoins l'implication de FOXP3 comme co-facteur de transcription dans la production d'IL-10 par les cellules B de LLC n'a jamais été étudiée. Au regard de ces travaux et après avoir démontré l'existence de nombreuses similitudes entre les cellules B de LLC et les lymphocytes T régulateurs, tel que l'expression de FOXP3, nous avons étudié, dans ces cellules B de LLC, la possible interaction entre STAT3 et FOXP3.

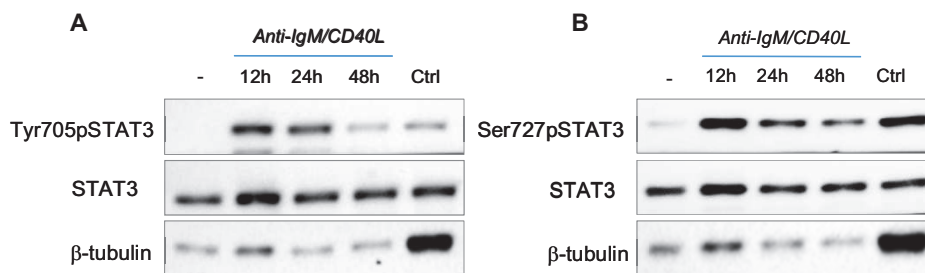


Figure 29 : Activation de STAT3 dans les cellules B de LLC suite à l'activation du BCR et du CD40

La phosphorylation de STAT3 sur la (A) Tyr705 et sur la (B) Ser727 est analysée par Western Blot (WB) au cours d'une stimulation cinétique (12h, 24h et 48h) avec de l'anti-IgM (20 μ g/mL) et du CD40 ligand (CD40L : 1 μ g/mL) de lymphocytes B purifiés à partir de sang périphérique de patients de LLC. Un extrait cellulaire de la lignée U2OS a été utilisé comme contrôlé positif (Ctrl).

2. Un complexe FOXP3-STAT3 dans les lymphocytes B de LLC ?

Mes expériences préliminaires de Co-immunoprécipitation suggèrent l'existence d'un complexe possible entre FOXP3 et STAT3 dans les cellules B purifiées de patients de LLC comme cela a été démontré dans les lymphocytes T régulateurs (Figure 30). En effet, on retrouve la protéine STAT3 dans le complexe immunoprécipité avec un anticorps anti-FOXP3. La protéine présente est plus abondante que dans l'immunoprécipitation contrôlée avec un anticorps de même isotype.

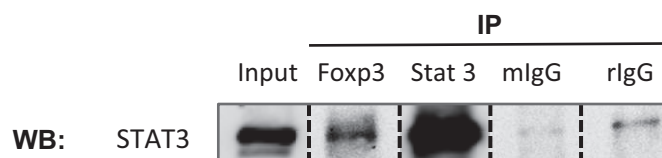


Figure 30: Un potentiel complexe STAT3-FOXP3

Les protéines FOXP3 et STAT3 ont été immunoprécipitées (IP) par des anticorps de souris anti-FOXP3 (Abcam) et de lapin anti-STAT3 (Santa Cruz). L'expression de STAT3 est ensuite mise en évidence par Western Blot (WB) avec des anticorps murins (Santa Cruz). Des anticorps isotypes de souris (mIgG) et de lapin (rIgG) ont été utilisés en contrôlé.

Après avoir confirmé ces résultats, des études sur l'implication de ce complexe dans la régulation de l'IL-10 pourront être menées.

❖ Matériels & Méthodes :

Western Blot :

20 µg de protéines extraites de lymphocytes B purifiés à partir de sang périphérique de patients atteints de LLC sont déposés sur un gel d'acrylamide (8%) selon le protocole décrit dans l'**Article 2**. Les anticorps utilisés sont indiqués dans cet article.

Co-Immunoprécipitation :

500 µg de protéines extraites de lymphocytes de patients LLC selon le protocole décrit dans l'**Article 2** sont immunoprécipitées par les anticorps anti-STAT3 ou anti-FOXP3 (**Tableau 4**) liés à des billes magnétiques de protéine G (20 µg) (Millipore PureProteome™) selon le protocole fourni par Millipore.

Les extraits protéiques totaux (25 µg) ainsi que les échantillons immunoprécipités sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide (8%) et la protéine STAT3 est détectée par western blot.

Anticorps	Clone	Fournisseur
Anti-STAT3 WB	Monoclonal de souris IgG ₁ (F-2)	Santa Cruz
Anti-STAT3 IP	Polyclonal de lapin (C-20)	Santa Cruz
Anti-FOXP3 IP	Monoclonal de souris IgG ₃ (mAbcam 450)	Abcam

Tableau 4: Anticorps utilisés dans les expériences de Co-Immunoprécipitation

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Les lymphocytes B produisent de nombreux facteurs solubles dont des facteurs pro-inflammatoires ou immunosuppresseurs afin de dialoguer avec le microenvironnement. La balance fine de production entre ces deux types de facteurs, retrouvée à l'état physiologique se trouve être altérée dans de nombreuses pathologies. L'objectif de ma thèse a été d'étudier cette balance dans la LLC, sa relevance dans la pathologie et les mécanismes moléculaires impliqués.

1. Une balance cytokinique en faveur de l'immunorégulation

Afin d'étudier cette balance, nous avons tout d'abord analysé la capacité des lymphocytes B de LLC à produire ces différents facteurs. Les premiers résultats de l'équipe démontrent une capacité importante des cellules tumorales de LLC à exprimer des facteurs tels que l'IL-10 et le TGF β 1, décrits dans différentes populations lymphocytaires dotées de propriétés immunorégulatrices. On observe une augmentation significative de la fréquence des cellules B exprimant l'IL-10 dans la LLC, en comparaison à des cellules de donneurs sains. Ces résultats corroborent les données de la littérature. Cette capacité des cellules B de LLC, à produire l'IL-10 avait été analysée pour la première fois dans l'étude de DiLillo et al., dans laquelle jusqu'à plus de 86% des cellules exprimaient la cytokine ([102](#)) et présentaient des caractéristiques fonctionnelles de lymphocytes B régulateurs. D'autres études ont également décrit des sous-populations de lymphocytes B régulateurs agissant *via* la production de TGF β 1 ([78](#)). Ce facteur est beaucoup plus étudié dans le contexte des lymphocytes T régulateurs qui le produisent et a été impliqué dans la suppression ou l'altération fonctionnelle des lymphocytes T cytotoxiques. Le TGF β 1 pourrait ainsi être impliqué dans le défaut de toxicité des lymphocytes T CD8⁺ décrit dans la LLC et participer au défaut d'élimination de la population tumorale ([76](#)).

La capacité à produire des facteurs tels que l'IL-10 confère également aux cellules de LLC une implication fonctionnelle dans la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale qui joue un rôle clé dans le maintien et la progression de la pathologie ([69](#), [179](#)). Celle-ci se traduit notamment par l'induction de Tregs associée à l'altération de la prolifération et de la fonction des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, observées chez certains patients et dans les modèles animaux reproduisant la pathologie ([102](#), [195](#)).

Ces effets, récemment démontrés par notre équipe dans des expériences de co-cultures, *in vitro*, montrent une modification d'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺ de LLC en co-culture avec les lymphocytes B de LLC, ainsi qu'une augmentation de la proportion de cellules T régulatrices FOXP3⁺.

De récentes études montrent que le traitement à l'ibrutinib (inhibiteur de BTK dans la voie de signalisation du BCR) des patients entraîne une diminution de ce caractère immunosuppresseur des cellules de LLC passant par une capacité à produire l'IL-10, réduite ainsi que le recouvrement de certaines fonctions des lymphocytes T. Ces données confirment le rôle central de la cytokine dans l'immunosuppression constatée dans la LLC (195). En plus des lymphocytes T, les cellules de LLC ont été décrites pour agir également sur d'autres cellules du microenvironnement dont les monocytes et macrophages *via* la production de facteurs comme l'IL-10 (102, 178). Une interaction avec le microenvironnement qui pourrait permettre aux cellules leucémiques d'avoir un avantage de survie et de prolifération vis à vis des cellules non leucémiques. L'importance de ce dialogue soulève la question de l'efficacité du développement de thérapies telles que des CAR T cells avec un ciblage plus spécifique des lymphocytes B de LLC par les cellules T autologues (124). Les données préliminaires sur l'effet de l'ibrutinib sur la capacité de sécrétion des facteurs immunorégulateurs comme l'IL-10 par les cellules B de LLC et sur l'implication de ces facteurs sur l'altération fonctionnelle des lymphocytes T ouvrent de nouvelles perspectives sur le ciblage thérapeutique et l'utilisation de traitements combinés (195, 282).

En plus de ces similitudes fonctionnelles, les cellules B de LLC partagent aussi des marqueurs phénotypiques avec les lymphocytes B régulateurs producteurs d'IL-10 (B10) (102). Les phénotypes des lymphocytes B régulateurs restent cependant assez divers chez l'homme avec plusieurs sous-populations présentant des phénotypes différents. Ainsi, nombres d'études définissent plutôt ces cellules en fonction des facteurs exprimés et de leurs modes d'action (35). Certains B régulateurs producteurs d'IL-10 (B10) expriment le CD5, un marqueur important exprimé par les cellules de LLC (52, 102). En comparant l'expression des marqueurs membranaires des lymphocytes B de LLC, tels le CD19, le CD5 et le CD27 à celle de l'IL-10, nous avons démontré que les cellules IL-10⁺ expriment des niveaux plus importants de ces 3 marqueurs.

Les travaux de l'équipe montrent plus précisément, une importante expression d'IL-10 et de TGFβ1 par la sous-population CD19^{high}CD5^{high} présente en proportion importante chez les patients montrant une progression de la maladie. Les populations IL-10⁺ et TGFβ1⁺ présentent ainsi, majoritairement un phénotype de cellules B mémoires CD5⁺CD19⁺CD27⁺ différent de celui des sous-populations de cellules B régulatrices décrites avec des marqueurs tels que le CD25, CD24 ou le CD38. Ces différences de phénotypes entre les cellules exprimant ou non l'IL-10 reflètent l'existence d'une hétérogénéité intra-patients. L'émergence de sous-clones au sein d'un même patient pourrait être corrélée à leur capacité à produire des facteurs immunorégulateurs (**Figure 31**).

Si l'implication du CD5 dans la progression de la LLC n'est pas totalement comprise, l'importance de ce marqueur dans la production de l'IL-10 a été décrite par plusieurs équipes, ([102](#), [150](#)). Garaud et al., ont démontré que le CD5 induit la production d'IL-10 après l'activation de STAT3 et NFAT2, deux facteurs importants pour la progression de la pathologie. La diminution d'expression du CD5 consécutive à l'utilisation de siRNA est associée à une diminution de la production d'IL-10. Dans une étude plus récente, la même équipe montre que cette induction se ferait via l'activation des MAPKs par des mécanismes dépendants du calcium ([200](#)). Le CD5 permet donc l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la production de l'IL-10 mais pouvant aussi jouer un rôle dans la survie et la prolifération maligne. De la même manière que pour les lymphocytes B régulateurs, la production d'IL-10 par les cellules de LLC peut être induite par la stimulation de facteurs tels que le CD40, le BCR, les TLRs, ou les BAFFR ([131](#), [179](#), [198](#)). Une étude récente montre également l'implication du récepteur aux chimiokines, le CXCR4 dans l'induction de l'IL-10 via l'activation de STAT3 ([201](#)).

En plus du CD5, nous avons démontré que la sous-population de cellules B IL-10⁺ exprime des niveaux plus importants de CD40 et d'IgM de surface.

La LLC est une pathologie hétérogène et selon le statut mutationnel des IGHV, on discrimine deux types de patients. Nos résultats, en accord avec la littérature montrent également, une hétérogénéité dans la production d'IL-10 entre les différents patients.

Les résultats de notre équipe montrent une expression plus importante des facteurs immunorégulateurs tels que l'IL-10 chez les patients où les cellules présentent un IGHV non muté qui est corrélé à un mauvais pronostic.

Plusieurs études ont montré que des taux sériques plus importants d'IL-10 sont associés à l'expression du CD38 et de ZAP70, ainsi qu'à une diminution de la survie globale des patients ([162](#), [283](#)). Une étude plus récente suggère en revanche, que les cellules de patients présentant des IGHV mutés et un phénotype anergique auraient une capacité plus importante à produire l'IL-10. Les méthodes de stimulation de ces cellules, employées sont celles de l'activation des TLRs ne faisant pas intervenir le statut mutationnel. De plus l'analyse concerne uniquement la production d'IL-10 comme facteur immunorégulateur ce qui peut représenter un biais d'étude dans les cellules de LLC qui expriment d'autres facteurs immunorégulateurs mais aussi un niveau bas de cytokines pro-inflammatoires ([179](#)) ([178](#)).

Nous avons analysé l'expression de facteurs pro-inflammatoires par ces cellules B de LLC. Nos résultats montrent que l'augmentation de la fréquence des cellules B productrices d'IL-10, dans la LLC est associée à une diminution de la proportion de cellules capables de produire l'IL-6. Les travaux les plus récents de l'équipe ont aussi montré que si les cellules de patients secrètent plus d'IL-10 et de TGFβ1 que les cellules de donneurs sains ces cellules de LLC secrètent des niveaux de TNFα, IL8, IL4, IL1β, IFNγ, IL13, IL2, IL17 et IL-6 plus faibles que les cellules contrôles. Des niveaux plus élevés de cytokines telles que l'IL-6 ont tout de même été retrouvés dans le sérum de patients atteints de LLC en comparaison au sérum de donneurs sains et corrélés à un mauvais pronostic ([134](#), [162](#), [226](#)).

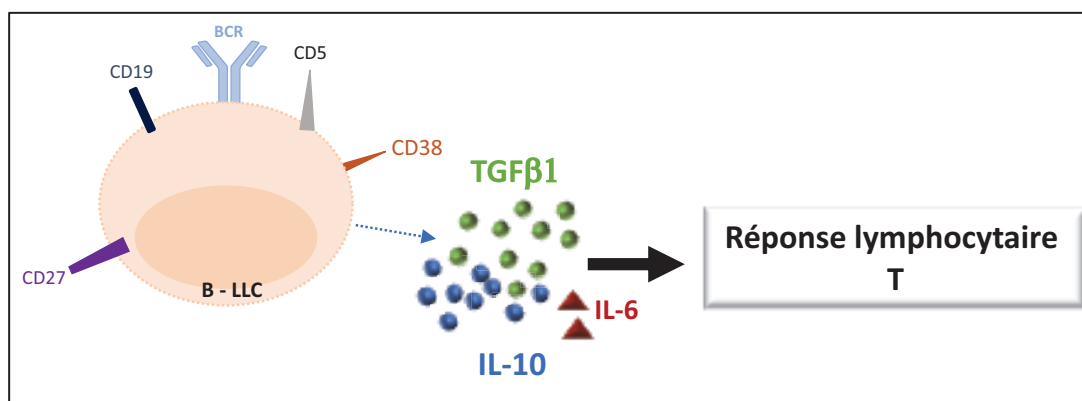


Figure 31: Des Lymphocytes B de LLC aux propriétés régulatrices

Les cellules B de LLC expriment des marqueurs phénotypiques tels que le CD19, le CD5, le CD27 et le CD38 exprimés par des sous-populations de Bregs. Ces cellules sécrètent aussi des facteurs immunorégulateurs l'IL-10 et le TGFβ1 alors qu'elles sécrètent des niveaux faibles de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. Des facteurs qui permettent à ces cellules de moduler la réponse lymphocytaire T.

Plusieurs études suggèrent que les niveaux importants trouvés dans le sérum proviennent à la fois de la cellule de LLC elle-même mais surtout des cellules du microenvironnement tumoral telles que les cellules stromales ([162](#), [284](#)). Contrairement à l'IL-10, les cellules B de LLC ne semblent donc pas être la principale source d'IL-6. Cette notion reste tout de même à revérifier car l'équipe de Buggins et al., suggère que les cellules de LLC puissent sécréter des niveaux assez importants d'IL-6 avec des concentrations en IL-6 supérieures à 85ng/mL dans le surnageant de culture de cellules de patients, alors que, les concentrations en IL-10 et TGFβ1 sont inférieures à 0,5ng/mL ([219](#)).

Les niveaux d'IL6 décrits dans cette étude correspondent en fait à ceux trouvés par notre équipe dans les cellules de donneurs sains. Nos résultats, montrent, de plus que les productions cellulaires mesurées directement sur les cellules de LLC se traduisent à la fois par une augmentation d'IL10 et une diminution d'IL6.

Nous pouvons donc envisager que ce soit l'inversion de cette balance de production cytokinique qui soit importante pour le déclenchement d'un programme immunorégulateur au détriment d'un programme pro-inflammatoire. Aux vues de nos résultats, les cellules B de LLC présentent donc un profil de production de cytokines différent de celui des cellules B du lymphome à cellules du manteau dans lequel les cellules produisent à la fois d'importants niveaux d'IL-10 et d'IL-6 impliqués de manière autocrine, dans la survie de ces cellules via l'activation constitutive de STAT3 ([163](#)). Il sera intéressant de voir comment cette production différente peut être liée à l'état de différenciation des cellules B entre les deux pathologies.

Une perturbation du rapport entre IL-6 et IL-10 semble intervenir dans le développement de nombreuses pathologies chroniques. Alors qu'une importante production d'IL-10 est retrouvée dans les leucémies dont la LLC, un déséquilibre en faveur de l'IL-6 est retrouvé dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques. Dans le cadre d'une étude comparative des productions cytokiniques des cellules de différentes pathologies chroniques, et grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Luc Mouthon, nous avons étudié la production de ces cytokines par les lymphocytes B de patients atteints de sclérodémie systémique (SSc), et analysé la balance IL-10/IL-6. Alors que les lymphocytes B de SSc présentent une capacité à produire l'IL-10 similaire à celle retrouvée chez les donneurs sains, ces cellules expriment et secrètent des niveaux plus importants d'IL-6. Cette pathologie se caractérise par une activation fibroblastique qui conduit à la fibrose.

Les résultats de cette étude démontrent que les lymphocytes B dialoguent avec les fibroblastes notamment via la production augmentée d'IL-6, induisant leur activation, et leur différenciation en myofibroblastes (159). Selon le contexte pathologique, les lymphocytes B CD5⁺ vont donc présenter une balance cytokinique en faveur de l'immunosuppression ou de l'inflammation qui va jouer un rôle clé dans le développement de ces différentes pathologies. Alors que dans une pathologie chronique comme la SSc, la production de facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-6 participerait au maintien de la réponse inflammatoire et fibrosante en empêchant sa résolution, la production de facteurs immunorégulateurs, comme l'IL-10 dans la LLC, participerait à la suppression chronique de la réponse inflammatoire anti-tumorale. L'implication de l'IL-6 dans la pathogénèse de la LLC a été étudiée par certaines équipes qui suggèrent que cette cytokine pouvait dans ce contexte présenter des propriétés immunorégulatrices, en inhibant l'activation des cellules T et en induisant une réponse de type Th2 (219). Une étude plus récente souligne que selon le contexte, l'IL-6 peut avoir deux types de fonctions. Selon les auteurs, cette cytokine peut participer à la tumorigénèse en stimulant la prolifération, la survie des cellules tumorales et leur échappement à la surveillance immunitaire. Ainsi Liu et al., ont montré l'implication de la cytokine dans la résistance aux traitements et le maintien des cellules de LLC (165). À l'inverse, lors d'une stimulation du TLR7 cette cytokine peut augmenter la prolifération des lymphocytes T et les réponses immunitaires anti-tumorales (285). Toutes ces données montrent que la LLC est une pathologie hétérogène qui n'implique pas uniquement les lymphocytes B. Les cellules de LLC seraient donc au cœur d'un dialogue bidirectionnel avec le microenvironnement sur lequel elles agiraient *via* la production de facteurs immunosuppresseurs dont l'IL-10, mais aussi par la sécrétion d'autres cytokines comme l'IL-6 qui en fonction de leurs capacités à se lier aux cellules portant leurs récepteurs (y compris elles-mêmes) vont pouvoir initier des signaux activateurs ou inhibiteurs. Ces deux cytokines se fixent à leurs récepteurs respectifs afin d'activer les voies de signalisation impliquées dans la survie ou la prolifération des cellules.

Au cours de ce travail, nous avons démontré que les cellules B de LLC expriment à leur membrane des niveaux plus importants de récepteurs à l'IL-10 (IL-10R) que les cellules B de témoins sains. Nos résultats montrent aussi une expression plus importante du récepteur membranaire à l'IL-6 (IL-6R) tout comme cela a été récemment mis en évidence par Liu et al, (165) (**Figure 32**). L'activation de ces récepteurs par leurs cytokines respectives conduit à l'activation d'un facteur commun : STAT3.

Ce facteur de transcription est connu pour être constitutivement activé dans les lymphocytes B de LLC, phosphorylé sur la Ser727 et jouant un rôle crucial dans la survie et la prolifération de ces cellules (207).

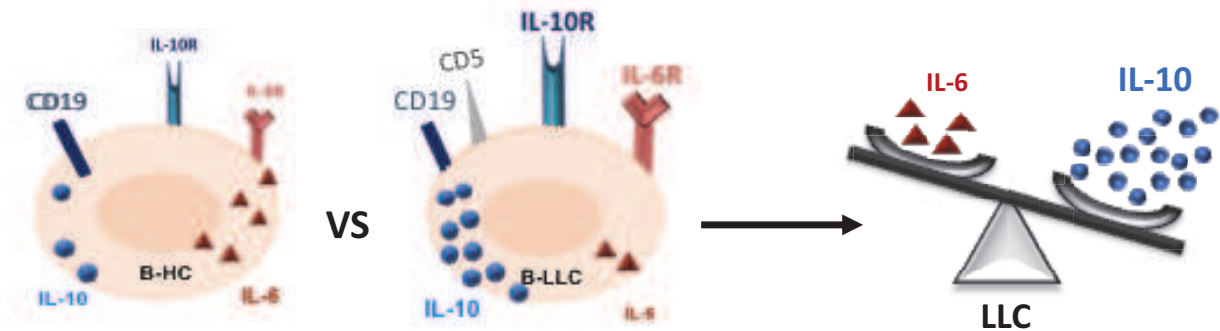


Figure 32: Une balance cytokinique en faveur de l'IL-10 dans la LLC

Les cellules B de LLC expriment des niveaux importants d'IL-10 alors qu'elles expriment des niveaux très faibles d'IL-6 en comparaison aux cellules B de sujets sains. Dans la LLC, il y a donc une balance cytokinique en faveur de l'IL-10 et d'une immunorégulation.

2. Effets de l'IL-10 et l'IL-6 sur les cellules B de LLC: implication physiopathologique

La stimulation des cellules de LLC avec de l'IL-6 a montré à la fois une fonction pro-survie sur les cellules par l'expression de gènes anti-apoptotiques (219), et une capacité à inhiber la prolifération des cellules, notamment en diminuant l'expression du $TNF\alpha$ (285). Selon d'autres études, l'IL-10 quant à elle inhiberait à la fois la prolifération et l'apoptose des cellules de LLC participant ainsi au maintien de la néoplasie (176, 177).

Si le rôle de l'IL-10 produit par les lymphocytes B de LLC sur les autres cellules a été étudié, l'effet de la cytokine sur les cellules B elles-mêmes a été peu décrit.

Afin de mieux comprendre l'implication physiopathologique de ces deux cytokines, nous avons stimulé des lymphocytes B de patients de LLC avec de l'IL-10 ou de l'IL-6 recombinantes, avant de mesurer l'activité métabolique de ces cellules reflétant leur survie. Nos résultats montrent que l'IL-10 a bien un effet pro-survie sur ces cellules de patients, un effet plus important que celui de l'IL-6 sur l'activité métabolique de ces cellules B de LLC. Afin de mieux comprendre l'implication de ces cytokines dans la survie des cellules, nous avons étudié les effets de l'IL-10 et de l'IL-6 sur la phosphorylation de STAT3.

Dans les cellules de LLC, ce facteur de transcription est phosphorylé de manière constitutive sur un résidu sérine et induit l'expression de gènes impliqués dans la survie des cellules leucémiques (207). Par ailleurs l'activation de la voie JAKs/STAT3 par l'IL-10 et l'IL-6 est bien connue. Ces cytokines activent le facteur par la phosphorylation rapide d'un résidu tyrosine ; en revanche leur effet sur le résidu sérine a été très peu décrit. Nos résultats montrent que la stimulation des cellules de LLC avec l'IL-10 conduit à une augmentation beaucoup plus significative des niveaux de phosphorylation de STAT3 sur la S727 que la stimulation des cellules avec de l'IL-6. Si l'effet de l'IL-10 sur la phosphorylation de S727STAT3 dans les cellules de LLC est étudiée pour la première fois, les effets faibles de l'IL-6 que nous avons observés corroborent ceux trouvés par une autre équipe (196). De plus, une étude récente rapporte que l'implication de l'IL-6 dans l'activation de STAT3 sur S727 serait corrélée aux niveaux de récepteurs à l'IL-6 exprimés à la membrane (165). En ce qui concerne l'activation constitutive de ce résidu retrouvée dans la LLC, elle ferait intervenir les MAPKs. L'IL-6 a d'ailleurs été décrite dans plusieurs modèles comme pouvant activer la voie des MAPKs et des PI3K/AKT mais les voies activées par l'IL-10 ne sont pas aussi bien décrites. Un travail récent a également montré l'implication d'un complexe formé par le CD5 et les protéines BLNK avec la Caséine Kinase 2 (CK2), une Sérine/Thréonine kinase surexprimée par les cellules de patients et pouvant être activée par le CD5. L'inhibition de CK2 entraîne une perte de phosphorylation sur S727 et l'apoptose des cellules confirmant l'importance de ce facteur activé dans la pathologie (227). Ainsi, Les voies de signalisation différenciellement activées par ces cytokines dans le modèle de la LLC doivent encore être mieux précisées afin de comprendre leur implication dans la survie des cellules .

De manière intéressante, Cette forme activée de STAT3 a également été décrite avec une localisation mitochondriale dans les cellules de LLC et pouvant jouer un rôle dans le métabolisme cellulaire et protéger la cellule du stress antioxydant (209). Plusieurs études rapportent dans la LLC une altération du métabolisme cellulaire médié par STAT3 qui protégerait les cellules leucémiques de l'apoptose (286). L'effet de l'IL-10 sur le métabolisme des cellules de LLC pourrait donc faire intervenir cette forme mitochondriale de S727pSTAT3. La plus faible réponse à l'IL-6 sur la phosphorylation de ce résidu pourrait ainsi expliquer l'absence d'effet significatif de l'IL-6 sur l'activité métabolique.

Nous avons également montré que la stimulation des cellules de LLC par l'IL-10 ou l'IL-6 induit la phosphorylation de STAT3 sur le résidu tyrosine 705.

L'IL-10 présente également un effet beaucoup plus important sur cette phosphorylation inductible de STAT3 que l'IL-6, que ce soit en terme d'intensité ou en terme de durée.

La phosphorylation du résidu Tyr705 en réponse à l'IL-6 a été observée dans de nombreuses études dans des modèles physiologiques que pathologiques ; mais, en comparant la réponse aux deux cytokines, nous démontrons que celles-ci induisent de manière différentielle la phosphorylation de la protéine qui n'est pas détectée à l'état basal (207). Un effet différentiel des deux cytokines qui avait été retrouvé dans dans d'autres modèles tel que celui des cellules dendritiques étudié par Braun et al., (188). Une différence de réponse qui pourrait être expliquée par l'activation de la phosphatase SOCS3, qui n'a pas été étudié dans ce projet et dont l'expression dans les cellules de LLC n'est pas très décrite. Des expériences complémentaires, afin d'étudier l'expression et l'activation de cette phosphatase ainsi que l'expression des autres sous-unités des récepteurs aux cytokines (gp130 pour l'IL-6), permettraient de mieux comprendre cette différence de réponse des cellules de LLC à l'IL-6 et à l'IL-10.

Dans les cellules du lymphome du manteau, seules les cellules B issues des ganglions de patients présentent la forme Y705pSTAT3 (163). Les cellules du sang périphérique n'étant pas en contact avec le microenvironnement, ne sont pas la cible des différents facteurs sécrétés par l'environnement ganglionnaire qui pourraient induire cette phosphorylation de STAT3 (226). Ceci suggère que la phosphorylation du résidu sérine retrouvée dans les cellules de sang périphérique est indépendante des facteurs du microenvironnement ganglionnaire.

L'effet différentiel des deux cytokines sur les niveaux d'activation de STAT3 est donc en accord avec les différentes réponses observées sur la survie des cellules de LLC.

L'effet des deux cytokines étudiées, sur la survie des cellules de LLC a été confirmé par l'analyse des gènes anti-apoptotiques BclxL et Bcl-2 régulés par STAT3. Sur les échantillons étudiés, alors que la stimulation à l'IL-10 conduit à une augmentation de l'expression de ces gènes, la stimulation à l'IL-6 n'a pas d'effet significatif. Ces résultats confirment la présence d'une régulation différentielle de la survie par ces deux cytokines mais ne corroborent pas les études démontrant un effet pro-survie de l'IL-6 sur les cellules B de LLC passant par une augmentation des gènes anti-apoptotiques BclxL et Mcl-1 (165). Dans ces études, cet effet n'est pas démontré en stimulant les cellules de patients mais en analysant le blocage de l'IL-6R par le Tocilizumab, ou de STAT3 par le Stattic qui mimeraient le blocage de l'effet de la cytokine sur ces cellules.

D'après les auteurs de ces deux études, l'IL-6 permet le maintien des cellules de LLC et agit sur la résistance de ces cellules aux traitements. Lu et al., ont également démontré l'implication de cette cytokine dans la résistance des cellules de LLC à des traitements par des inhibiteurs de HDAC, via l'activation de STAT3 et l'expression des gènes anti-apoptotiques déjà cités en réponse à la stimulation des cellules in vitro (215). Cette résistance passerait non seulement par l'inhibition de l'apoptose mais aussi par l'arrêt du cycle cellulaire et le blocage des cellules B en phase G₀ (165).

Nous avons montré que cette cytokine pouvait activer STAT3, en revanche sur les échantillons étudiés, seul l'effet de l'IL-10 sur la survie a été observé. L'IL-10 semble aussi être impliquée dans l'anergie des lymphocytes B de LLC (179).

Nous n'avons pas observé d'effet significatif des stimulations à l'IL-6 ou à l'IL-10 sur l'expression du gène de la CyclinD1 ce qui pourrait être le reflet de cette anergie. L'effet significatif et plus important de l'IL-10 sur la survie de ces cellules pourrait aussi être responsable de la résistance des cellules de patients à certains traitements, le blocage de la voie pourrait ainsi augmenter la sensibilité de ces cellules aux chimiothérapies comme cela a pu être montré avec l'IL-6. Il convient donc de bien définir l'état des cellules de patients utilisées et leur capacité à produire ces cytokines.

Dans notre étude, nous remarquons une hétérogénéité de réponse aux cytokines entre les différents patients. En effet, si pour un patient donné on observe un effet plus important de l'IL-10 par rapport à l'IL-6 sur les mêmes gènes anti-apoptotiques, certains patients montrent tout de même une augmentation de l'expression de ces gènes pro-survie en réponse à l'IL-6. Il serait donc intéressant, d'une part de corréliser ces différences de réponses aux niveaux d'expression des récepteurs aux cytokines chez ces patients. Une analyse des différentes caractéristiques clinico-biologiques entre ces patients permettrait aussi de déterminer un lien potentiel avec la réponse aux cytokines. Plusieurs études suggèrent que les cellules de patients à IGHV non muté seraient plus sensibles aux facteurs pro-survies provenant du microenvironnement tumoral alors que les cellules à IGHV muté auraient acquis des mécanismes les rendant moins dépendantes à ces signaux émanant du microenvironnement (287). La différence de réponse aux cytokines des cellules pourrait donc être liée au statut mutationnel des IGHV des patients de LLC. Une étude comparant les réponses aux cytokines de ces deux groupes de patients confirmerait l'implication de ces facteurs dans la physiopathologie.

En réponse à ces cytokines, notamment l'IL-10, STAT3 activé serait impliqué dans la survie

et l'anergie des cellules de LLC. D'autre part, ce facteur a aussi été décrit pour son rôle immuno-régulateur. Responsable de l'accumulation de Bregs, de Tregs et de Th17 *via* la production de cytokines comme l'IL-10 et l'IL-17 ([222](#), [223](#)), le facteur de transcription est aussi capable d'induire l'expression de molécules immuno-inhibitrices telles que PD-L1. Une étude faite sur des patients traités à l'Ibrutinib a mis en évidence l'implication de STAT3 dans la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet l'inhibition de STAT3 suite au traitement est associée à la diminution de l'expression des protéines PD1/PD-L1 mais aussi de la production d'IL-10 par les cellules de LLC ([195](#)). Cette fonction d'immunorégulation fait de STAT3 une protéine essentielle dans le contrôle de l'immunité anti-tumorale. Impliqué à la fois dans les mécanismes de prolifération, de survie mais aussi dans la production de cytokines, STAT3 est considéré comme étant un facteur de transcription faisant le lien entre l'inflammation et les cancers ([224](#)). L'activation constitutive de ce facteur dans la LLC agirait aussi bien sur la survie des cellules leucémiques que sur la suppression des réponses immunitaires anti-tumorales dirigées contre elles et passant notamment par l'induction de l'IL-10. Plusieurs études ont démontré que les cytokines et leurs récepteurs peuvent devenir des facteurs de survie autocrines ou paracrines des cellules immunitaires comme les lymphocytes B.

L'IL-10 et l'IL-6 sont deux cytokines capables d'activer STAT3 et d'induire leur propre production comme cela a été montré dans de nombreux modèles. Notre équipe a démontré la présence de cette régulation autocrine par les deux cytokines dans le lymphome du manteau, un lymphome à cellules B CD5⁺([163](#)). L'ensemble de nos résultats suggère également l'existence d'une régulation autocrine de l'IL-10 via l'activation de STAT3, dans les cellules de patients de LLC.

3. Effet Autocrine ou Paracrine de l'IL-10 sur les cellules de LLC

Nos résultats montrent une induction de l'expression du gène de l'IL-10 en réponse à la stimulation des cellules de patients par l'IL-10 suggérant l'existence d'une régulation autocrine de la cytokine passant par l'activation de STAT3. L'effet autocrine de l'IL-10 sur la production ou la sécrétion pourrait également être démontré par l'utilisation de cytokine recombinante marquée par un fluorochrome. Le blocage de la voie de l'IL-10 au niveau de l'IL-10R par un anticorps bloquant sur les cellules B de LLC, conduit à une diminution de l'activité métabolique de ces cellules. Le blocage empêche à la fois l'effet paracrine ou autocrine de l'IL-10 sur la survie des cellules B de LLC.

Ce blocage n'a en revanche pas d'effet significatif sur la phosphorylation constitutive de STAT3 sur le résidu sérine. L'IL-10 ne semble donc pas être le principal facteur responsable de cette activation constitutive de STAT3. Cependant, contrairement à ce qui a pu être observé dans le lymphome à cellules de manteau, à l'état basal, STAT3 n'est pas phosphorylé sur la tyrosine 705. La présence à l'état basal de l'IL-10 ne serait donc pas suffisante pour détecter cette phosphorylation.

Le blocage du récepteur bloque l'effet de la stimulation par un IL-10 recombinant, que ce soit sur la phosphorylation de STAT3 sur le résidu tyrosine ou sur l'activité métabolique (**Figure 33**). Des expériences de qPCR sont en cours afin de déterminer l'effet du blocage de l'IL-10R sur l'expression des gènes étudiés précédemment, *BclxL*, *Bcl-2*, *IL-6* ou encore *l'IL-10*.

Ce résultat confirme l'implication de STAT3 dans la survie des cellules B de LLC, induite par l'IL-10. Les effets du blocage de l'IL-10R ont également été étudiés dans le modèle de lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCBs). L'importante expression des récepteurs à l'IL-10 à la surface des cellules pathologiques et impliqués dans une régulation autocrine de la cytokine permet de cibler plus facilement ces cellules en bloquant les récepteurs. Ce blocage inhibe la signalisation JAK/STAT3 et induit l'apoptose des cellules de lymphome ([175](#)). Le blocage des récepteurs à l'IL-10 dans la LLC apparaît donc également être une approche intéressante pour induire l'apoptose de ces cellules.

Dans notre étude, l'IL-6 n'a pas d'effet significatif sur la survie et l'expression du gène de l'IL-6. De plus, nous avons démontré que les cellules de LLC expriment de faibles niveaux de la cytokine. L'équipe de Liu et al., suggère néanmoins l'existence d'une régulation autocrine de l'IL-6 dans la LLC, corrélée au niveau d'activation des facteurs STAT3 et NF- κ B, activés de manière constitutive dans ces cellules. Ces deux facteurs formeraient un complexe régulant l'expression de gènes cibles de NF- κ B dont l'IL-6 ([229](#)). Une boucle autocrine a aussi été impliquée dans la résistance des cellules de LLC aux traitements par chimiothérapies et qui pourrait être bloquée par le Tocilizumab, un anticorps bloquant l'IL-6R ([165](#)). Même si la production de ces cytokines peut être induite par un même facteur, STAT3, de nombreuses études suggèrent que la production d'une cytokine ou de l'autre dépendrait de la durée d'activation du facteur de transcription. En effet, alors qu'une activation transitoire de STAT3 induirait une réponse pro-inflammatoire et la production d'IL-6, une activation continue induirait une réponse immunosuppressive et la production d'IL-10 ([184](#), [189](#)). Ainsi l'activation constitutive de STAT3 dans la LLC participerait à une

réponse immunosuppressive et à la production d'IL-10. L'IL-10, régulée de manière autocrine joue un rôle clé dans la survie des lymphocytes B de LLC et dans l'immunosuppression, retrouvés dans la pathologie. Nous avons démontré que les lymphocytes B de LLC étaient non seulement capables de sécréter cette cytokine immunorégulatrice afin d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale, mais également pouvaient entretenir ces propriétés immunosuppressives et leur propre survie par une régulation autocrine de l'IL-10.

L'IL-10, n'est pas le seul facteur immunorégulateur à avoir été décrit dans ces cellules, similaires aux cellules B régulatrices. Après avoir mis en évidence l'expression de facteurs tels que l'IL-10 et le TGFβ1, nous avons pour la première fois, démontré l'expression de FOXP3 par les cellules B de LLC.

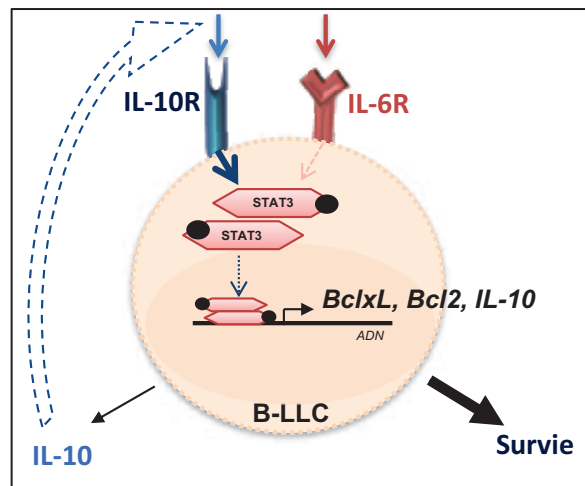


Figure 33: Régulation autocrine de l'IL-10 en faveur de la survie, via STAT3

Bien que les cellules de LLC répondent à l'IL-10 et à l'IL-6 par la phosphorylation de STAT3, notamment sur le résidu Tyr705, une réponse plus importante est observée suite à la stimulation par l'IL-10. L'IL-10 a un effet en faveur de la survie des cellules de LLC et induit sa propre production. Une régulation autocrine ou paracrine de l'IL-10, en faveur de la survie des cellules de patients de LLC.

4. Des cellules B exprimant Foxp3

FOXP3 est un facteur de transcription caractéristique des lymphocytes T régulateurs et longtemps considéré comme étant le marqueur d'une sous-population Tregs. Les cellules B régulatrices présentent de nombreuses similitudes phénotypiques et fonctionnelles avec les Tregs. Alors que plusieurs sous-populations de Bregs avec des phénotypes et des modes d'action différents ont pu être décrites, l'existence d'un facteur de transcription spécifique

de cette sous-population cellulaire, n'a pas été mise en évidence. Au cours de cette thèse, j'ai participé à la mise en évidence de FOXP3 dans les cellules B de LLC. Dans ces cellules, FOXP3 pourrait jouer un rôle similaire à celui observé dans les lymphocytes T et réguler l'induction de la tolérance des différentes cellules immunitaires.

Hossain et al., ont démontré dans un modèle de cellules T régulatrices infiltrant les tumeurs, que les facteurs FOXP3 et STAT3 forment un complexe régulant l'expression de l'IL-10 (222). FOXP3 pourrait également être impliqué dans la régulation de l'IL-10 dans les lymphocytes B de LLC et participer à l'immunosuppression exercée par ces cellules. Des résultats préliminaires de Co-immunoprécipitation suggèrent donc l'existence d'un complexe formé par STAT3 et FOXP3 (Figure 34).

Des expériences supplémentaires démontrant l'existence de ce complexe ainsi que son implication dans la transcription du gène de l'IL-10 (ChIPseq) permettront de mieux comprendre le rôle de FOXP3 dans ces cellules B.

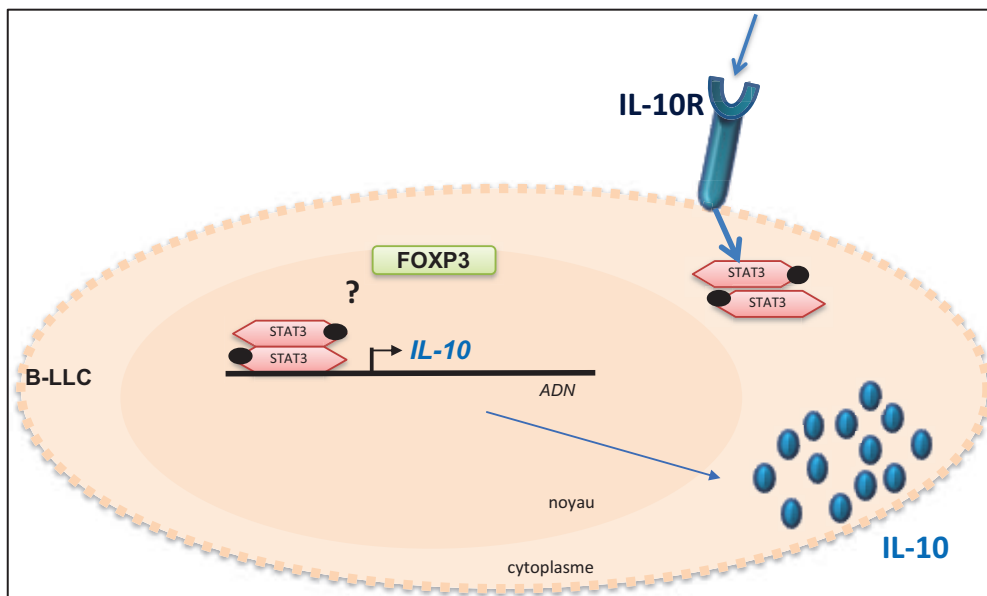


Figure 34: Un complexe STAT3-FOXP3 dans la régulation de l'IL-10 ?

Les cellules de LLC expriment le facteur FOXP3 qui dans un modèle de cellules T régulatrices forme un complexe avec STAT3 pour induire la production d'IL-10. Dans ce projet, nous nous sommes demandés si FOXP3 pouvait interagir avec STAT3 dans les cellules de LLC.

Conclusion

Au cours de ce projet de thèse, nous avons étudié la balance cytokinique IL-10/IL6 que nous avons comparé à celle retrouvée à l'état physiologique ou dans des pathologies inflammatoires. Dans la LLC, les lymphocytes B présentent un profil cytokinique en faveur de l'immunorégulation. Ces cellules expriment des facteurs immunorégulateurs tels que l'IL-10, le TGF β 1 et FOXP3. Des facteurs qui permettent à ces cellules d'agir sur les cellules environnantes et de supprimer la réponse immunitaire anti-tumorale.

Le profil d'expression est différent de celui retrouvé dans des pathologies inflammatoires comme la Sclérodémie systémique. Nous avons, en effet démontré que les lymphocytes B de LLC possèdent une capacité plus importante à produire l'IL-10 qu'à l'état physiologique et plus faible à produire l'IL-6. La production de ces facteurs joue un rôle essentiel dans le dialogue entre les cellules B de LLC et le microenvironnement tumoral. Un dialogue bidirectionnel qui permet le maintien de ces cellules tumorales via l'échange de signaux au travers notamment des cytokines.

Nous avons voulu étudier l'effet de ces deux cytokines produites de façon différentielle par les cellules. Bien que les cellules B de LLC expriment des niveaux plus importants d'IL-10R et d'IL-6R que les cellules de témoins sains, la stimulation des cellules de patients avec l'IL-10 ou l'IL-6, a mis en évidence une différence de réponse des cellules B de patients à ces 2 cytokines. Si on observe un rôle pro-survie de l'IL-10 associé à l'augmentation des niveaux de phosphorylation de STAT3 sur les deux résidus et à une expression plus importante de gènes anti-apoptotiques, l'IL-6 n'induit en revanche que la phosphorylation de STAT3 sur la Y705. Nous n'avons pas observé d'effet significatif de la cytokine sur la survie des cellules de LLC. En plus de ce rôle pro-survie, nous avons démontré que l'IL-10 pouvait induire sa propre expression et que le blocage de la voie au niveau du récepteur (IL-10R), bloque aussi bien l'effet autocrine ou paracrine de la cytokine sur la survie mais bloque aussi, l'effet de la stimulation exogène.

Nous avons donc démontré l'implication d'une régulation autocrine de l'IL-10 dans la survie des cellules de LLC ainsi que dans leurs fonctions immunorégulatrices via l'activation de STAT3.

La production d'IL-10 des cellules B de LLC confère à ces cellules une signature de cellules immunorégulatrices tout comme pour les Bregs. Cette propriété joue un rôle crucial dans le dialogue avec le microenvironnement et la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale caractéristique de la pathologie. En plus d'agir sur les cellules du microenvironnement tumoral, l'IL-10 agit également sur les lymphocytes B de LLC afin de maintenir et d'entretenir les propriétés immunorégulatrices et donner un avantage prolifératif à cette sous-population clonale (**Figure 35**).

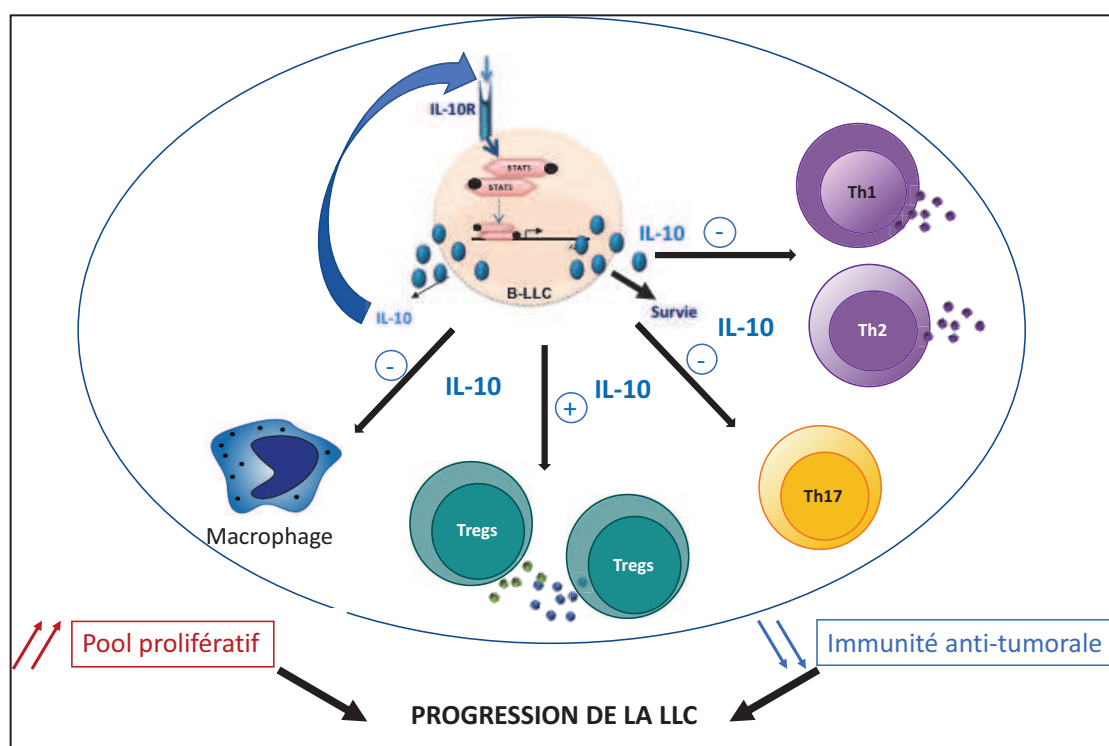


Figure 35: L'IL-10 dans le maintien et la progression de la LLC

La production d'IL-10 par les cellules de LLC, leur permet d'agir sur les cellules environnantes telles que les cellules T auxiliaires (Th1, Th2 et Th17), les T régulateurs (Tregs) ou les macrophages afin d'inhiber les réponses immunitaires anti-tumorales. Cette production d'IL-10 permet aussi à ces cellules de se maintenir, d'entretenir des propriétés immunorégulatrices et de donner un avantage prolifératif à une sous-population clonale.

RÉFÉRENCES

1. Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:55-79. Epub 2004/03/23.
2. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:541-70. Epub 2006/03/23.
3. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216. Epub 2002/02/28.
4. Cooper MD. The early history of B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):191-7. Epub 2015/02/07.
5. Rickert RC. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(8):578-91.
6. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):172-84.
7. Bross L, Fukita Y, McBlane F, Demolliere C, Rajewsky K, Jacobs H. DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity.* 2000;13(5):589-97.
8. Stavnezer J, Schrader CE. IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J Immunol.* 2014;193(11):5370-8.
9. Hobeika E, Nielsen PJ, Medgyesi D. Signaling mechanisms regulating B-lymphocyte activation and tolerance. *J Mol Med (Berl).* 2015;93(2):143-58.
10. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118(16):4313-20. Epub 2011/08/06.
11. Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, Paget D, Meffre E. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2005;201(10):1659-67.
12. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005;201(5):703-11. Epub 2005/03/02.
13. Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu HB, et al. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity.* 2004;20(4):441-53. Epub 2004/04/16.
14. Rawlings DJ, Dai X, Buckner JH. The role of PTPN22 risk variant in the development of autoimmunity: finding common ground between mouse and human. *J Immunol.* 2015;194(7):2977-84.
15. Melchers F, Rolink AR. B cell tolerance--how to make it and how to break it. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;305:1-23. Epub 2006/05/27.
16. Kohrer S, Havranek O, Seyfried F, Hurtz C, Coffey GP, Kim E, et al. Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia.* 2016;30(6):1246-54.
17. Forconi F, Potter KN, Wheatley I, Darzentas N, Sozzi E, Stamatopoulos K, et al. The normal IGHV1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic patterns characteristic of unmutated CLL. *Blood.* 2010;115(1):71-7.
18. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood.* 2011;117(6):1781-91.
19. Kuppers E, Beyer C. Expression of estrogen receptor-alpha and beta mRNA in the developing and adult mouse striatum. *Neurosci Lett.* 1999;276(2):95-8.

20. Stamatopoulos K, Kosmas C, Stavroyianni N, Belessi C, Papadaki T. Selection of immunoglobulin diversity gene reading frames in B cell lymphoproliferative disorders. *Leukemia*. 1999;13(4):601-4.
21. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(12):5413-7.
22. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol*. 2005;87:163-208.
23. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, Pfeifer D, Bartholome K, Burger M, et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2009;69(13):5424-32.
24. Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham TH, Fend F, Jaffe ES, et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2006;108(5):1668-76. Epub 2006/04/29.
25. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9. Epub 2002/11/16.
26. Carmi Y, Engleman EG. Tumor-binding antibodies and tumor immunity. *Oncotarget*. 2015;6(34):35129-30.
27. Rodriguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol*. 2005;238(2):67-75.
28. Bao Y, Cao X. The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review. *J Autoimmun*. 2014;55:10-23.
29. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol*. 2000;1(6):475-82.
30. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med*. 2012;209(5):1001-10. Epub 2012/05/02.
31. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002;3(10):944-50.
32. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med*. 2003;197(4):489-501.
33. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;358(7):676-88. Epub 2008/02/15.
34. Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Kuwano Y, Okochi H, Tamaki K, et al. Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J Immunol*. 2010;184(9):4801-9.
35. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015;42(4):607-12.
36. Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res*. 2006;66(15):7741-7.
37. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res*. 2011;71(10):3505-15.
38. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18(5):723-37.
39. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a

- single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
40. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev.* 2011;241(1):260-8.
41. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(3):253-7.
42. Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity.* 2008;28(1):100-11.
43. Lan Q, Fan H, Quesniaux V, Ryffel B, Liu Z, Zheng SG. Induced Foxp3(+) regulatory T cells: a potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases? *J Mol Cell Biol.* 2012;4(1):22-8.
44. Yuan X, Cheng G, Malek TR. The importance of regulatory T-cell heterogeneity in maintaining self-tolerance. *Immunol Rev.* 2014;259(1):103-14.
45. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523-32.
46. Papp G, Boros P, Nakken B, Szodoray P, Zeher M. Regulatory immune cells and functions in autoimmunity and transplantation immunology. *Autoimmun Rev.* 2017;16(5):435-44.
47. Katz DH, Hamaoka T, Newburger PE, Benacerraf B. Hapten-specific IgE antibody responses in mice. IV. Evidence for distinctive sensitivities of IgE and IgG B lymphocytes to the regulatory influence of T cells. *J Immunol.* 1974;113(3):974-83.
48. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA, Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;184(6):2271-8.
49. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 2002;16(2):219-30.
50. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol.* 2015;27(10):479-86.
51. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 2008;28(5):639-50.
52. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011;117(2):530-41.
53. Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity.* 2011;34(5):703-14.
54. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol.* 2009;182(12):7459-72.
55. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Calderon Gomez E, Sweeney CH, et al. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol.* 2008;180(7):4763-73.
56. Lykken JM, Candando KM, Tedder TF. Regulatory B10 cell development and function. *Int Immunol.* 2015;27(10):471-7.
57. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol.* 2010;40(10):2686-91.
58. Liu Z, Hu Y, Yu P, Lin M, Huang G, Kawai T, et al. Toll-like receptor agonists *Porphyromonas gingivalis* LPS and CpG differentially regulate IL-10 competency and frequencies of mouse B10 cells. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(1):90-100. Epub 2017/02/16.

59. Banko Z, Pozsgay J, Szili D, Toth M, Gati T, Nagy G, et al. Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients. *J Immunol.* 2017;198(4):1512-20.
60. Achour A, Simon Q, Mohr A, Seite JF, Youinou P, Bendaoud B, et al. Human regulatory B cells control the TFH cell response. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(1):215-22.
61. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production. *Nat Med.* 2014;20(11):1334-9.
62. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 2012;491(7423):264-8.
63. Yehudai D, Snir A, Peri R, Halasz K, Haj T, Odeh M, et al. B cell-activating factor enhances interleukin-6 and interleukin-10 production by ODN-activated human B cells. *Scand J Immunol.* 2012;76(4):371-7.
64. Hua C, Audo R, Yeremenko N, Baeten D, Hahne M, Combe B, et al. A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells. *J Autoimmun.* 2016;73:64-72.
65. Neves P, Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Stervbo U, Shen P, et al. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity.* 2010;33(5):777-90.
66. Zhang Y, Gallastegui N, Rosenblatt JD. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int Immunol.* 2015;27(10):521-30.
67. Han S, Feng S, Ren M, Ma E, Wang X, Xu L, et al. Glioma cell-derived placental growth factor induces regulatory B cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;57:63-8.
68. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest.* 2017;127(3):772-9.
69. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity.* 2014;41(6):1040-51.
70. Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol.* 2010;185(4):2240-52.
71. Griffin DO, Rothstein TL. Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. *Mol Med.* 2012;18:1003-8.
72. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol.* 2007;178(12):7868-78.
73. Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol.* 2009;182(6):3492-502.
74. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med.* 2013;5(173):173ra23.
75. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007;26(5):579-91.
76. Lotz M, Ranheim E, Kipps TJ. Transforming growth factor beta as endogenous growth inhibitor of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med.* 1994;179(3):999-1004.

77. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2001;167(2):1081-9.
78. Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, et al. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev.* 2012;11(9):670-7.
79. Shen Y, Schlessinger K, Zhu X, Meffre E, Quimby F, Levy DE, et al. Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2004;24(1):407-19.
80. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med.* 2014;20(6):633-41.
81. Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, Acosta-Rodriguez EV, Amezcua-Vesely MC, Sather BD, et al. Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORgammat and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol.* 2013;14(5):514-22.
82. Jahrsdorfer B, Blackwell SE, Wooldridge JE, Huang J, Andreski MW, Jacobus LS, et al. B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood.* 2006;108(8):2712-9. Epub 2006/07/01.
83. Papp G, Gyimesi E, Szabo K, Zold E, Zeher M. Increased IL-21 Expression Induces Granzyme B in Peripheral CD5(+) B Cells as a Potential Counter-Regulatory Effect in Primary Sjogren's Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:4328372.
84. Xu L, Liu X, Liu H, Zhu L, Zhu H, Zhang J, et al. Impairment of Granzyme B-Producing Regulatory B Cells Correlates with Exacerbated Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2017;8:768.
85. Kojima Y, Tsurumi H, Goto N, Shimizu M, Kasahara S, Yamada T, et al. Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome. *Eur J Haematol.* 2006;76(6):465-72.
86. Tinhofer I, Marschitz I, Kos M, Henn T, Egle A, Villunger A, et al. Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand+ tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1998;91(11):4273-81.
87. Lundy SK, Fox DA. Reduced Fas ligand-expressing splenic CD5+ B lymphocytes in severe collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(4):R128.
88. Secchiero P, Tiribelli M, Barbarotto E, Celeghini C, Michelutti A, Masolini P, et al. Aberrant expression of TRAIL in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *J Cell Physiol.* 2005;205(2):246-52.
89. Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun.* 2015;6:5997.
90. Nouel A, Pochard P, Simon Q, Segalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun.* 2015;59:53-60.
91. Heinemann K, Wilde B, Hoerning A, Tebbe B, Kribben A, Witzke O, et al. Decreased IL-10(+) regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scand J Rheumatol.* 2016;45(4):312-6.
92. Daien CI, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, et al. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(8):2037-46. Epub 2014/04/15.

93. van der Vlugt LE, Mlejnek E, Ozir-Fazalalikhhan A, Janssen Bonas M, Dijksman TR, Labuda LA, et al. CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(4):517-28.
94. Correale J, Farez M, Razzitte G. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol*. 2008;64(2):187-99.
95. Gorosito Serran M, Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Acosta Rodriguez EV, Montes CL, Gruppi A. The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. *FEBS Lett*. 2015;589(22):3362-9.
96. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, Demarais PM, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro. *J Leukoc Biol*. 2013;93(5):811-8.
97. Liu Y, Cheng LS, Wu SD, Wang SQ, Li L, She WM, et al. IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(11):907-19.
98. He Y, Qian H, Liu Y, Duan L, Li Y, Shi G. The roles of regulatory B cells in cancer. *J Immunol Res*. 2014;2014:215471. Epub 2014/07/06.
99. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*. 2009;69(13):5522-30. Epub 2009/06/11.
100. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;372(4):311-9.
101. Horikawa M, Minard-Colin V, Matsushita T, Tedder TF. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4268-80.
102. DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia*. 2013;27(1):170-82.
103. Chiorazzi N, Hatzi K, Albesiano E. B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1062:1-12.
104. Nabhan C, Rosen ST. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review. *JAMA*. 2014;312(21):2265-76.
105. Molica S. Progression and survival studies in early chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1991;78(4):895-9.
106. Letestu R, Levy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*. 2010;116(22):4588-90.
107. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.
108. Gladstone DE, Swinnen L, Kasamon Y, Blackford A, Gocke CD, Griffin CA, et al. Importance of immunoglobulin heavy chain variable region mutational status in del(13q) chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(10):1873-81.
109. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
110. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714-26.

111. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525-30.
112. Lazarian G, Guieze R, Wu CJ. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):984-93.
113. Cheng S, Guo A, Lu P, Ma J, Coleman M, Wang YL. Functional characterization of BTK(C481S) mutation that confers ibrutinib resistance: exploration of alternative kinase inhibitors. *Leukemia*. 2015;29(4):895-900.
114. Liu TM, Woyach JA, Zhong Y, Lozanski A, Lozanski G, Dong S, et al. Hypermorphic mutation of phospholipase C, gamma2 acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. *Blood*. 2015;126(1):61-8. Epub 2015/05/15.
115. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003;101(12):4944-51. Epub 2003/02/22.
116. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1923-30.
117. Patten PE, Buggins AG, Richards J, Wotherspoon A, Salisbury J, Mufti GJ, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 2008;111(10):5173-81.
118. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. 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*. 2002;99(3):1023-9.
119. Woyach JA, Johnson AJ. Targeted therapies in CLL: mechanisms of resistance and strategies for management. *Blood*. 2015;126(4):471-7.
120. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:16096.
121. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(1):32-42.
122. Walter HS, Rule SA, Dyer MJ, Karlin L, Jones C, Cazin B, et al. A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. *Blood*. 2016;127(4):411-9.
123. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):768-78.
124. Turtle CJ, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Cherian S, Chen X, et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *J Clin Oncol*. 2017;35(26):3010-20.
125. McClanahan F, Hanna B, Miller S, Clear AJ, Lichter P, Gribben JG, et al. PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(2):203-11.
126. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(2):246-59.
127. Garcia-Munoz R, Llorente L. Chronic lymphocytic leukaemia: could immunological tolerance mechanisms be the origin of lymphoid neoplasms? *Immunology*. 2014;142(4):536-50.

128. Duhren-von Minden M, Ubelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012;489(7415):309-12.
129. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008;112(1):188-95. Epub 2008/02/23.
130. Marklin M, Heitmann JS, Fuchs AR, Truckenmuller FM, Gutknecht M, Bugl S, et al. NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 2017;8(1):755.
131. Alhakeem SS, Sindhava VJ, McKenna MK, Gachuki BW, Byrd JC, Muthusamy N, et al. Role of B cell receptor signaling in IL-10 production by normal and malignant B-1 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1362:239-49.
132. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998;91(7):2387-96.
133. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, Marolleau JP. A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. *PLoS One*. 2013;8(3):e60370. Epub 2013/04/05.
134. Yan XJ, Dozmorov I, Li W, Yancopoulos S, Sison C, Centola M, et al. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(19):5201-10. Epub 2011/09/12.
135. Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1403-13.
136. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, et al. 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*. 2005;106(3):1012-20. Epub 2005/04/30.
137. Choi MY, Kashyap MK, Kumar D. The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2016;29(1):40-53.
138. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*. 2008;264(6):549-62.
139. Seke Etet PF, Vecchio L, Nwabo Kamdje AH. Interactions between bone marrow stromal microenvironment and B-chronic lymphocytic leukemia cells: any role for Notch, Wnt and Hh signaling pathways? *Cell Signal*. 2012;24(7):1433-43.
140. Patel V, Chen LS, Wierda WG, Balakrishnan K, Gandhi V. Impact of bone marrow stromal cells on Bcl-2 family members in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(4):899-910.
141. Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest*. 2007;117(1):112-21.
142. Packham G, Krysov S, Allen A, Savelyeva N, Steele AJ, Forconi F, et al. The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica*. 2014;99(7):1138-48.
143. Oakes CC, Seifert M, Assenov Y, Gu L, Przekopowicz M, Ruppert AS, et al. DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2016;48(3):253-64.
144. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic

- leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res.* 2006;66(14):7158-66. Epub 2006/07/20.
145. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;120(2):356-65.
146. Saint-Georges S, Quettier M, Bouyaba M, Le Coquil S, Lauriente V, Guittat L, et al. Protein kinase D-dependent CXCR4 down-regulation upon BCR triggering is linked to lymphadenopathy in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget.* 2016;7(27):41031-46.
147. Chatzouli M, Ntoufa S, Papakonstantinou N, Chartomatsidou E, Anagnostopoulos A, Kollia P, et al. Heterogeneous functional effects of concomitant B cell receptor and TLR stimulation in chronic lymphocytic leukemia with mutated versus unmutated Ig genes. *J Immunol.* 2014;192(10):4518-24.
148. Perez-Chacon G, Vargas JA, Jorda J, Alvarez N, Martin-Donaire T, Rosado S, et al. CD5 does not regulate the signaling triggered through BCR in B cells from a subset of B-CLL patients. *Leuk Lymphoma.* 2007;48(1):147-57. Epub 2007/02/28.
149. Perez-Chacon G, Vargas JA, Jorda J, Morado M, Rosado S, Martin-Donaire T, et al. CD5 provides viability signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC. *Leuk Res.* 2007;31(2):183-93. Epub 2006/05/27.
150. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, et al. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol.* 2011;186(8):4835-44.
151. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 1986;324(6092):73-6.
152. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol.* 2010;40(7):1830-5.
153. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther.* 2014;141(2):125-39.
154. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1227-36. Epub 2012/11/09.
155. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2012;122(4):143-59.
156. Rose-John S. The Soluble Interleukin 6 Receptor: Advanced Therapeutic Options in Inflammation. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(4):591-8.
157. Eulenfeld R, Dittrich A, Khouri C, Muller PJ, Mutze B, Wolf A, et al. Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(6-7):486-95.
158. Hillion S, Garaud S, Devauchelle V, Bordron A, Berthou C, Youinou P, et al. Interleukin-6 is responsible for aberrant B-cell receptor-mediated regulation of RAG expression in systemic lupus erythematosus. *Immunology.* 2007;122(3):371-80.
159. Dumoitier N, Chaigne B, Regent A, Lofek S, Mhibik M, Dorfmueller P, et al. Scleroderma Peripheral B Lymphocytes Secrete Interleukin-6 and Transforming Growth Factor beta and Activate Fibroblasts. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(5):1078-89.
160. Scala G, Quinto I, Ruocco MR, Arcucci A, Mallardo M, Caretto P, et al. Expression of an exogenous interleukin 6 gene in human Epstein Barr virus B cells confers growth advantage and in vivo tumorigenicity. *J Exp Med.* 1990;172(1):61-8.
161. Nacinovic-Duletic A, Stifter S, Dvornik S, Skunca Z, Jonjic N. Correlation of serum IL-6, IL-8 and IL-10 levels with clinicopathological features and prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *International journal of laboratory hematology.* 2008;30(3):230-9. Epub 2008/05/16.

162. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*. 2001;97(1):256-63.
163. Baran-Marszak F, Boukhiar M, Harel S, Laguillier C, Roger C, Gressin R, et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2010;95(11):1865-72.
164. Tupitsyn N, Kadagidze Z, Gaillard JP, Sholokhova E, Andreeva L, Liautard J, et al. Functional interaction of the gp80 and gp130 IL-6 receptors in human B cell malignancies. *Clinical and laboratory haematology*. 1998;20(6):345-52. Epub 1999/02/10.
165. Liu FT, Jia L, Wang P, Farren T, Li H, Hao X, et al. CD126 and Targeted Therapy with Tocilizumab in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2016;22(10):2462-9.
166. Mihara M, Kasutani K, Okazaki M, Nakamura A, Kawai S, Sugimoto M, et al. Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(12):1731-40.
167. Shima Y, Kuwahara Y, Murota H, Kitaba S, Kawai M, Hirano T, et al. The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(12):2408-12.
168. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008;226:205-18.
169. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170(6):2081-95.
170. Gabrysova L, Howes A, Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 expression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:157-90.
171. Groux H, Cottrez F. The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *J Autoimmun*. 2003;20(4):281-5.
172. Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16(3):283-8.
173. Emmerich J, Mumm JB, Chan IH, LaFace D, Truong H, McClanahan T, et al. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Res*. 2012;72(14):3570-81.
174. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015;367(2):103-7.
175. Beguelin W, Sawh S, Chambwe N, Chan FC, Jiang Y, Choo JW, et al. IL10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs. *Leukemia*. 2015;29(8):1684-94.
176. Tangye SG, Weston KM, Raison RL. Interleukin-10 inhibits the in vitro proliferation of human activated leukemic CD5+ B-cells. *Leuk Lymphoma*. 1998;31(1-2):121-30.
177. Kitabayashi A, Hirokawa M, Miura AB. The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death. *Int J Hematol*. 1995;62(2):99-106.
178. Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood*. 2015;126(5):573-81.
179. Drennan S, D'Avola A, Gao Y, Weigel C, Chrysostomou E, Steele AJ, et al. 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*. 2017;31(8):1686-94.
180. Roberti ML, Ricottini L, Capponi A, Sclauzero E, Vicenti P, Fiorentini E, et al. Immunomodulating treatment with low dose interleukin-4, interleukin-10 and interleukin-11 in psoriasis vulgaris. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014;28(1):133-9.

181. Huhn RD, Radwanski E, Gallo J, Affrime MB, Sabo R, Gonyo G, et al. Pharmacodynamics of subcutaneous recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62(2):171-80.
182. Vicari AP, Chiodoni C, Vaure C, Ait-Yahia S, Dercamp C, Matsos F, et al. Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J Exp Med.* 2002;196(4):541-9.
183. Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem.* 2000;275(17):12848-56.
184. Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol.* 2003;4(6):551-6.
185. Ahmed ST, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *J Immunol.* 2000;165(9):5227-37.
186. Burdin N, Van Kooten C, Galibert L, Abrams JS, Wijdenes J, Banchereau J, et al. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol.* 1995;154(6):2533-44.
187. Terai M, Eto M, Young GD, Berd D, Mastrangelo MJ, Tamura Y, et al. Interleukin 6 mediates production of interleukin 10 in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(2):145-55.
188. Braun DA, Fribourg M, Sealson SC. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. *J Biol Chem.* 2013;288(5):2986-93. Epub 2012/11/21.
189. Wang H, Lafdil F, Kong X, Gao B. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int J Biol Sci.* 2011;7(5):536-50.
190. Buchta CM, Bishop GA. Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms. *Immunol Res.* 2014;59(1-3):12-22.
191. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511.
192. Muzio M, Fonte E, Caligaris-Cappio F. Toll-like Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012055.
193. Rybka J, Butrym A, Wrobel T, Jazwiec B, Bogucka-Fedorczuk A, Poreba R, et al. The Expression of Toll-Like Receptors in Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016;64(Suppl 1):147-50.
194. Mansouri L, Papakonstantinou N, Ntoufa S, Stamatopoulos K, Rosenquist R. NF-kappaB activation in chronic lymphocytic leukemia: A point of convergence of external triggers and intrinsic lesions. *Semin Cancer Biol.* 2016;39:40-8.
195. Kondo K, Shaim H, Thompson PA, Burger JA, Keating M, Estrov Z, et al. Ibrutinib modulates the immunosuppressive CLL microenvironment through STAT3-mediated suppression of regulatory B-cell function and inhibition of the PD-1/PD-L1 pathway. *Leukemia.* 2017.
196. Rozovski U, Wu JY, Harris DM, Liu Z, Li P, Hazan-Halevy I, et al. Stimulation of the B-cell receptor activates the JAK2/STAT3 signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2014;123(24):3797-802.
197. Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Jain P, Veletic I, et al. Activation of the B-cell receptor successively activates NF-kappaB and STAT3 in chronic lymphocytic leukemia cells. *Int J Cancer.* 2017;141(10):2076-81.
198. Saulep-Easton D, Vincent FB, Quah PS, Wei A, Ting SB, Croce CM, et al. The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. *Leukemia.* 2016;30(1):163-72.

199. Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood*. 2002;100(13):4537-43.
200. Garaud S, Taher TE, Debant M, Burgos M, Melayah S, Berthou C, et al. CD5 expression promotes IL-10 production through activation of the MAPK/Erk pathway and upregulation of TRPC1 channels in B lymphocytes. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(2):158-70.
201. Shaim H, Estrov Z, Harris D, Hernandez Sanabria M, Liu Z, Ruvolo P, et al. The CXCR4-STAT3-IL-10 Pathway Controls the Immunoregulatory Function of Chronic Lymphocytic Leukemia and Is Modulated by Lenalidomide. *Front Immunol*. 2017;8:1773.
202. Verma R, Balakrishnan L, Sharma K, Khan AA, Advani J, Gowda H, et al. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J Cell Commun Signal*. 2016;10(1):61-7.
203. Yuan J, Zhang F, Niu R. Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer. *Sci Rep*. 2015;5:17663.
204. Ataie-Kachoei P, Pourgholami MH, Richardson DR, Morris DL. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *Journal of clinical pathology*. 2014;67(11):932-7. Epub 2014/07/18.
205. Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, Dewilde S, Strobl B, Fu X, et al. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol*. 2004;5(4):401-9.
206. Kaptein A, Paillard V, Saunders M. Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J Biol Chem*. 1996;271(11):5961-4.
207. Hazan-Halevy I, Harris D, Liu Z, Liu J, Li P, Chen X, et al. STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood*. 2010;115(14):2852-63.
208. Hirai H, Karian P, Kikyo N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *The Biochemical journal*. 2011;438(1):11-23. Epub 2011/07/29.
209. Capron C, Jondeau K, Casetti L, Jalbert V, Costa C, Verhoeyen E, et al. Viability and stress protection of chronic lymphoid leukemia cells involves overactivation of mitochondrial phosphoSTAT3Ser727. *Cell death & disease*. 2014;5:e1451. Epub 2014/10/10.
210. Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND, Strege AK, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia*. 2005;19(4):513-23.
211. Liu FT, Jia L, Wang P, Wang H, Farren TW, Agrawal SG. STAT3 and NF-kappaB cooperatively control in vitro spontaneous apoptosis and poor chemo-responsiveness in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(22):32031-45.
212. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, et al. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1171:59-76.
213. Lee H, Zhang P, Herrmann A, Yang C, Xin H, Wang Z, et al. Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(20):7765-9.
214. Ding Y, Chen D, Tarcsafalvi A, Su R, Qin L, Bromberg JS. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J Immunol*. 2003;170(3):1383-91.
215. Lu K, Fang XS, Feng LL, Jiang YJ, Zhou XX, Liu X, et al. The STAT3 inhibitor WP1066 reverses the resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to histone deacetylase inhibitors induced by interleukin-6. *Cancer Lett*. 2015;359(2):250-8.
216. Doshi UA, Shaw J, Fox TE, Claxton DF, Loughran TP, Kester M. STAT3 mediates C6-ceramide-induced cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17051.

217. Hong D, Kurzrock R, Kim Y, Woessner R, Younes A, Nemunaitis J, et al. AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of clinical activity in lymphoma and lung cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(314):314ra185.
218. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):900-11. Epub 2003/12/12.
219. Buggins AG, Patten PE, Richards J, Thomas NS, Mufti GJ, Devereux S. Tumor-derived IL-6 may contribute to the immunological defect in CLL. *Leukemia*. 2008;22(5):1084-7.
220. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054-61.
221. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309-22.
222. Hossain DM, Panda AK, Manna A, Mohanty S, Bhattacharjee P, Bhattacharyya S, et al. FoxP3 acts as a cotranscription factor with STAT3 in tumor-induced regulatory T cells. *Immunity*. 2013;39(6):1057-69.
223. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*. 2007;282(13):9358-63.
224. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(1):41-51.
225. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. 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*. 1997;100(12):3140-8.
226. Levidou G, Sachanas S, Pangalis GA, Kalpadakis C, Yiakoumis X, Moschogiannis M, et al. Immunohistochemical analysis of IL-6, IL-8/CXCR2 axis, Tyr p-STAT-3, and SOCS-3 in lymph nodes from patients with chronic lymphocytic leukemia: correlation between microvascular characteristics and prognostic significance. *Biomed Res Int*. 2014;2014:251479.
227. Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Jain P, Veletic I, et al. Constitutive Phosphorylation of STAT3 by the CK2-BLNK-CD5 Complex. *Mol Cancer Res*. 2017;15(5):610-8.
228. Li P, Harris D, Liu Z, Rozovski U, Ferrajoli A, Wang Y, et al. STAT3-activated GM-CSFRalpha translocates to the nucleus and protects CLL cells from apoptosis. *Mol Cancer Res*. 2014;12(9):1267-82.
229. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev*. 2007;21(11):1396-408.
230. de Toter D, Meazza R, Zupo S, Cutrona G, Matis S, Colombo M, et al. Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2006;107(9):3708-15.
231. Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Wu JY, Grgurevic S, et al. At High Levels, Constitutively Activated STAT3 Induces Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *J Immunol*. 2016;196(10):4400-9.
232. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145-62.
233. Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(6):431-8. Epub 2010/10/27.
234. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194(11):1639-47.

235. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194(11):1625-38.
236. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17008. Epub 2017/02/09.
237. Taylor JG, Gribben JG. Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects. *Semin Cancer Biol*. 2015;34:36-45. Epub 2015/07/29.
238. Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J, Wasik E. T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia--the three-color flow cytometry analysis. *Leuk Res*. 2002;26(7):657-60.
239. Jitschin R, Braun M, Büttner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood*. 2014;124(5):750-60. Epub 2014/05/21.
240. Inoue S, Mai A, Dyer MJ, Cohen GM. Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2006;66(13):6785-92.
241. Noh J, Choi WS, Noh G, Lee JH. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune Netw*. 2010;10(6):247-9.
242. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-40. Epub 2010/01/14.
243. Drennan S, D'Avola A, Gao Y, Weigel C, Chrysostomou E, Steele AJ, et al. 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*. 2017. Epub 2017/01/03.
244. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):34-46. Epub 2010/12/10.
245. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. 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*. 2011;186(10):5569-79. Epub 2011/04/04.
246. Shalapour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*. 2015;521(7550):94-8. Epub 2015/04/29.
247. Hagn M, Blackwell SE, Beyer T, Ebel V, Fabricius D, Lindner S, et al. B-CLL cells acquire APC- and CTL-like phenotypic characteristics after stimulation with CpG ODN and IL-21. *Int Immunol*. 2014;26(7):383-95. Epub 2014/02/04.
248. Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun*. 2015;59:53-60. Epub 2015/03/07.
249. Hamblin TJ, Oscier DG. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev*. 1997;11(3):119-28.
250. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J Exp Med*. 2011;208(1):67-80. Epub 2011/01/10.
251. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:841-94.

252. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* 2013;73(8):2468-79. Epub 2013/02/05.
253. Parekh VV, Prasad DV, Banerjee PP, Joshi BN, Kumar A, Mishra GC. 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.* 2003;170(12):5897-911.
254. Jak M, Mous R, Remmerswaal EB, Spijker R, Jaspers A, Yagüe A, et al. Enhanced formation and survival of CD4+ CD25hi Foxp3+ T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(5):788-801.
255. Vadasz Z, Peri R, Eiza N, Slobodin G, Balbir-Gurman A, Toubi E. The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *J Immunol Res.* 2015;2015:254245. Epub 2015/10/04.
256. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun.* 2011;36(3-4):228-38.
257. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, Carter CR, Davison A, Hernandez-Fuentes M, et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(7):1575-85. Epub 2014/03/07.
258. Larsen M, Arnaud L, Hié M, Parizot C, Dorgham K, Shoukry M, et al. 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.* 2011;41(9):2596-605. Epub 2011/08/04.
259. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111(12):5446-56. Epub 2008/01/23.
260. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26 Suppl 5:v78-84.
261. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005;115(3):755-64.
262. Kay NE, Shanafelt TD, Strega AK, Lee YK, Bone ND, Raza A. Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch". *Leuk Res.* 2007;31(7):899-906. Epub 2007/01/22.
263. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol.* 2014;24:71-81. Epub 2013/09/07.
264. Hanna BS, McClanahan F, Yazdanparast H, Zaborsky N, Kalter V, Rößner PM, et al. Depletion of CLL-associated patrolling monocytes and macrophages controls disease development and repairs immune dysfunction in vivo. *Leukemia.* 2016;30(3):570-9. Epub 2015/11/02.
265. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, Vallario A, Camporeale A, Granziero L, et al. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;294:135-45.
266. Schröttner P, Leick M, Burger M. The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact. *Ann Hematol.* 2010;89(5):437-46. Epub 2009/12/18.

267. Bomstein Y, Yuklea M, Radnay J, Shapiro H, Afanasyev F, Yarkoni S, et al. The antiapoptotic effects of blood constituents in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol.* 2003;70(5):290-5.
268. Wickremasinghe RG, Ganeshaguru K, Jones DT, Lindsay C, Spanswick VJ, Hartley JA, et al. Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2001;114(3):608-15.
269. Liu FT, Jia L, Wang P, Wang H, Farren TW, Agrawal SG. STAT3 and NF- κ B cooperatively control in vitro spontaneous apoptosis and poor chemo-responsiveness in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(22):32031-45.
270. Valle Oseguera CA, Spencer JV. *cmvIL-10* stimulates the invasive potential of MDA-MB-231 breast cancer cells. *PLoS One.* 2014;9(2):e88708. Epub 2014/02/10.
271. Baran-Marszak F, Magdoud H, Desterke C, Alvarado A, Roger C, Harel S, et al. Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010;116(26):5961-71.
272. Liu FT, Giustiniani J, Farren T, Jia L, Bensussan A, Gribben JG, et al. CD160 signaling mediates PI3K-dependent survival and growth signals in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2010;115(15):3079-88. Epub 2010/02/17.
273. Lam LT, Wright G, Davis RE, Lenz G, Farinha P, Dang L, et al. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2008;111(7):3701-13. Epub 2007/12/26.
274. Baran-Marszak F, Boukhiar M, Harel S, Laguillier C, Roger C, Gressin R, et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica-the Hematology Journal.* 2010;95(11):1865-72.
275. Coppo P, Gouilleux-Gruart V, Huang Y, Bouhlal H, Bouamar H, Bouchet S, et al. STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Leukemia.* 2009;23(9):1667-78. Epub 2009/05/07.
276. Balkwill F, Montfort A, Capasso M. B regulatory cells in cancer. *Trends Immunol.* 2013;34(4):169-73. Epub 2012/12/01.
277. Pang N, Zhang R, Li J, Zhang Z, Yuan H, Chen G, et al. Increased IL-10/IL-17 ratio is aggravated along with the prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int Immunopharmacol.* 2016;40:57-64. Epub 2016/08/29.
278. Lee BR, Kwon BE, Hong EH, Shim A, Song JH, Kim HM, et al. Interleukin-10 attenuates tumour growth by inhibiting interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 signalling in myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Lett.* 2016;381(1):156-64. Epub 2016/07/16.
279. García-Muñoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann Hematol.* 2012;91(7):981-96. Epub 2012/04/12.
280. Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Jain P, Veletic I, et al. Activation of the B-cell receptor successively activates NF- κ B and STAT3 in chronic lymphocytic leukemia cells. *Int J Cancer.* 2017;141(10):2076-81. Epub 2017/08/04.
281. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science.* 2009;326(5955):986-91.
282. Niemann CU, Herman SE, Maric I, Gomez-Rodriguez J, Biancotto A, Chang BY, et al. Disruption of in vivo Chronic Lymphocytic Leukemia Tumor-Microenvironment Interactions by Ibrutinib--Findings from an Investigator-Initiated Phase II Study. *Clin Cancer Res.* 2016;22(7):1572-82.

283. Lech-Maranda E, Grzybowska-Izydorczyk O, Wyka K, Mlynarski W, Borowiec M, Antosik K, et al. 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)*. 2012;60(6):477-86.
284. Yoon JY, Lafarge S, Dawe D, Lakhi S, Kumar R, Morales C, et al. Association of interleukin-6 and interleukin-8 with poor prognosis in elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(9):1735-42.
285. Li Y, Shi Y, McCaw L, Li YJ, Zhu F, Gorczynski R, et al. Microenvironmental interleukin-6 suppresses toll-like receptor signaling in human leukemia cells through miR-17/19A. *Blood*. 2015;126(6):766-78. Epub 2015/06/05.
286. Rozovski U, Hazan-Halevy I, Barzilai M, Keating MJ, Estrov Z. Metabolism pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(4):758-65.
287. Coscia M, Pantaleoni F, Riganti C, Vitale C, Rigoni M, Peola S, et al. IGHV unmutated CLL B cells are more prone to spontaneous apoptosis and subject to environmental prosurvival signals than mutated CLL B cells. *Leukemia*. 2011;25(5):828-37.

Résumé :

Les lymphocytes B régulent la réponse immunitaire par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires ou immunosuppresseurs. Dans la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC), une sous-population de lymphocytes B CD5⁺ présente des propriétés immunosuppressives qui l'apparente aux lymphocytes B régulateurs notamment par la production d'IL-10. La survie des cellules leucémiques est, elle, associée à la réponse antigénique et à la production de cytokines dont l'IL-6. L'objectif de ce travail a été de caractériser dans la pathologie les populations produisant les cytokines pro-survie ou immunorégulatrices et d'analyser la relevance fonctionnelle de leur sécrétion. Nous avons identifié des sous-populations de cellules B leucémiques exprimant trois facteurs immunorégulateurs l'IL-10, le TGFβ1 et pour la première fois le facteur de transcription FOXP3. La proportion augmentée de cellules exprimant l'IL10 est associée à une diminution des cellules exprimant l'IL6. De manière importante, ce travail a identifié une boucle autocrine de stimulation de l'activité métabolique des cellules par l'IL10. La cytokine en se fixant à son récepteur permet l'activation des facteurs STAT3 et induit l'expression à la fois de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl2 mais surtout sa propre expression. Un blocage de cette boucle au niveau du récepteur à l'IL10 suspend l'avantage de survie des cellules tumorales. L'IL-6 ne déclenche pas ces mécanismes de maintien des cellules de LLC. Ce travail montre qu'en plus de son rôle sur les cellules du microenvironnement tumoral, l'IL-10 participe au maintien autocrine de la sous-population immunorégulatrice dans la LLC.

Mots clés : Leucémie Lymphoïde Chronique, Lymphocytes B, Cytokines, IL-10, B régulateurs, STAT3, Régulation autocrine, Survie cellulaire, FOXP3

Abstract :

B cells produce pro-inflammatory or immunosuppressive factors to modulate the immune response. In Chronic lymphocytic leukemia (CLL), a subset of the tumor lymphocytes produces IL10 and share immunoregulatory functions with regulatory B cells. CLL cells survival is driven by antigenic response and pro-survival cytokines such as IL6. This project aimed at deciphering the cytokines profile of CLL subsets and analyzing their functional relevance. We identified immunoregulatory subsets producing IL-10, TGFβ1 and for the first time FOXP3. In patients, the increased proportion of cells expressing IL10 was correlated with decrease in IL6⁺ cells. Importantly we described an autocrine survival loop driven by IL10 in these cells. IL10 triggering led to STAT3 activation, induction of active pro-survival factors altogether with *IL10* self-induction. Interrupting this loop with a blocking ab against IL10R prevented survival of the cells. IL6 did not manage such mechanisms. In conclusion, this work demonstrates that IL10 is an important mediator in CLL; the cytokine alters immune recognition of the tumor cells and sustains leukemic cells survival *via* the autocrine loop.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia, B lymphocytes, Cytokines, IL-10, STAT3, Bregs, Autocrine regulation, Cell survival, FOXP3