

UNIVERSITE PARIS XIII –SORBONNE PARIS NORD

École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée

THÈSE DE DOCTORAT

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR en Biologie cellulaire et moléculaire

présentée et soutenue publiquement par :

AIT BELKACEM Koceïla Massinissa

Le 21 Octobre 2022

**Hétérogénéité fonctionnelle des sous-populations immunorégulatrices
impliquées dans la progression de la leucémie lymphoïde chronique**

INSERM U978 : Signalisation, microenvironnement et hémopathies lymphoïdes B

MEMBRES DU JURY :

Pr. Natacha BESSIS	Présidente du jury
Dr. Vincenzo DI BARTOLO	Rapporteur
Dr. Bertrand DUBOIS	Rapporteur
Dr. Valérie AUTIER	Examinatrice
Dr. Nicolas DARD	Examineur
Dr. Nadine VARIN-BLANK	Directrice de thèse

Remerciements :

Je tiens à exprimer en tout premier lieu ma reconnaissance aux membres du jury : Au **Pr Natacha BESSIS** d'avoir accepté d'examiner ma thèse et de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Recevez madame le Professeur, toute mon estime et mes plus sincères remerciements.

Aux rapporteurs : Le **Dr Vincenzo DI BARTOLO** et le **Dr. Bertrand DUBOIS** , examinatrice : **Dr. Valérie AUTIER** et examinateur **Dr. Nicolas DARD** pour m'avoir fait l'honneur de siéger au sein du jury. Je vous suis reconnaissant pour votre disponibilité et d'avoir accepté d'évaluer mon travail, d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit et d'y apporter un nouveau regard critique. Veuillez recevoir l'expression de mes sincères remerciements.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse **Dr. Nadine VARIN-BLANK**. Je te remercie pour avoir cru en moi et de m'avoir accordé toute ta confiance pendant ces 4 années de thèse. Merci de m'avoir transmis ta passion pour la recherche et pour l'autonomie que tu m'as laissée durant ce travail. Merci également pour la bienveillance que tu as témoigné à mon égard, et pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans des conditions favorables. Sois assurée d'avoir formé un futur chercheur avec beaucoup de perspectives pour l'avenir.

Tous mes travaux ont été réalisés au sein de U978, je tiens donc à adresser mes plus sincères remerciements à tous **les chercheurs de l'unité**, qui ont, chacun imprégné ma thèse à leur manière.

Un remerciement particulier au **groupe " pause-café ? "** pour tous les bons moments passés ensemble, sans vous ma thèse n'aurait sans doute pas eu le même goût ! bon courage à tous pour l'avenir.

A mes parents, merci pour votre soutien depuis toujours. Merci à toi **Maman**, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur pour ton dévouement sans limite. A toi **Papa** pour ton implication et ton aide dans ma scolarité depuis mon plus jeune âge et pour m'avoir toujours offert soutien et réconfort. Vous m'avez donné la vie et l'envie de vivre, la distance ne changera jamais ce lien qui nous unit.

A **Maya** ma Sister et **Amine** mon Brother, je peux dire que j'ai de la chance de vous avoir, merci d'avoir toujours chouchouté votre petit frère adoré, je ferai tout pour être le meilleur des oncles pour vos petites choupinettes

A tous les membres de ma **famille**, à mes **amis** que je n'ai pas pu citer, je vous remercie de m'avoir toujours encouragé et participé à mon équilibre.

Enfin, je ne pourrais clôturer ce chapitre sans exprimer mes plus profonds remerciements aux **patients** atteints de LLC, à leurs médecins associés (**Florence Cymbalista** et **Vincent LEVY**) et aux **donateurs** de l'EFS Saint-Louis.

Table des Matières

Liste des abreviations	6
Introduction	10
Chapitre 1 : La leucémie lymphoïde chronique.....	10
1. Définition :.....	10
2. Épidémiologie :.....	10
3. Manifestations cliniques :.....	11
4. Diagnostic de la LLC :.....	12
5. Évolution de la maladie :	14
6. Les facteurs pronostiques :.....	15
6.1. Les aberrations caryotypiques.....	16
6.1.1. La délétion 13q14 :.....	16
6.1.2. La délétion 11 (q22q23)	16
6.1.3. La trisomie 12 :.....	16
6.1.4. La délétion 17p13 :.....	17
6.2. Statut mutationnel du segment variable du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines : 17	
6.3. Marqueurs immunophénotypiques :.....	18
6.4. Anomalies moléculaires :.....	19
6.5. Marqueurs sériques :.....	19
7. Les traitements :	19
Chapitre 2 : Immunosurveillance anti-tumorale	21
1. LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-TUMORALE :.....	21
1.1. Phase d'élimination :	22
1.2. Phase d'équilibre :.....	24
1.3. Phase d'échappement :.....	24
2. ECHAPPEMENT TUMORAL A L'IMMUNOSURVEILLANCE	25
2.1. Présentation dérégulée des antigènes par les cellules tumorales :	25
2.2. Défaut de présentation antigénique par les cellules dendritiques :	25
2.3. Échappement dépendant des points de contrôle immunitaire (immune-checkpoint) :.....	26
3. Implication du microenvironnement tumoral (MET):.....	28
4. Lymphocytes B régulateurs :.....	29
4.1. Historique et découverte :	29
4.2. Voies d'induction de la capacité régulatrice des Bregs :.....	32
4.2.1. Signallisation via CD40 :.....	32
4.2.2. Signalisation du BCR :.....	32
4.2.3. Implication des TLR :	34
4.3. Mécanismes d'action des LB régulateurs :	34
4.3.1. IL10 :	34
4.3.2. TGFβ :.....	35
4.3.3. Granzyme B :	36
4.3.4. IL35 :	36
4.3.5. Foxp3 :	37
4.3.6. IDO1 :.....	37
4.4. Immunosurveillance dans la LLC :.....	37
4.4.1. Mécanismes de prolifération et de survie :.....	37

4.4.2.	Rôle des NLC dans la LLC :	39
4.4.3.	Rôle des Bregs dans la LLC :	39
Chapitre 3 :	L'enzyme immunorégulatrice Indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO)	40
1.	Introduction :	40
2.	La voie du catabolisme du tryptophane :	40
2.1.	Le tryptophane :	40
2.2.	La voie de la kynurénine :	40
3.	Trois dioxygénases pour catalyser la même réaction :	42
3.1.	TDO :	42
3.2.	IDO1 :	42
3.3.	IDO2 :	42
4.	L'indoleamine-2,3-dioxygénase.....	43
4.1.	Le gène IDO	43
4.2.	La protéine IDO	44
4.2.1.	Fonction enzymatique.....	44
4.2.2.	Fonctions de signalisation :.....	45
4.2.2.1.	Signalisation via les motifs inhibiteurs.....	45
4.2.2.2.	Signalisation via AhR.....	46
5.	Expression de IDO :	46
5.1.	Expression constitutive / intrinsèque d'IDO1 :	47
5.2.	Expression inductible / extrinsèque d'IDO1 :	47
6.	Influence sur la réponse immunitaire :	49
6.1.	Expression de IDO dans les CPAs du microenvironnement :	49
6.2.	Impact de IDO sur les lymphocytes Tregs :	49
6.2.1.	La déplétion en tryptophane :	49
6.2.2.	L'accumulation de kynurénine.....	50
7.	Implication de IDO dans les pathologies :	51
7.1.	Pathologies non-infectieuses :	51
7.1.1.	Tolérance fœto-maternelle.....	51
7.1.2.	Transplantation d'organes :	51
7.1.3.	Cancers :	52
7.1.4.	Troubles neurologiques et psychiatriques :	52
7.2.	Pathologies infectieuses	53
OBJECTIFS.....	54
RESULTATS	55
DISCUSSION.....	123
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	135
BIBLIOGRAPHIE.....	137

Table des illustrations :

Tableaux :

Tableau 1 : Critères de classification clinico-biologique de Binet

Tableau 2 : Le Score Matutes

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de la répartition des principales anomalies cytogénétiques

Tableau 4 : Statuts mutationnels du locus IGHV

Tableau 5 : Principaux Bregs décrits dans la littérature

Figures :

Figure 1 : Frottis sanguin montrant de petits lymphocytes de LCC typiquement différenciés associés à une ombre de Gümprrecht (MO X 100)

Figure 2 : Schéma récapitulatif de la théorie de l'immunoediting

Figure 3 : Quelques acteurs majeurs de la réponse immunitaire face à une prolifération tumorale

Figure 4 : Mécanisme d'échappement tumoral par l'intermédiaire d'un immune checkpoint

Figure 5 : Les voies de signalisation en aval du BCR

Figure 6 : La voie des Kynurénines

Figure 7 : Régions régulatrices sur le promoteur du gène IDO1

Figure 8 : Structure cristalline d'IDO1 et du Tryptophane

Figure 9 : Schéma récapitulatif de diverses voies de signalisation médiées par IDO.

Figure 10 : Dialogue bidirectionnel entre la cellule dendritique et le lymphocyte Treg dans la promotion d'un microenvironnement tolérogène

Figure 11 : Impact de la déplétion du tryptophane et de l'enrichissement en Kynurénine sur les lymphocytes T

Figure 12 : Facteurs régulateurs produits par les cellules B-LLC et mécanismes d'action des ligands extracellulaires.

LISTE DES ABREVIATIONS

β2m : Bêta 2 microglobuline
1-MT : 1 Methyl Tryptophane
3-HAA : 3-Hydroxyanthranilic acid
3-HK : 3-Hydroxykynurénine
3HAO : 3-hydroxythranilate-3,4-dioxygénase
5-HT : 5-hydroxytryptamine
AA : Acide aminé
ADN : Acide déoxyribonucléique
Ag : Antigène
AHAI : Anémies Hémolytiques Auto-Immunes
AhR : Aryl hydrocarbure Receptor
AIS : Anti-inflammatoire Stéroïdien
AP-1 : Protéine activatrice 1
APRIL : A Proliferation-Inducing Ligand
ARN : Acide ribonucléique
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
B-LLC : Lymphocytes B de LLC
BAFF : B cell Activating Factor
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BCMA : B-Cell maturation antigen
BCR : B-Cell Receptor
BFA : Brefeldine A
BIRC3 : Baculoviral IAP Repeat Containing 3
BLNK : B-Cell Linker
Breg : Lymphocyte B régulateur
BTK : Burton Tyrosine Kinase
CAR-T : Cellules T porteuses de récepteurs chimériques
CCL : CC-Motif Ligand
CCR : CC-Motif Receptor
CD : Cluster de Différenciation
CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A
CMF : cytométrie en flux
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX : Cyclooxygénase
CPA : cellule présentatrice d'Antigène
CpG : Cytosine Guanine Oligodéoxynucléotide
CSK : C-terminal Src kinase
CSM : Cellules souches mésenchymateuses
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein-4
CXCL : CXC- Motif Ligand

CXCR : CXC- Motif Receptor
DC : dendritic cell
Del : délétion
DLEU2 : Deleted in Lymphocytic Leukemia 2
EAE : Encéphalomyélite Allergique Expérimentale
EBi3 : Epstein-Barr virus induced 3
EBP- β : Enhancer-Binding Protein
FISH : Fluorescence in situ hybridization
FOXP3 : Forkhead Lineage-transcription factor
Fyn : Fyn Proto-oncogene, Src family Tyrosine kinase
GAS : Gamma interferon Activation Sequence
GATA-3 : GATA binding protein 3
GCN2 : General Control Non dépressible 2
GITR : Glucocorticoïd-induced TNF-related protein
GLUT : Glucose Transporter
Hb : Hémoglobine
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HLA : Human Leukocyte Antigen
IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN γ : Interferon gamma
Ig : Immunoglobuline
IGHV : Immunoglobuline Heavy Variable region
IKK : IKappaB kinase
IL : Interleukine
IL-10R : Interleukine 10 receptor
IRF : Interferon Regulatory Factor
ISRE : Interferon Stimulated Response Element
ITAM : Immunoreceptor Tyrosin-based Activating Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
ITSM : Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif
IWCLL : international Workshop on CLL
JAK : Janus Kinase
JNK : C-Jun N-terminal Kinase
K3MO : Kynurenine-3-Mono-Oxygenase
kDA : kilo Dalton
KO : Knock out
KOT : Kynurénine-oxoglutarate transaminase
Kyn : Kynurénine
KYNA : Kynurenic Acid
LAG-3 : Lymphocyte-Activation Gene 3
LBDCG : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules

LCK : Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase
LH : Lymphome hodgkinien
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LPS : Lipopolysaccharide
LTh : Lymphocyte T helper
Lyn : LCK Yes Novel tyrosine kinase
M1/M2 : Macrophage de type 1 / Macrophage de type 2
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MET : Microenvironnement tumoral
miRNA : micro ARN
MMP : Métalloprotéase matricielle
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
MYC : Myelocytomatosis oncogene
NAD : Nicotamine adénine dinucléotide
NF- κ B : Nuclear factor kappa B
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NK : Natural killer
NKG2D : Natural Killer Group 2D
NKT : Natural killer T
NLC : Nurse Like Cells
NMDA : acide N-Méthyl-D-Aspartique
NOTCH1 : Neurogenic locus notch homolog protein
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OXPHOS : oxidative phosphorylation
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PD1 : Programmed Death 1
PDCD1 : Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1 : Programmed Death 1 Ligand
PGE2 : Prostaglandine E2
PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIB : PMA, Ionomycine, Brefeldine A
PKC : protéine Kinase C
PMA : Phorbol 12 Myristate 13-Acetate
RAG-2 : Recombination Activating Gene 2
RAS : Rat Sarcoma
RelB : Oncogene related B
ROR γ : Rétinoïc acid receptor related Orphan Receptor gamma
S1P : Sphingosine 1-Phosphate
SEP : Sclérose En Plaque
SF3B1 : Splicing Factor 3B subunit 1

SH2 : Src Homology 2
SHIP2 : SH2 domain containing inositol polyphosphate 5' phosphatase
Smad : Suppressor of mother against decapentaplegic
SOCS3 : Suppressor of Cytokine Signaling 3
SR : Syndrome de Richter
Src : Src Proto-oncogene, non -receptor tyrosine kinase
STAT : Signal Transducers And Activation of Transcription
Syk : Spleen tyrosine kinase
T-bet : T-box expressed in T cells
TβRI/II/III : TGFβ Receptor I/II/III
TACI : Transmembrane interactor and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
TAK1 : TGFβ activated kinase
TAM : Tumor Associated Macrophages
TAP : Transporter associated with Antigen Processing
TCDD : tétrachlorodibenzo-dioxine
TCR : T Cell Receptor
TDO : Tryptophane 2,3-dioxygenase
Tfh : Cellule T folliculaire helper
TGFβ : Transforming Growth Factor beta
Tim-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin containing protein 3
TK : Thymidine kinase
TLR : Toll like receptor
TNFα : Tumor Necrosis Factor α
TP53 : Tumor Protein 53
Treg : Lymphocyte T régulateur
Trp : Tryptophane
TYK2 : Tyrosine Kinase 2
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
ZAP70 : Zeta-chain Associated Protein kinase of 70 kDa

INTRODUCTION

Mon projet de thèse a porté sur les propriétés immunorégulatrices des lymphocytes B au cours de la progression de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Dans le premier chapitre j'ai décrit dans un premier temps et de façon globale les caractéristiques cliniques et biologiques de la LLC. Le second chapitre a porté sur l'immunosurveillance anti-tumorale, à ce titre j'ai détaillé les acteurs et les mécanismes moléculaires sous-jacents qui participent à cette immunomodulation et plus particulièrement aux facteurs immunorégulateurs produits par les Bregs faisant l'objet d'un premier article auquel j'ai contribué. Mon second article est plus axé sur un facteur régulateur encore peu étudié dans la LLC, l'indoleamine 2,3-dioxygénase. Dans cet objectif, j'ai consacré le dernier chapitre de mon introduction à la description de la structure générale de cette enzyme métabolique, les bases moléculaires de son implication dans diverses pathologies dont le cancer.

CHAPITRE 1 : LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE

1. DEFINITION :

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie lymphoïde de type B caractérisée par une accumulation progressive dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate) de petits lymphocytes B monoclonaux de phénotype mature.

La LLC est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2016) et sur les critères de l'IWCLL 2018 (international Workshop on CLL) comme une hyperlymphocytose supérieure à 5 Giga/L persistant au-delà de 3 mois (Swerdlow et al., 2016)(Hallek et al., 2018)

2. ÉPIDEMIOLOGIE :

La LLC est la leucémie la plus fréquemment observée dans les pays occidentaux, elle représente environ 42% de toutes les leucémies des personnes de plus de 65ans. (Eichhorst et al., 2011). Une différence épidémiologique existe également selon les zones géographiques. En effet, la LLC est fréquente dans les populations caucasiennes alors qu'elle l'est moins dans les populations asiatiques et africaines.

En 2018, le nombre de LLC a été estimé en France métropolitaine de 4674 cas (2770 cas masculins, 59%, contre 1904 cas féminins), l'âge médian au moment du diagnostic était de 70 ans chez les hommes et de 72 ans chez les femmes, la LLC reste cependant très rare avant 40ans. Aux États-Unis, le nombre de nouveaux cas de LLC était de 14620 en 2015 (Siegel et al., 2015)

Malgré cette fréquence élevée, les causes initiales de la maladie restent inconnues. En effet, il existe peu de données épidémiologiques permettant d'établir un lien de causalité entre la survenue de la pathologie et l'exposition par exemple à des agents chimiques. Seul l'herbicide Agent Orange utilisé au Vietnam est clairement associé à un risque accru de LLC. (Linnet et al., 2007).

Enfin, il est important de souligner que le taux d'incidence de la LLC a légèrement diminué (-2,1%) au cours de la période 2010-2018 (Troussard et al., 2021).

3. MANIFESTATIONS CLINIQUES :

Cliniquement, la plupart des patients sont asymptomatiques, seule une minorité de ces derniers présente une asthénie, des sueurs nocturnes, de la fièvre, des infections fréquentes, des adénopathies et des hépato-splénomégalies. Il est aussi rapporté que chez quelques patients, des réactions auto-immunes sont dirigées contre les globules rouges et les plaquettes donnant lieu respectivement à des anémies hémolytiques auto-immune (AHA) et des purpuras thrombocytopeniques (Fornecker et al., 2015).

Cette évolution clinique permet de définir deux groupes de patients, ceux présentant une forme indolente de la maladie, chez qui, l'espérance de vie est proche de la normale ne nécessitant pas de traitement, et au contraire, un autre groupe de patients qui vont développer une forme progressive souvent fatale à plus court terme malgré l'instauration de différentes thérapies. Cette évolution clinique est transcrite selon deux systèmes de classification qui permettent de stratifier le stade d'évolution des patients en se basant à la fois sur l'évolution clinique et sur les données biologiques : La classification de Rai (1975) et la classification de Binet (1981).

Retenons que la classification de Rai est majoritairement utilisée en Amérique du nord, tandis qu'en Europe on utilise surtout la classification de Binet. Cette dernière définit 3 stades (A, B, C) (Binet et al., 1981). (voir tableau 1)

Malgré la bonne valeur pronostique de ces deux systèmes, il est très vite apparu nécessaire de déterminer d'autres marqueurs pronostiques : biologiques et moléculaires qui améliorent les prédictions d'évolution de la maladie, de survie du patient, et de stratification de ces derniers en des groupes les plus homogènes possibles dans le cadre de protocoles d'études cliniques. (Cf. chapitre facteurs pronostiques)

Tableau 1 : Critères de classification clinico-biologique de Binet

Stades	Pronostic	Critères de définition
A	Bon	[Hb] > 10g/dL Plaquettes > 100x10 ⁹ /L < 3 aires lymphoïdes atteintes
B	Intermédiaire	[Hb] > 10g/dL Plaquettes > 100x10 ⁹ /L > 3 aires lymphoïdes atteintes
C	Mauvais	[Hb] < 10g/dL Plaquettes < 100x10 ⁹ /L Quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes

4. DIAGNOSTIC DE LA LLC :

Le frottis sanguin :

Comme indiqué précédemment, le début de la maladie est insidieux, la découverte de la maladie se fait alors de façon fortuite à l'issue d'un hémogramme de routine (Ghia et al., 2007). Un frottis est alors réalisé sur lequel les B-LLC prennent un aspect de petits lymphocytes matures au noyau dense et au cytoplasme réduit. La présence de cellules abimées ou des restes de noyaux nus dits « ombres nucléaires » ou ombres de Gumprecht, correspondant à un artéfact survenant lors de la réalisation des frottis de sang, est assez caractéristique de la LLC (Hallek, 2017) (cf. image ci-dessous) :

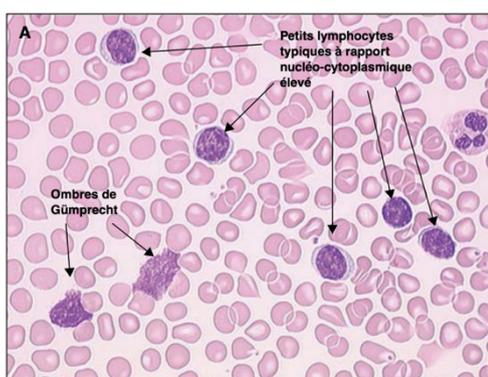


Figure 1 : Frottis sanguin montrant de petits lymphocytes de LLC typiquement différenciés associés à une ombre de Gumprecht (MO X 100) – D'après Evard et al, 2005

Immunophénotypage :

Le phénotypage immunitaire est fondamental pour poser formellement le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique, en effet, il permet de confirmer la monoclonalité des lymphocytes B et concourt à distinguer la LLC des autres hémopathies lymphoprolifératives de type B. Il est établi à partir d'un échantillon de lymphocytes sanguins par la technique de cytométrie en flux (CMF).

Les B-LLC co-expriment des antigènes caractéristiques de la lignée B, elles sont : CD19⁺, CD20⁺ (habituellement faible, à la différence des lymphocytes B normaux), CD22⁺ (faible expression), CD23⁺ (récepteur de basse affinité pour les IgE) ainsi que CD5⁺ habituellement exprimé par les lymphocytes T mais aussi par une sous-population lymphocytaire B retrouvée rarement chez l'adulte .

La clonalité cellulaire des cellules B de LLC s'évalue également par la constitution de leurs chaînes d'immunoglobulines de surface faiblement exprimées, constituées d'un seul réarrangement du segment variable des chaînes lourdes, et des chaînes légères : kappa (κ) dans 60% des cas ou lambda (λ) dans 40% des cas et avec une expression biaisée de certains segments VH (segment variable des chaînes lourdes). Ces immunoglobulines sont habituellement de type IgM \pm IgD (rarement IgA ou IgG). Enfin, on note également une absence d'expression de FMC7 contrairement à la plupart des syndromes lymphoprolifératifs B.

Malgré l'analyse de tous ces marqueurs, aucun n'est pathognomonique de la LLC, le CD5 peut également être exprimé dans le lymphome non-hodgkinien à cellules du manteau. À ce titre, en 1994, le Docteur E. Matutes a établi un score en se basant sur une combinaison de 5 marqueurs phénotypiques : CD5, CD22, CD23, FMC7 et l'immunoglobuline membranaire monotypique. Il a ensuite été modifié et complété en 1997 par Moreau et al, en remplaçant le marqueur CD22 par CD79b estimé plus pertinent au diagnostic (les 2 molécules sont impliquées dans la régulation de la signalisation du BCR). Ainsi, le score de Matutes varie de 0 à 5 en s'appuyant à la fois sur la présence et sur la densité des marqueurs : de ce fait, un score < 3 permet formellement d'exclure au diagnostic la LLC ; un score de 3 correspond à une LLC atypique ; enfin, un score de 4 ou 5 sera en faveur du diagnostic de la LLC (Matutes et al.).

Tableau 2 : Le Score Matutes . D'après (Matutes et al, 1994)

Antigène	Attribuer 1 points si :	Attribuer 0 points si :
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
CD79b	Faiblement exprimé / Négatif	Fortement exprimé
FMC7	Négatif	Positif
Ig de surface	Faiblement exprimée	Fortement exprimée

Examens complémentaires :

Le recours à un myélogramme n'est généralement pas très utile au diagnostic, il en est de même pour la biopsie ganglionnaire. Ces examens sont réalisés pour établir des diagnostics différentiels avec d'autres hémopathies ou lors d'une évolution en un syndrome de Richter.

5. ÉVOLUTION DE LA MALADIE :

Un certain nombre de complications viennent s'ajouter conjointement à l'évolution de la LLC, rendant ainsi le pronostic plus sombre, on peut citer :

Complications auto-immunes

La plus fréquemment rencontrée est l'AHAI (survient chez 7-10% des patients), due à la sécrétion d'immunoglobulines polyclonales de type IgG de haute affinité par les lymphocytes B non tumoraux. Ces anticorps dirigés contre les hématies et les plaquettes sont à l'origine de la cytopénie constatée chez certains patients. Cette cytopénie peut aussi, dans de rares cas, être due aux cellules B de LLC, qui agissent soit par production d'auto-anticorps monoclonaux (souvent de type IgM) aboutissant à une hémolyse intravasculaire ou alors par production de cytokines qui inhibent indirectement l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse (Tsang and Parikh, 2017).

Complications infectieuses

Elles représentent la cause la plus fréquente de mortalité chez les patients atteints de LLC et qui ont déjà une immunodépression du fait de l'hypogammaglobulinémie persistante et du déficit quantitatif et fonctionnel à la fois des lymphocytes T effecteurs et des lymphocytes B

(défaut d'opsonisation) (Forconi and Moss, 2015a). Ces infections sont généralement de nature bactérienne et touchent la sphère respiratoire (Kipps et al., 2017)

Transformation en syndrome de Richter

La LLC peut se transformer, dans 3 à 10% des cas, en un lymphome de haut grade de malignité : c'est le syndrome de Richter (SR) qui correspond le plus souvent au développement d'un Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (LBDCG) ou plus rarement d'un Lymphome Hodgkinien (LH). L'histopathologie permet de différencier ces 2 entités (Wang and Ding)(Rossi et al., 2018).

Les anomalies génétiques identifiés dans le SR de type LBDCG sont les mutations de *NOTCH1*(Neurogenic locus notch homolog protein 1), *TP53* (Tumor Protein 53) , *CDKN2A* (Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A) et *MYC* (Myelocytomatosis oncogene) , une expression plus importante de PD1 (Programmed Death factor 1) contrairement à la LLC, et une faible expression du CD5 (30% des cas) et du CD23 (15% des cas) (Soilleux et al., 2016)(He)

Lorsqu'il s'agit d'une évolution en faveur d'un LH, le diagnostic sera établi sur la base des cellules de Reed-Sternberg (= définition du Hodgkin) de phénotype CD30⁺ CD15⁺ CD20⁻ (Xiao et al., 2016).

Le pronostic est alors très sombre, avec des options thérapeutiques limitées et peu efficaces.

Cancers solides associés

Il est maintenant établi que les patients atteints de LLC présentent une incidence accrue à développer des tumeurs malignes comparés à des sujets témoins, en particulier les cancers de la peau de type mélanomes, les sarcomes et les cancers de la prostate (Hisada, 2001). Le contexte immunosuppresseur associé à la LLC permet d'expliquer ce risque accru (Morton et al., 2010).

6. LES FACTEURS PRONOSTIQUES :

De nombreuses données de la littérature démontrent l'importance des translocations chromosomiques oncogéniques dans l'émergence et la progression des lymphomes B (Vega and Medeiros, 2003), à ce titre, la LLC représente un cas particulier puisqu'il est rare de trouver des translocations récurrentes, de plus, aucune mutation oncogénique n'a été à ce jour identifiée. Par contre, les aberrations dans le caryotype sont fréquemment rapportées avec plus de délétions que de gains, et les patients peuvent avoir une seule ou plusieurs de ces anomalies.

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) est l'approche standard utilisée actuellement pour mettre en évidence ces anomalies cytogénétiques, elle permet d'identifier des anomalies dans

plus de 80% des cas en détectant des séquences d'ADN spécifiques sur noyaux interphasiques. (Mato et al., 2020). Ces anomalies peuvent apparaître pendant le développement de la LLC et certaines d'entre elles peuvent avoir une valeur pronostique ; une délétion 11q ou 17p est associée à une survie plus courte alors qu'au contraire une délétion 13q est associée à une survie plus longue (Damle et al., 1999) (Hamblin et al., 2002).

6.1. LES ABERRATIONS CARYOTYPIQUES

6.1.1. LA DELETION 13Q14 :

C'est l'anomalie la plus observée dans la LLC (\approx 55% des patients), le plus souvent chez des patients au stade A, et donc associée à un bon pronostic (médiane de survie de 11ans) (Dighiero and Hamblin, 2008). Il s'agit d'une délétion sur le bras long du chromosome 13, en particulier sur la région 13q14, qui dans les 80% des cas est hétérozygote (Puiggros et al., 2013).

La région délétée comporte le gène DLEU2 (Deleted in Lymphocytic Leukemia 2) qui code pour des micro-ARN (miR) dont le miR-15a et miR16-1. Ces 2 micro-ARNs régulent négativement la protéine anti-apoptotique Bcl2, entraînant ainsi sa surexpression, mécanisme décrit comme contribuant à la résistance des cellules leucémiques à l'apoptose (Klein et al., 2010). Il est à noter que cette délétion n'est pas une spécificité à la LLC, car elle est aussi retrouvée dans le myélome multiple, et le cancer de la prostate, suggérant ainsi un rôle anti-tumoral des gènes présents dans cette région (Elnenaei et al., 2003) (Dong et al., 2001).

6.1.2. LA DELETION 11 (Q22Q23)

Est la seconde anomalie la plus détectée (\approx 18% des patients), elle est plus souvent présente chez des patients de stades B et C par rapport au A, ce qui explique sa forte association à la lympho -adénopathie extensive et à une survie plus courte (Lepretre et al., 2012).

La région délétée contient le gène suppresseur de tumeur *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN par l'activation de p53, et le gène *BIRC3* (Baculoviral IAP Repeat Containing 3) un inhibiteur de NF- κ B qui pourrait contribuer au développement de la pathologie et à son mauvais pronostic (Rosenquist et al., 2013).

6.1.3. LA TRISOMIE 12 :

Il semblerait que la trisomie 12 soit plus fréquente dans les LLC dites "atypiques" avec un pronostic défavorable. L'implication de cette aberration chromosomique est peu élucidée, car aucun gène impliqué dans la pathogénèse de la LLC n'a pu être défini de façon claire, néanmoins on sait qu'elle joue un rôle dans l'acquisition d'anomalies supplémentaires, telles que la trisomie 19 ou des mutations de *NOTCH1* et *TP53* (Falisi et al., 2014).

Récemment encore, la trisomie 12 était décrite comme associée à la del14q, à la mutation de *NOTCH1* et à un statut IGHV (Immunoglobuline Heavy Variable region) non muté, identifiant ainsi un groupe pronostique plutôt péjoratif (Cosson et al., 2014)

6.1.4. LA DELETION 17P13 :

Cette anomalie peu fréquente sur le bras court du chromosome 17, touche la région qui code pour le gène suppresseur de tumeur *TP53* et qui donne un pronostic très défavorable du fait qu'elle compromet drastiquement l'efficacité des thérapies incluant la fludarabine et la cyclophosphamide (agent alkylant de l'ADN) (Zenz et al., 2009).

Zenz et Al avait rapporté que les délétions 17p et 11q, indépendamment du stade de la maladie, sont prédictives d'une survie plus courte.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de la répartition des principales anomalies cytogénétiques

Anomalies	Fréquence	Pronostic	Statut IGHV	Médiane de survie (mois)
Délétion 13q14	55%	Favorable	Muté	133
Délétion 11q22	18%	Défavorable	Non-muté	79
Trisomie 12	15%	Défavorable	Non-muté	114
Délétion 17p13	7%	Très défavorable	Non-muté	32

6.2. STATUT MUTATIONNEL DU SEGMENT VARIABLE DU GENE DES CHAINES LOURDES DES IMMUNOGLOBULINES :

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines composées de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères, chacune d'entre elles constituée d'une région variable et d'une région constante.

Un lymphocyte B de LLC est caractérisé par sa faible expression d'immunoglobulines de surface et donc une faible expression de son récepteur à l'antigène le BCR. La diversité des immunoglobulines repose sur le réarrangement des segments V-D-J dans la moelle osseuse et par le mécanisme d'hypermutation somatique, c'est à dire de mutations ponctuelles de la région variable qui ont lieu dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires

C'est en se basant sur le statut mutationnel des IGHV que 2 groupes de patients bien distincts ont été mis en évidence par Hamblin et son équipe (Hamblin et al.).

Tableau 4 : Statuts mutationnels du locus IGHV

	IGHV muté	IGHV non muté
Homologie de la séquence d'ADN par rapport au LB naïf	< 98% (ou < 2% de différence)	> 98% (ou > 2% de différence)
Origine des cellules B	B mémoires (post-germinales)	B naïves (pré-germinales)
Proportion des patients	40%	60%
Pronostic	Favorable	Défavorable
Médiane de survie	24 ans	8 ans

L'analyse du statut mutationnel des IGHV se fait par séquençage des gènes du clone de lymphocyte B puis par comparaison à des bases de référence qui représentent des IGHV de cellules germinales n'ayant pas encore subi d'hypermutation somatique.

Rappelons enfin, que ce statut mutationnel est fortement corrélé avec d'autres facteurs pronostiques tel que les délétions 17p13 et 11q22 mais aussi avec l'expression du CD38 et ZAP70 (Zeta-chain Associated Protein Kinase of 70 kDa) (Chavez et al., 2016).

6.3. MARQUEURS IMMUNOPHENOTYPIQUES :

CD38 : Est une ectoenzyme transmembranaire exprimée à la surface des lymphocytes B impliquée dans l'homéostasie calcique et participe à l'adhésion et la signalisation des leucocytes par le biais de l'interaction avec le ligand de surface CD31 principalement exprimé par l'endothélium vasculaire. Le CD38 participe aussi à la survie et à la prolifération des cellules leucémiques et est donc utilisé comme un marqueur de mauvais pronostic (Rosenquist et al., 2013). En effet, une corrélation a été déterminée entre les cellules B CD38⁺ et le statut IGHV non-muté. Mais en aucun cas le CD38 ne pourra remplacer le statut mutationnel, car l'expression de ce dernier a tendance à varier au cours de l'évolution de la LLC (Ghia et al., 2007).

ZAP70 : est une tyrosine kinase de la famille de Syk (Spleen tyrosin Kinase) physiologiquement exprimée par les LT et les NK et associée respectivement à la transduction du signal du TCR (T Cell Receptor) et de CD16, et retrouvée de façon aberrante dans les cellules B leucémiques. Plusieurs études ont montré son expression plus importante sur les cellules B de LLC ayant un IGHV non muté, ce qui l'associe à un pronostic défavorable (Crespo et al., 2003) (Morabito et al., 2015).

Au même titre que la protéine CD38, ZAP70 varie au cours de la maladie, en outre, son expression intracellulaire rend sa recherche contraignante par cytométrie en flux, elle a donc été abandonnée dans les analyses de routine.

6.4. ANOMALIES MOLECULAIRES :

L'avènement des techniques de nouvelle génération d'analyse de l'exome entier a permis la mise en évidence de 19 anomalies (Lazarian et al., 2017) , les plus fréquentes usurpent des voies physiologiques importantes pour la leucémogénèse : les voies impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et de la réparation des dommages de l'ADN (TP53 et ATM), la voie de la réponse inflammatoire (*BIRC3*), la voie Wnt (*DKK2*), la voie NOTCH (*NOTCH1*), la voie de l'épissage alternatif (*SF3B1*).

Une classification basée sur les données de suivi global et prenant en compte les données cytogénétiques décrites précédemment et les données moléculaires du patient a été proposée. Même si cette nouvelle classification demande à être validée, elle permet néanmoins de distinguer quatre groupes d'individus plus ou moins à risque : élevé (mutation *TP53* ou *BIRC3*), intermédiaire (mutation *SF3B1* ou *NOTCH1* ou *ATM* et Del11q) , faible (Trisomie 12 ou noyaux anormaux) et très faible lorsqu'on a uniquement une Del13q isolée (Rossi et al., 2013).

Enfin, de façon intéressante, la caractérisation de ces mutations a permis le développement de 2 modèles murins de LLC progressive grâce à l'utilisation du système Cre-Lox (délétion sélective des gènes TP53 et ATM sur les lymphocytes B) (Knittel et al., 2017).

6.5. MARQUEURS SÉRIQUES :

En plus des paramètres détaillés précédemment, il est aussi possible d'utiliser plus facilement et plus rapidement des marqueurs sériques qui reflètent la masse tumorale, les principaux sont : la β 2-microglobuline (β 2m) une protéine appartenant au CMHI (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) , la Thymidine Kinase (TK) qui est une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ADN et dont l'activité reflète la prolifération des cellules tumorales (Cramer et al., 2016) et le CD23 soluble, qui, lorsqu'il est sécrété agit comme un facteur de croissance et de prolifération des BLLC.

7. LES TRAITEMENTS :

Le diagnostic de la LLC chez un patient n'induit pas de façon systématique la mise en place d'un traitement. Ce dernier n'est nécessaire que chez une minorité des patients présentant

une LLC évolutive (stade B et C). Quant aux patients de stade A, l'abstention thérapeutique est le plus souvent adoptée avec une surveillance étroite, il a même été démontré par plusieurs études que le traitement des patients au stade A n'apporte aucun bénéfice en terme de survie (Hallek et al., 2018).

Le choix du protocole thérapeutique dépendra de plusieurs critères ; l'âge du patient, son état général, l'existence ou pas de facteurs de comorbidités, mais aussi de la signature caryotypique, en effet, une délétion 17p (anomalie *TP53*) par exemple rend les patients réfractaires à la chimiothérapie, et donc plutôt éligibles aux nouvelles molécules « ciblées » ainsi qu'à la greffe (Eichhorst et al., 2015).

Le schéma habituellement utilisé jusqu'aux années 2000 reposait sur une chimiothérapie à base d'agents analogues des purines (ex : Fludarabine) et alkylants (ex : Chlorambucile). Depuis, les protocoles en monothérapie disparaissent, et la combinaison avec des anti-CD20 (ex : Rituximab) ou sa version humanisé (Ofatumumab) s'avère plus efficace avec une nette amélioration du pronostic des patients (Hallek, 2015).

La voie du BCR (B-Cell Receptor) impliquée dans la plupart des mécanismes de survie des cellules B de LLC est devenue la principale voie ciblée pour développer un nouvel arsenal thérapeutique, dont les principales molécules utilisées à ce jour sont les inhibiteurs de BTK (dont l'Ibrutinib ou l'acalabrutinib) et l'inhibiteur de la Pi3K (Idelalisib) tous deux à l'origine de la chasse lymphocytaire des cellules leucémiques des ganglions vers la circulation sanguine (Brown et al., 2014).

Plus récemment, un inhibiteur de Bcl-2 (Vénétoclax) a montré une efficacité prometteuse dans le traitement de la LLC, et a obtenu une AMM en 2016 en seconde ligne après des échecs de protocoles utilisant les inhibiteurs de la voie du BCR ou lors d'anomalie *TP53* (del 17p13) (Stilgenbauer et al., 2016).

Enfin, il existe aussi d'autres stratégies thérapeutiques qui visent à moduler les cellules immunitaires dont l'utilisation des immune checkpoint inhibitors (Cf paragraphe PD-L1). Une autre alternative et qui est d'actualité de nos jours est l'utilisation des CAR-T cells, des lymphocytes T de patients génétiquement modifiés exprimant à leur surface des « Récepteurs Antigéniques Chimériques = CAR » en l'occurrence le CD19 pour la LLC, afin que ceux-ci soient en mesure de reconnaître et détruire les cellules cancéreuses.

CHAPITRE 2 : IMMUNOSURVEILLANCE ANTI-TUMORALE

1. LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-TUMORALE :

Historique du principe de l'immunoediting :

Le principe d'une réponse immunitaire qui contrôle le développement et la progression des tumeurs est maintenant bien argumenté par les scientifiques. En effet, les travaux pionniers dans ce domaine furent ceux de Paul Ehrlich en 1909 révisés par Thomas et Burnet en 1959, qui établirent le concept de l'immunosurveillance des cancers. Un concept qui expose que la cellule cancéreuse exprime à sa surface une quantité d'antigènes spécifiques capables de susciter une réponse immunitaire principalement médiée par les lymphocytes, de façon analogue à la réponse de défense générée contre les agents infectieux (Burnet, 1967) (Thomas). Des travaux de la même période ont conforté ce concept lorsque des souris immuno-déficientes ont été exposées à des carcinogènes ; les travaux de Stutman et al. réalisés sur des souris nudes (thymectomie néonatale) ont montré qu'elles présentaient une incidence accrue de tumeurs induites par rapport à des souris immunocompétentes (Stutman, 1974). Il a fallu attendre les années 2000 et le développement de modèles de souris knock out (KO) pour prouver de façon plus spécifique l'implication des différents acteurs de l'immunité anti-tumorale, nous pouvons citer pour exemple l'étude menée par Schreiber et al. sur des souris RAG-2.KO (Recombination Activating Gene 2) qui sont dépourvues du gène RAG-2, un gène important pour le réarrangement des chaînes du récepteur TCR des lymphocytes T et BCR des lymphocytes B aboutissant à des lymphocytes immatures, et donc ne pouvant pas participer à la réponse immunitaire adaptative. Dans son étude, il a montré que l'élimination de tumeurs implantées dans ce modèle de souris est moins importante comparativement aux souris non invalidées (wild type) (Shankaran et al., 2001). Un autre modèle est celui des souris dépourvues de perforine $pfp^{-/-}$. Cette protéine cytosolique est responsable de la cytotoxicité des lymphocytes T $CD8^{+}$, Natural killer et lymphocytes T $\gamma\delta$ par formation d'un canal dans la membrane plasmique de la cellule cible qui assure le passage d'un inducteur de l'apoptose : le granzyme. Ces souris $pfp^{-/-}$ présentaient une incidence plus importante de lymphomes B et d'adénocarcinomes pulmonaires, ce qui confirme que les lymphocytes T $CD8^{+}$ sont des cellules de la surveillance anti-tumorale (Smyth et al., 2001) (Street et al., 2002). Finalement, le concept de l'immunosurveillance anti-tumorale a conduit à l'établissement d'une nouvelle notion sur l'immunité oncologique : « l'immunoediting ou encore la théorie des 3E » qui décrit le duel existant entre le système immunitaire et les cellules tumorales et faisant intervenir 3 phases : d'abord, l'«Elimination» phase initiale pendant laquelle les cellules tumorales sont détectées puis détruites par le système immunitaire, l'«Equilibre où l'expansion du clone tumoral reste contrôlée par l'immunité et enfin l'«Echappement qui permet à la tumeur d'esquiver les réponses immunitaires et de s'expandre de façon incontrôlée (Mittal et al., 2014)

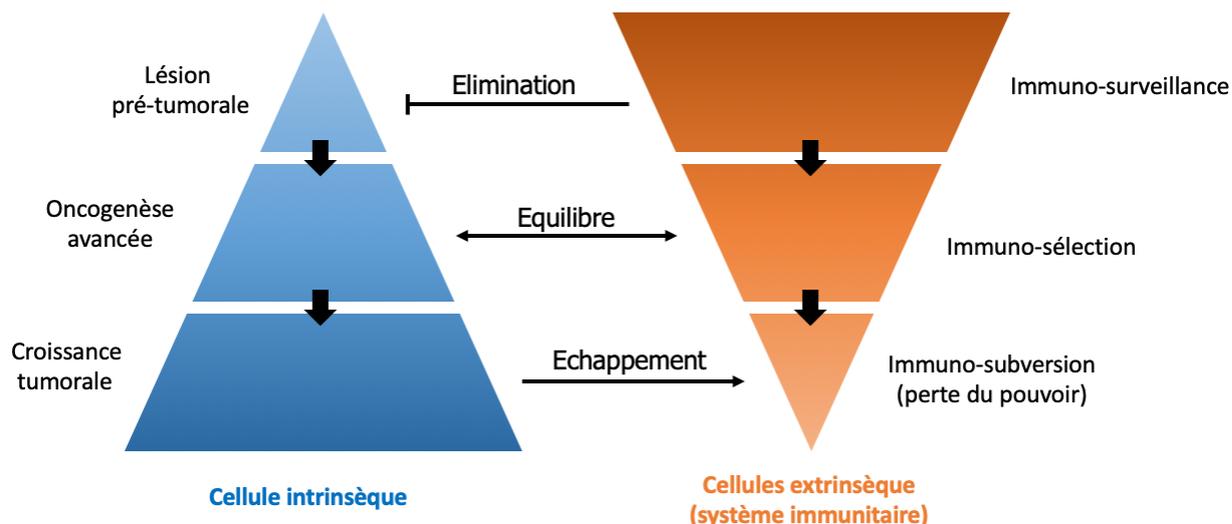


Figure 2 : Schéma récapitulatif de la théorie de l'immunoediting (adapté de Zitvogel et al., 2006)
 Concept selon lequel les étapes de la carcinogénèse résultent de la diaphonie des facteurs intrinsèques (cellule cancéreuse) et des facteurs extrinsèques (système immunitaire)

1.1. PHASE D'ELIMINATION :

La réponse immunitaire anti-tumorale fait intervenir une étroite collaboration des cellules appartenant à la fois à l'immunité innée et à l'immunité adaptative. De manière résumée nous décrivons ici quelques acteurs essentiels de cette phase.

Pendant sa croissance, la cellule tumorale devient de plus en plus invasive, causant des lésions tissulaires et libérant des facteurs pro-inflammatoires dans le microenvironnement dans lequel elle siège. Ces signes sont immédiatement perçus par un type particulier de cellules de l'immunité innée hautement impliquées dans la surveillance anti-tumorale, les Natural Killer. En effet, parmi leurs spécificités, ces cellules ont la faculté de reconnaître et de détruire de façon très rapide les cellules faiblement porteuses d'une marque du soi, c'est le cas des cellules tumorales (Vivier et al., 2011), sans pour autant nécessiter une stimulation antigénique préalable pour mener à bien leur action cytotoxique (Vivier et al., 2008). C'est ainsi que les cellules NK (Natural killer) recrutées induisent l'apoptose des cellules tumorales tout en relarguant des antigènes associés aux tumeurs (TAA), qui, très rapidement seront capturés par les cellules dendritiques (DC) (figure 3) : un second type de cellules de l'immunité innée recrutées sur site par l'intermédiaire de l'interféron gamma $IFN\gamma$ produit par les NK activés. Les DCs sont des Cellules Présentatrices d'Antigène (APC) qui mûrissent après avoir endocyté les fragments tumoraux formés dans le microenvironnement. Ces cellules sentinelles vont communiquer au système immunitaire la présence de tumeurs en initiant une réponse spécifique à l'antigène. Pour cela, elles migrent vers les ganglions lymphatiques qui drainent la tumeur à l'instar d'un gradient de chimiokines. Une fois sur place, elles génèrent via leur protéasome des peptides fortement immunogènes à partir des TAA qu'elles ont

préalablement intégrés par endocytose, puis les chargent sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II, par le mécanisme dit de présentation croisée (Bödder et al., 2021). Enfin, les DCs vont pouvoir présenter ces peptides aux lymphocytes T CD4 naïves via le CMHII et aux lymphocytes T CD8 naïves via CMHI par interaction avec le récepteur des lymphocytes T le TCR, et des molécules de co-stimulation exprimées à la surface des cellules T comme le CD28 et de leur ligands CD80, CD86 exprimés par les DCs . Cette interaction, et la production de l'interleukine 12 par les DCs, permet aux cellules T CD8 et T CD4 spécifiques des tumeurs d'être activées et de proliférer pour être par la suite recrutées au site tumoral et contribuer à la destruction des cellules tumorales qui expriment l'antigène pour lequel elles ont une spécificité (Piccioli et al., 2002).

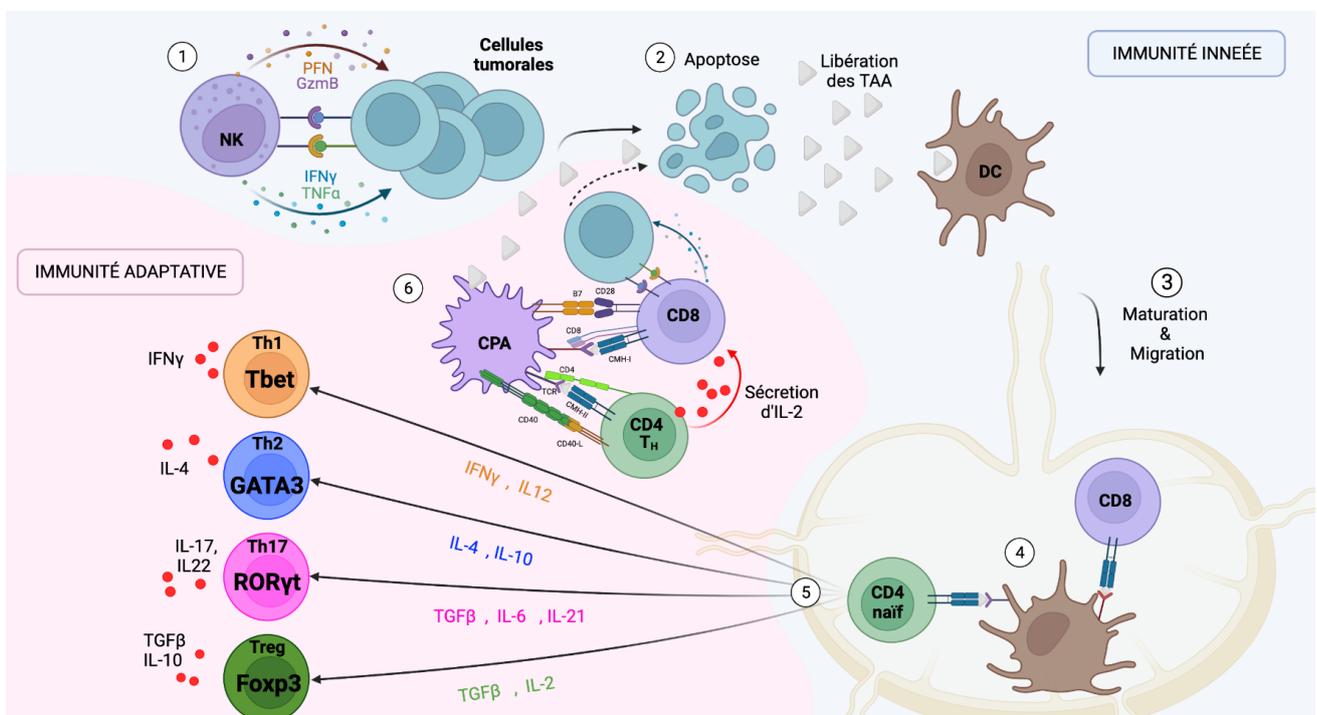


Figure 3 : Quelques acteurs majeurs de la réponse immunitaire au cours d'une prolifération tumorale. (1) Les cellules NK induisent l'apoptose des cellules tumorales par contact direct et production de facteurs solubles (2) Les cellules tumorales détruites libèrent des antigènes associés aux tumeurs (3) Les DC captent les TAA et migrent vers les aires ganglionnaires périphériques (4) À ce niveau les DC peuvent présenter le peptide antigénique aux lymphocytes T (5) En fonction des signaux du microenvironnement, les cellules T se différencient en un type cellulaire particulier (6) Les cellules T CD8 par leur action cytotoxique participent aussi à la réponse anti-tumorale.

En fonction des cytokines produites dans le microenvironnement, les cellules T CD4 (Th0) se différencient en cellules T auxiliaires (Th = T helper) aux fonctions divergentes, et qui, une fois activées, conservent la mémoire moléculaire de leur activation pour permettre des réponses rapides lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène (Schmidl et al., 2018). Lorsque les cytokines prédominantes sont IL-2, IL-12, IFN γ et TNF α , on assistera à une différenciation de type Th1 produisant préférentiellement de l'IFN γ . Ces cellules, en plus d'exercer une fonction contre les pathogènes, concourent à la protection anti-tumorale par l'activation des effecteurs cytotoxiques à savoir les NK et les lymphocytes T CD8 (Ekkens et al., 2007). Par ailleurs, les IL-4, IL-5 et IL-10 entraînent une polarisation des Th0 en Th2 sécrétrices essentiellement d'IL-4, impliquées dans la réponse contre les pathogènes extracellulaires et dans les allergies par l'induction d'une réponse humorale (Luckheeram et al., 2012). Enfin, un troisième sous-type, nommé Th17 se distingue des Th1 et des Th2 par sa production d'une cytokine pro-inflammatoire l'IL-17. Ces puissants lymphocytes T CD4+ exercent un rôle dans les maladies auto-immunes, et possiblement dans les cancers, cette idée reste cependant controversée (Liu et al., 2015). La plasticité des lymphocytes T CD4 ne permet pas seulement la différenciation des cellules effectrices; sont également générés les lymphocytes T régulateurs (Tregs) qui ont la propriété d'inhiber la réaction des lymphocytes T effecteurs afin de maintenir l'homéostasie immunitaire dans l'organisme, Il est également admis qu'en plus des cytokines qu'elles expriment préférentiellement, chacune de ces sous-populations est identifiée par un facteur de transcription spécifique : T-bet (Th1), GATA-3 (Th2), ROR γ (Th17) et FOXP3 (Treg) (Gieseck et al., 2018).

1.2. PHASE D'EQUILIBRE :

Parfois, le système immunitaire parvient à éliminer totalement les cellules tumorales, et le processus d'*editing* s'arrête alors, sans progresser vers d'autres phases. Mais, dans certaines circonstances, et malgré une immunocompétence de l'hôte, les cancers continuent de se développer et passent à une nouvelle étape dite d'équilibre. Comme son nom l'indique un certain équilibre s'installe entre la tumeur et le système immunitaire. Ce dernier resterait compétent et exercerait une forte pression sur les cellules tumorales, ce qui entrainerait une sélection de variants tumoraux génétiquement instables qui mutent rapidement et résistent à cette élimination. Il est admis que certaines cellules tumorales prolongent leur latence sur plusieurs années, ce qui rend cette phase la plus longue des trois allant parfois jusqu'à 20ans (Smyth et al., 2006)(Loeb et al., 2003).

1.3. PHASE D'ECHAPPEMENT :

Contrairement à la phase précédente, cette phase est sans doute la plus caractérisée des trois, puisque c'est à ce stade que les tumeurs sont souvent appréhendées de manière clinique et aboutissent régulièrement à la mort de l'individu atteint. Au cours de cette dernière phase de

l'immunoediting, les cellules tumorales deviennent peu immunogènes et parviennent à échapper au contrôle immunitaire en entamant leur phase de prolifération anarchique. Cette phase sera détaillée dans le suivant chapitre.

2. ECHAPPEMENT TUMORAL A L'IMMUNOSURVEILLANCE

L'échappement tumoral est un terme maintenant très utilisé, il correspond à la capacité des cellules tumorales à envahir les tissus et à engendrer des métastases à distance. Cette possibilité d'échapper à l'immunosurveillance est rendue possible par une quantité de mécanismes dont je m'appliquerai à décrire quelques-uns d'entre eux dans les paragraphes suivants.

2.1. PRESENTATION DEREGULEE DES ANTIGENES PAR LES CELLULES TUMORALES :

C'est l'une des voies d'échappement tumoral les plus caractérisées, de nombreuses études ont été réalisées sur des tumeurs solides ou hématopoïétiques montrant un défaut de présentation antigéniques (Campoli and Ferrone, 2008).

Comme vu précédemment dans le concept de l'immunoediting, l'immunité de l'hôte exerce une pression constante sur les cellules tumorales résidentes et circulantes, ces dernières devant s'adapter, modifient l'expression de leurs molécules d'HLA (Hyman Leukocyte Antigenen les diminuant, ou alors en altérant les voies de l'apprêtement antigénique. En effet jusqu'à 90% des tumeurs ayant trouvé leur origine dans des tissus CMH-I positifs perdent l'expression des molécules de CMH-I soit par des mutations, des délétions de fragments chromosomiques ou encore des défauts dans la transcription ou la traduction de la bêta-2-microglobuline (Taylor and Balko, 2022). Les cellules tumorales peuvent aussi participer au développement de modifications intrinsèques de la machinerie d'apprêtement des antigènes, des chercheurs ont notamment mis en évidence des dysfonctionnements de protéines telles que TAP1 et TAP2 (Transporter associated with Ag Processing-1/2) qui joueraient un rôle de transporteurs des antigènes vers le réticulum endoplasmique (Seliger et al., 2004).

2.2. DEFAT DE PRESENTATION ANTIGENIQUE PAR LES CELLULES DENDRITIQUES :

Nous avons évoqué précédemment le rôle central que jouent les DC dans la transition entre l'immunité innée et adaptative. Il n'est donc pas étonnant de voir que les cellules tumorales perturbent le fonctionnement de ces cellules à leur profit. Plusieurs études ont montré que les cellules de divers types de cancers, tels que les cancers du poumon ou gastrique produisent des molécules telles que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IL-6, IL-10, TGF β ayant pour rôle d'interrompre la maturation des DC, et donc une incapacité de ces dernières à présenter l'Ag et à stimuler les LT. CD8 (Hayashi et al., 2003).

2.3. ÉCHAPPEMENT DEPENDANT DES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRE (IMMUNE-CHECKPOINT) :

- **Principe** :

Les immunes checkpoints : PD-1 ; CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4) ; LAG-3 (Lymphocyte Activating Gene 3) ; Tim-3 (T-cell Immunoglobulin and Mucin contraining protein 3) ... sont des récepteurs inhibiteurs physiologiquement exprimés à la surface des cellules immunitaires et dont la principale fonction est le maintien de la tolérance immunitaire en contrebalançant l'activité des récepteurs stimulateurs (Sharpe et al., 2007). Cette stratégie physiologique des cellules immunitaires consistant à engager ces immune checkpoints pour prévenir le risque d'auto-immunité est usurpée par les cellules tumorales qui échappent à la surveillance en sur-activant ces marqueurs eux-mêmes surexprimés dans ce contexte. Il en résulte alors un épuisement (notion dite « d'exhaustion ») du système immunitaire, avec des lymphocytes T et des cellules NK incapables de libérer des cytokines, de maintenir une réponse immunitaire efficace et de tuer les cellules tumorales (Wherry and Kurachi, 2015).

La stratégie thérapeutique est fondée sur le développement d'anticorps qui empêcheraient ces freins d'opérer permettant ainsi de garder les cellules immunitaires fonctionnelles qui à leur tour pourraient de nouveau détruire les cellules tumorales.

- **Exemple de l'axe PD-1/PD-L1** :

PD-1 (récepteur de mort cellulaire programmée 1 = CD279) est une protéine monomérique transmembranaire qui présente un domaine extracellulaire « IgV-Like » responsable de l'interaction avec les ligands PD-L1 et PD-L2, et un domaine intracellulaire contenant 2 motifs de signalisation à base de tyrosines, un inhibiteur ITIM (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif) et un autre responsable de la commutation : ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) (Wherry, 2011). Cette protéine est codée par le gène PDCD1 (Programmed Cell Death Protein 1), et exprimée de façon constitutive à la surface des lymphocytes régulateurs ou, sur les lymphocytes T, B, NKT (Natural killer T) et les cellules NK, au cours de leur activation, ce qui fait de PD-1 un récepteur inhibiteur. Au cours d'une stimulation antigénique activatrice chronique, comme dans le cas de certains cancers, les LT peuvent exprimer des niveaux élevés de ces molécules inhibitrices dont le PD-1, ceci conduit non seulement à une diminution de l'activation des cellules mais aussi à un épuisement (exhaustion). De la même manière PD-1 est aussi considérée comme impliquée dans les mécanismes d'anergie (Liu et al., 2021).

PD-L1 (B7-H1 = CD274) et **PD-L2** (B7-DC = CD273) sont les ligands de PD-1, mais la fonction inhibitrice de cette dernière est majoritairement attribuée à l'interaction avec PD-L1 car celui-ci est largement exprimé par les cellules hématopoïétiques mais aussi non hématopoïétiques. De plus il est rapporté une surexpression de PD-L1 dans les cancers allant de 5 à 40% (Li et

al., 2019). L'expression de PD-L2 reste restreinte aux cellules hématopoïétiques comme les cellules dendritiques, les LB ou encore les macrophages (Marinelli et al., 2020). Il est rapporté que l'expression de PD-L1 est principalement induite par une cytokine pro-inflammatoire, l'IFN γ produite par les cellules du microenvironnement tumoral. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la régulation de PD-L1, nous pouvons citer la régulation transcriptionnelle par STAT1 et STAT3 induite par l'IFN γ , celle par NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) induite dans des conditions de tumorigénèse associée à des états inflammatoires, ou encore la régulation transcriptionnelle par HIF-1 α associée à la réponse à l'hypoxie (Noman and Chouaib) (Olive et al., 2020). En plus des régulations transcriptionnelles, PD-L1 fait aussi l'objet de régulations post-transcriptionnelles par plusieurs Micro-ARN (miRNA) qui agissent directement sur les ARNm de PD-L1 ou indirectement en modifiant l'expression de ses régulateurs (Dong et al., 2018)(Fujita et al., 2015)

- **Immunothérapie ciblant PD-1/PD-L1 :**

L'immunothérapie représente désormais un des piliers de la prise en charge du cancer. La découverte des immune checkpoints a révolutionné la médecine oncologique en rendant accessible aux traitements des cancers qui étaient auparavant sans espoir de guérison. Elle fait appel à des anticorps qui ciblent les co-récepteurs inhibiteurs entre le lymphocyte T et la cellule cancéreuse dans l'objectif d'activer ou de réactiver une immunité cellulaire T.

Les inhibiteurs de PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab) et de PD-L1 (Atezolizumab, Durvalumab) sont des agents immunothérapeutiques prometteurs qui ont déjà présenté des résultats satisfaisants dans différents modèles de cancers. Ainsi, les inhibiteurs PD-1/PD-L1 peuvent interrompre ou diminuer la suppression notamment des LT, entraînant alors de nouveau une prolifération et une infiltration des cellules immunitaires et assurant une meilleure reconnaissance anti-tumorale par le microenvironnement (Chen et al., 2021).

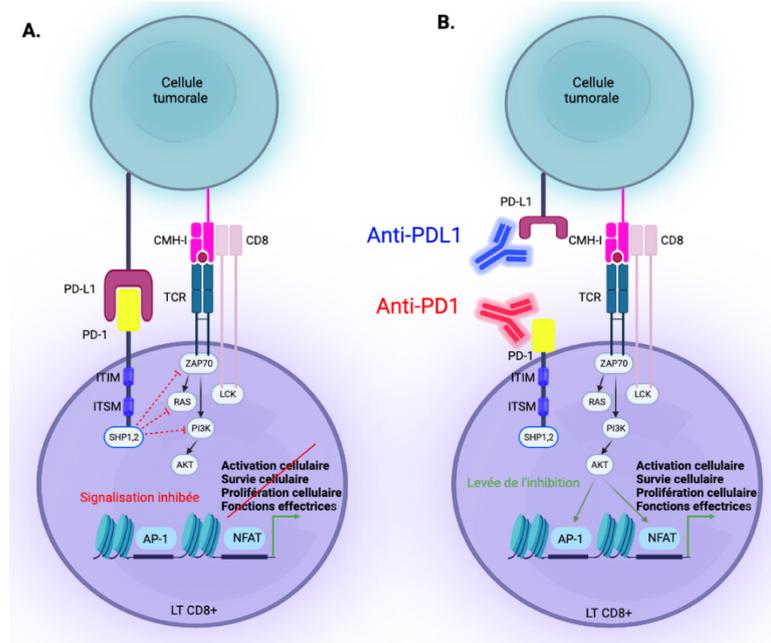


Figure 4 : Mécanisme d'échappement tumoral par l'intermédiaire d'un immune checkpoint : A) La cellule cancéreuse échappe au système immunitaire en exprimant à sa surface PD-L1, une molécule qui inhibe la signalisation TCR de la cellule T CD8 en bloquant les voies ZAP70, RAS (Rat Sarcoma) , PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) , provoquant ainsi l'apoptose, l'arrêt de prolifération et de survie cellulaire T. B) L'utilisation d'anticorps anti-PD1 ou anti-PD-L1 permet de contrebalancer le mécanisme et de lever l'inhibition de la voie du TCR dans les lymphocytes T CD8.

3. IMPLICATION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL (MET):

Les cellules tumorales se développent au sein d'un microenvironnement constitué de cellules non-tumorales, de matrice extracellulaire et d'un soutien angiogénique considérable. Ce milieu complexe n'est pas inerte, les éléments qui le composent influencent l'évolution de la maladie, certains l'accélèrent, tandis que d'autres la freinent. La transformation du MET, médiée par les interactions entre les cellules qui le composent, passe par différentes phases d'un milieu tumoral bénin vers un milieu tumoral malin jusqu'à, pour certains cancers, aboutir à des métastases (Quail and Joyce, 2013). Il est devenu évident durant ces dernières années que le MET joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de croissance, survie et échappement tumoral, et ceci constitue maintenant un enjeu capital pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le MET est généralement immunosuppresseur et empêche la mise en place d'une réponse anti-tumorale efficace. Parmi les cellules immunitaires qui l'infiltrent, nous pouvons citer les lymphocytes T régulateurs (Tregs) ; ces cellules ont d'abord été définies dans les années 2000 comme étant une variété de lymphocytes T CD4⁺ qui expriment le CD25⁺ (la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2), et l'IL-2 est une cytokine importante pour le maintien du pool de Tregs. Puis, différentes équipes ont mis en évidence le facteur de transcription FoxP3 (forkhead box P3) dans ces cellules. FOXP3 est un facteur de transcription essentiel pour l'acquisition des propriétés régulatrices des lymphocytes Tregs (Campbell and Koch, 2011). Il est maintenant considéré que les Tregs sont définis phénotypiquement comme des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Afin d'optimiser l'identification de ces cellules, les Tregs sont également caractérisés par une faible expression du CD127 (chaîne alpha du récepteur de l'IL-7), démontrant ainsi une corrélation négative entre l'expression du récepteur à l'IL-7 et FoxP3⁺ (Liu et al., 2006b). Ces cellules sont principalement attirées dans les niches tumorales riches en chimiokine CCL22 grâce aux récepteurs CCR4 exprimés à leur surface (Ho et al., 2008), les cellules Tregs secrètent un ensemble de cytokines spécifiques dont l'IL-10, l'IL-35 et le TGFβ (Transforming Growth Factor beta) capables de limiter la réponse inflammatoire dans la phase de résolution de l'inflammation en exerçant un véritable rôle tolérogène.

Des études complémentaires ont mis en évidence dans le microenvironnement tumoral une population de macrophages proches de ceux retrouvés chez des individus sains et qui ont été nommés macrophages associés aux tumeurs ou TAM. Ces cellules d'origine myéloïde sont résidentes dans les tissus et proviendraient de la différenciation de monocytes issus du sang

périphérique dans les sites inflammatoires tissulaires. Nous distinguons les macrophages pro-inflammatoires de type 1 (M1) et les macrophages immunomodulateurs de type 2 (M2). La localisation des M2 dans le MET les implique dans le développement de métastases des cellules tumorales (Colotta et al., 2009). Il semble logique que la grande majorité des TAMs qui constituent le MET soit des macrophages de type 2, en effet, les conditions hypoxiques associées à un microenvironnement riche en cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF β exercent une pression sur la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-tumoral (Mira et al., 2013). Les TAMs aident à la mise en place d'une néo-angiogenèse tumorale précoce en sécrétant des facteurs de croissance tels que le PDGF, TGF β ou le VEGF, ainsi que des métalloprotéases MMP-1, MMP-3 ou MMP-9. Cette dernière assure la dégradation de la Matrice extracellulaire pour libérer indirectement des facteurs de croissance (Vérollet et al., 2011). En plus de leur implication dans l'angiogénèse, les TAMs seraient impliqués dans le processus parallèle de lymphangiogénèse qui permet l'échappement des métastases par voie lymphatique notamment grâce à la production de facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D (Schoppmann et al., 2002). Lin et ses collaborateurs ont montré chez des souris porteuses de tumeurs mammaires mais déficientes en TAM, un faible potentiel métastatique par rapport aux souris contrôle mettant en avant le potentiel métastatique que procurent ces cellules dans le MET.

Enfin, il faut noter qu'un dialogue ininterrompu existe entre les différents constituants des MET, nous pouvons citer à titre d'exemple que les Tregs décrits précédemment, en combinaison avec les cellules tumorales sont à l'origine de la production des cytokines responsables de l'induction et de la différenciation spécifique des TAM vers le phénotype immunomodulateur M2 (Lin et al., 2001).

4. LYMPHOCYTES B REGULTEURS :

4.1. HISTORIQUE ET DECOUVERTE :

La description des lymphocytes T régulateurs suggérait la possible existence de lymphocytes B régulateurs (Bregs). Ce n'est que dans les années 1970 que Neta *et al* ont démontré une absence de contrôle de la réaction d'hypersensibilité retardée cutanée chez des cochons d'inde ayant subi un transfert adoptif de splénocytes déplétés en LB (Neta and Salvin, 2015). 20 ans plus tard le rôle immunorégulateur de ces cellules a été mis en évidence par des séries d'études qui décrivent des populations de cellules B productrices d'IL-10 exerçant un rôle immunorégulateur. Les données obtenues à ce jour dans la littérature suggèrent que les Bregs ne constituent pas une seule et unique population cellulaire, mais que plusieurs sous populations peuvent être discriminées selon les conditions inflammatoires étudiées. Nous allons dans cette partie nous intéresser aux principaux phénotypes Bregs murins et humains décrits dans la littérature.

Tableau 5 : Principaux Bregs décrits dans la littérature

Bregs	Souris	Humain	Mécanismes	Références
Immature Bregs		CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	Retrouvés dans le sang périphérique et contribuent à la diminution des cellules Th1 et Th17. Ces Bregs sont déficients chez les patients atteints de lupus et d'arthrite rhumatoïde	(Blair et al., 2010)
T2-MZP	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} CD24 ^{hi} IgD ^{hi} IgM ^{hi}		Localisés dans la rate, produisent de l'IL-10, les expériences de transferts adoptifs ont montré que les Bregs induisent des Tregs et inhibent les cellules T CD4 ⁺ / CD8 ⁺	(Lindner et al., 2013)
B10	CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{hi}	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺	Localisés dans la rate aussi bien chez les souris que chez l'homme, ces cellules produisent de l'IL-10 et inhibent les cellules effectrices comme les monocytes, DCs, T CD4 ⁺	(Yanaba et al., 2008) (Iwata et al., 2011)
Tim1 B cells	Tim1 ⁺ CD19 ⁺	Tim1 ⁺ CD19 ⁺	Localisés dans la rate, ces Bregs induisent une différenciation Th-2, et leur transfert	(Ding et al., 2011)

			adoptif prévient le rejet de greffe	
Br1		CD19 ⁺ CD25 ^{hi} CD71 ^{hi} CD73 ^{low}	Localisés dans le sang périphérique, et impliqués dans la tolérance aux allergènes par production d'IL-10 et d'anticorps IgG ₄ spécifiques de l'allergène	(van de Veen et al., 2013)
Bregs PD-L1^{hi}	CD19 ⁺ CD10 ⁻ CD21 ⁺ PD-L1 ^{hi} TACI ⁺		Retrouvés dans les ganglions et ont pour rôle de réduire les Tfh CD4 ⁺ PD1 ⁺ CXCR5 ⁺ indépendamment de l'IL-10 via PD-L1	(Khan et al., 2015)
i Bregs		CD19 ⁺ CD25 ^{hi}	Localisés dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils produisent conjointement du TGFβ et de l'IDO pour induire une expansion de Tregs producteurs d'IL-10 et de TGFβ	(Nouël et al., 2015a)
Plasma -blastés	CD138 ⁺ CD44 ⁺	CD38 ^{hi} CD27 ^{hi}	Localisés dans la moelle osseuse, et les ganglions lymphatiques et responsables de la production d'IL-10	(Matsumoto et al., 2014)

A ce jour, aucun consensus global n'a été décrit pour caractériser les Bregs de la même manière que leurs homologues Tregs.

4.2. VOIES D'INDUCTION DE LA CAPACITE REGULATRICE DES BREGS :

Il est important de souligner que les descriptions retrouvées dans la littérature suggèrent que les lymphocytes B régulateurs n'exercent pas leur rôle de manière constitutive. Ces cellules ont une certaine capacité immunosuppressive qui ne s'exprime que dans un contexte cytokinique spécifique en réponse à une induction particulière responsable de l'acquisition de la fonction immunorégulatrice. L'induction de cette fonction régulatrice nécessite le passage par des voies d'activation qui seront détaillés dans les sous-chapitres ci-dessous :

4.2.1. SIGNALLISATION VIA CD40 :

Le CD40 est une protéine membranaire de la famille des récepteurs du TNF exprimée à la surface des lymphocytes B, son ligand CD40L (CD154) est quant à lui exprimé à la surface des LT. La cascade de signalisation qui résulte de leur interaction conduit à l'activation de NFAT, qui se fixe sur son élément de réponse à l'ADN pour induire la production de l'IL-10. Plusieurs études ont permis d'élucider le rôle joué par le CD40 dans l'activation des Bregs. Tout d'abord, dans un modèle de souris atteintes d'arthrite à collagène, le traitement par un anti-CD40L permet une augmentation de la production de l'IL-10 et en même temps une inhibition de la réponse Th1 (Mauri et al., 2003). Des résultats similaires sont obtenus lorsqu'on transfecte des fibroblastes avec le CD40L, ce dernier active le CD40 sur les lymphocytes B et entraîne la production d'IL-10 (Lemoine et al., 2011). Dans des études récentes, il a été démontré que les mastocytes affectent également le compartiment Breg. En effet, l'équipe de Mion a utilisé un modèle murin de colite induite par le sulfate de sodium et ils ont observé que lors de la phase de rémission, on ne retrouve pas d'augmentation de la population B19⁺IL-10⁺ lorsque ces souris étaient déficientes en mastocytes en comparaison avec des souris sauvages. Par la suite les auteurs ont évalué l'implication de l'axe CD40/CD40L dans l'interaction mastocytes et cellules B, et il ressort que l'expansion des B10 médiée par les mastocytes est partiellement abolie chez les souris traitées avec un anti-CD40L, ce qui confirme l'importance de cet axe dans l'expansion des Bregs (Mion et al., 2014)

4.2.2. SIGNALISATION DU BCR :

La signalisation du BCR est l'un des signaux majeurs d'activation des LB au cours de leur développement. Le BCR est constitué d'une immunoglobuline associée aux sous-unités de signalisation, les protéines Ig α (CD79a) et Ig β (CD79b) qui portent des motifs activateurs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-bases Activation Motifs) (figure 5). La transduction du signal nécessite la phosphorylation des motifs ITAM par une protéine de la famille Src : Lyn, qui induit le recrutement et la phosphorylation de Syk, cette dernière recrute et phosphoryle à son tour BLNK, une protéine adaptatrice qui participe à la formation du signalosome contenant plusieurs protéines dont Vav , PLC γ 2 et BTK. Cette cascade progresse en aval par différentes voies distinctes mais fortement interconnectées pour aboutir à l'activation de facteurs de transcriptions tels que NF κ B , Jun-Fos et NFAT nécessaires à l'activation des Bregs et à leur prolifération *in situ*. Les régulateurs négatifs jouent aussi un rôle important dans le

contrôle de la signalisation en faisant intervenir notamment des phosphatases membranaires telles que le CD45, cytoplasmiques telles que SHIP2 (SH2 domain containing inositol polyphosphate 5' phosphatase) qui reconnaît les motifs ITIM du fragment FC des immunoglobulines RFcγIIIB (Muta et al., 1994). L'importance de cette voie dans les fonctions régulatrices a été évaluée dans le passé par l'équipe de Matsushita dans un modèle de souris atteintes d'encéphalite auto-immune, l'étude avait démontré que le complexe du BCR avec son corécepteur CD19 était impliqué dans la production de l'IL-10, et que l'absence de ce récepteur entraînait une exacerbation de la maladie (Matsushita et al., 2008). D'autres études avec des conclusions similaires ont porté sur l'invalidation d'une des protéines nécessaires à la formation du signalosome, par exemple l'étude où des souris BLNK^{-/-} ont développé une hypersensibilité allergique de contact accrue par défaut de sécrétion d'IL-10 (Jin et al., 2013).

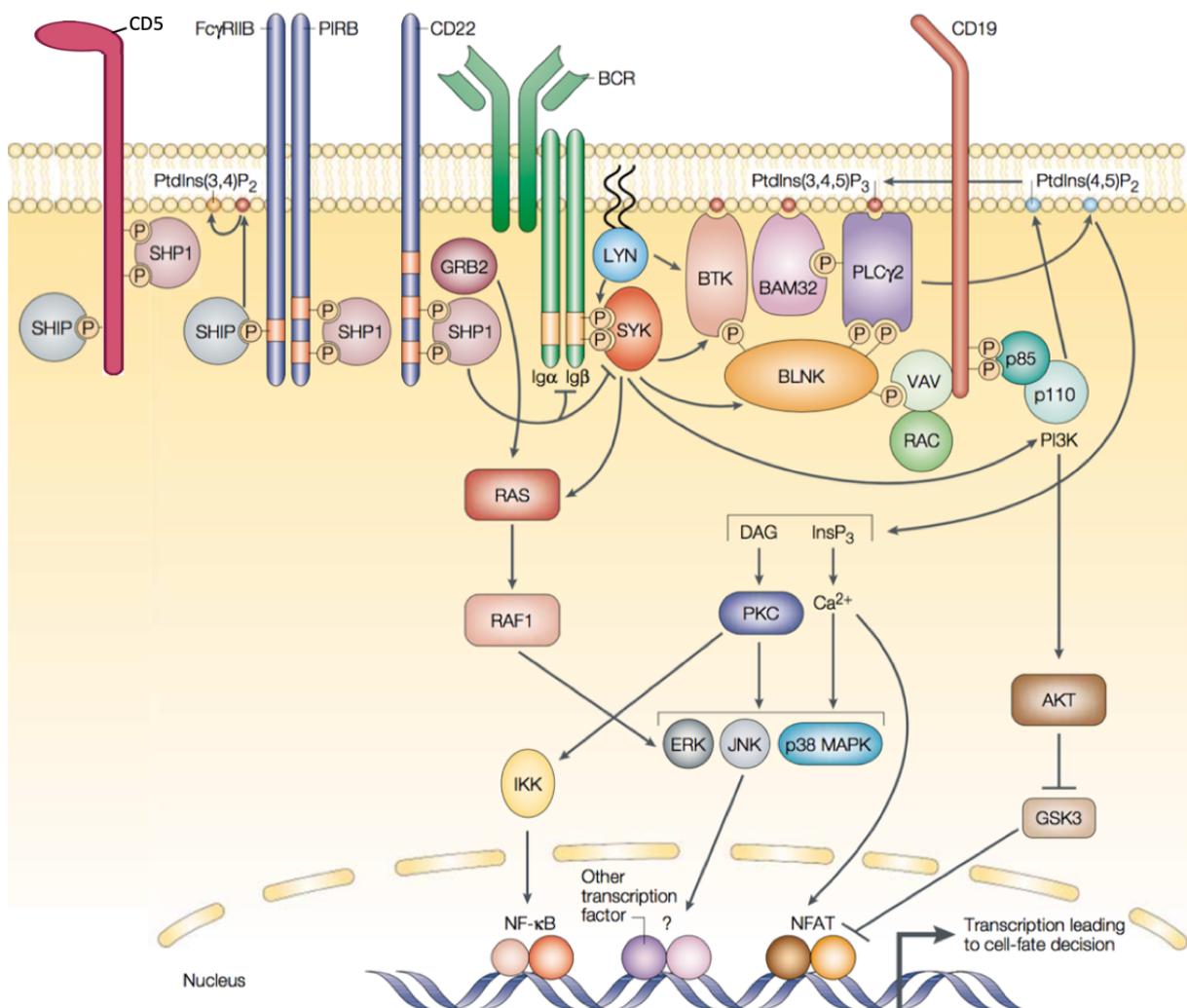


Figure 5 : Les voies de signalisation en aval du BCR adapté de Niir and Clark (2002). Après liaison de l'antigène au BCR, trois principales protéines kinases sont activées dont Lyn, Syk et Btk. En aval, du BCR, les effecteurs PI3K et PLCγ2 conduisent « in fine » à l'activation terminale de facteurs de transcription NFκB, NFAT ou AP1 des phosphatases telles SHP1 et SHIP régulent négativement la signalisation du BCR

4.2.3. IMPLICATION DES TLR :

Les « Toll Like Receptors » constituent une autre famille de récepteurs essentiels dans la régulation de l'activité des LB. Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes dérivés de divers microbes. Il a été montré que l'activation des TLR contribuait à la réponse anti-inflammatoire médiée par les LB. En effet, les cellules B10 murines stimulées par les oligonucléotides CpG (Cytosine Guanine Oligodeoxynucleotide), le LPS et le CD40L *in vitro* permettent une augmentation du pool de Breg producteurs d'IL-10 (Liu et al., 2017b). Des résultats similaires ont été retrouvés dans des études réalisées chez l'homme. La stimulation conjointe de la voie TLR9 et CD40 respectivement par du CpG et CD40L permet une augmentation de la production de l'IL-10, alors que la stimulation par du CpG seul est insuffisante à produire le même effet. En comparant cette stimulation à celle générée par le BCR (anti-IgM) il s'avère qu'elle semble plus importante, et la capacité d'inhibition de la prolifération des LT plus marquante. Ces travaux mettent en avant l'importance des TLR dans le pouvoir régulateur des LB (Bouaziz et al., 2014).

4.3. MECANISMES D'ACTION DES LB REGULATEURS :

Bien que les Bregs soient peu nombreux, ils sont essentiels à l'équilibre immunologique en régulant négativement les réactions immunitaires dans un contexte physiologique ou pathologique. En effet, de nombreux travaux menés sur les souris notamment, ont permis de mettre en évidence le rôle bénéfique des Bregs dans la résolution des processus inflammatoires et dans l'extinction des réactions inflammatoire une fois le pathogène neutralisé. L'importance d'atteindre cette homéostasie du système immunitaire a été davantage explorée dans les pathologies auto-immunes où le taux de Bregs était inversement corrélé à la progression de ces maladies. (Bouaziz et al., 2014). Ce rôle régulateur passe par la production de facteurs immunomodulateurs qui modifient le répertoire des lymphocytes T en inhibant les réponses Th1, Th17 au dépend des Tregs. Dans notre contexte, les cellules B leucémiques secrètent et excrètent bon nombre de ces facteurs responsables de la transformation en un environnement immunosuppresseur. Nous allons décrire dans les paragraphes suivants les molécules les plus importantes :

4.3.1. IL-10 :

Les cellules Bregs atténuent ou suppriment les réponses immunitaires grâce aux propriétés immunosuppressives de la cytokine immunorégulatrice la première décrite, l'interleukine 10. (Glass et al., 2022). Le récepteur de l'IL-10 est un hétéro-tétramère constitué de deux types de chaînes, la première de haute affinité (IL-10R1) est spécifique pour son ligand et la seconde (IL-10R2) partagée avec d'autres cytokines. L'IL-10 se lie dans un premier temps aux 2 chaînes IL-10R1 ce qui crée des sites de coopération avec les 2 autres chaînes de l'IL-10R2 (Pletnev et

al., 2005). Il s'en suit l'activation par transphosphorylation des résidus tyrosines de JAK1 (Janus Kinase) et de TYK2 (Tyrosine Kinase 2) liés de façon constitutive respectivement aux chaînes IL-10R1 (IL-10 Receptor 1) et IL-10R2 (IL-10 Receptor 2). Cette phosphorylation permet de recruter STAT3 qui est à son tour phosphorylé sur plusieurs résidus dont la sérine 727 et la tyrosine 705 avant de former des homo et des hétérodimères avec les autres membres de la famille STAT (STAT1, STAT3, STAT5). Les dimères formés migrent alors dans le noyau pour réguler l'expression de gènes cibles spécifiques (Wehinger et al., 1996). L'IL-10 exerce des effets pléiotropes, elle est capable d'augmenter la survie, la prolifération et les métastases des tumeurs en prenant le contrôle de l'immunité anti-tumorale et ce en exerçant des effets directs sur les cellules NK et LT CD8. Dans des travaux récents, il a été confirmé de nouveau, que des lymphocytes B de patients atteints de carcinome thyroïdien ont la faculté de supprimer la fonction des cellules effectrices T CD4 et T CD8 et d'augmenter en contrepartie l'infiltration des Tregs dans les tumeurs. Des études similaires dans le contexte du carcinome gastrique viennent confirmer ces travaux en indiquant que l'IL-10 produit par les lymphocytes B atténue la production de TNF- α , d'IFN γ et d'IL-17 et assure la conversion des cellules T effectrices en des cellules T productrices d'IL-10. (Mirlekar, 2022)

4.3.2. TGF β :

La famille du TGF β présente 3 isoformes (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) impliquées dans une grande variété de processus biologiques tels que l'apoptose, la motilité, la tumorigénèse et la prolifération. Bien que chacune des isoformes ait un rôle précis, leur mécanisme de signalisation est le même.

Les voies décrites précédemment pour réguler la production de l'IL-10 telles que BCR, CD40/CD40L et TLR le sont également pour la production du TGF β (Saulep-Easton et al., 2016).

La liaison de la cytokine TGF β à la chaîne T β RII engendre la phosphorylation de la seconde chaîne T β RI, qui à son tour active son principal substrat intracellulaire de la voie canonique : la protéine Smad (Suppressor of mother against decapentaplegic) ; cette protéine phosphorylée dans le cytoplasme s'hétérodimérise pour passer la membrane nucléaire et exercer ses effets transcriptionnels sur un ensemble de gènes cibles. D'autre part, Le TGF β active également une voie non-canonique dépendante de la protéine TAK1 (TGF- β activated kinase 1), son activation est totalement indépendante du T β RI et induit la phosphorylation en aval des protéines JNK et p38 (Pereira et al., 2013).

Outre les processus biologiques cellulaires, les signalisations canonique et non canonique du TGF β favorisent un biais de différents métabolismes énergétiques en modulant l'expression des gènes impliqués comme mTOR dans l'OXPPOS (Oxydative phosphorylation),IDO dans le métabolisme des acides aminés ou encore NFAT, GLUT (Glucose Transporter) dans le métabolisme glycolytique contribuant ainsi à la propagation métastatique de certains cancers. (Angioni et al., 2021)

Parmi ces 3 formes, le TGF β 1 est la plus étudiée dans les fonctions immunorégulatrices des lymphocytes T et B. Une étude basée sur des patientes atteintes d'un cancer avancé du sein a montré une amplification du facteur HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) à mesure que la proportion des cellules Tregs augmentait ; cette amplification était également corrélée à une expression élevée de cellules Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} exprimant le TGF β (Gheybi et al., 2017).

Une étude récente réalisée par l'équipe de Risson a montré que le TGF β 2 en association avec d'autres facteurs favorise la dormance des cellules tumorales disséminées dans la moelle osseuse par l'activation de la voie de quiescence dépendante du TGF β 3. (Nobre et al., 2021)

Divers travaux ont étudié l'importance de la cytokine TGF β 1 essentiellement dans la fonction régulatrice des Bregs. Les études de Goenka et al. sur des souris infectées par *Brucella spp* ont montré que l'élimination du foyer infectieux est plus efficace lorsqu' à la fois l'IL-10 et le TGF β sont neutralisés par rapport à un seul agent éliminé (Goenka et al., 2011).

4.3.3. GRANZYME B :

En dehors de son activité cytotoxique dans les NK et les cellules T cytotoxiques déjà décrite dans un chapitre précédent (cf), le Granzyme B exprimé par les cellules B régulatrices pourrait également jouer un rôle dans l'immunomodulation. En effet, son expression dépend particulièrement d'une stimulation par l'IL-21 produite par les lymphocytes T CD4. L'équipe de Linder a montré une suppression de la prolifération des lymphocytes T effecteurs de manière dépendante du granzyme B et ce non pas par un mécanisme d'apoptose dépendante des caspase 3 comme décrit précédemment mais plutôt au travers d'une dégradation du TCR, ce qui suggère un rôle du granzyme issu des Bregs dans ce dialogue modulateur (Lindner et al., 2013).

4.3.4. IL35 :

Cette cytokine plus récemment découverte de la famille de l'interleukine 12 est un hétérodimère composé des deux sous-unités : p35 et EBi3 (Epstein-Barr virus induced 3). Deux groupes de chercheurs utilisant des approches complémentaires ont mis en évidence une nouvelle sous-population de lymphocytes B régulateurs, nommée i35-Bregs. Tout d'abord les travaux de Wang et ses collaborateurs ont montré que l'uvéite induite sur un modèle murin pouvait être améliorée par un traitement à base d'IL-35 recombinante, qui répond par une hausse des cellules B productrices d'IL-10. Les mécanismes qui régulent cette immunosuppression restent encore mal compris (Wang et al., 2014). De leur côté, Shen et al. ont mené des travaux sur l'EAE (encéphalomyélite allergique expérimentale) induite dans un modèle murin dont les lymphocytes B sont p35^{-/-} et EBi3^{-/-} ; on constate alors une réponse aggravée de l'EAE avec augmentation du nombre de lymphocytes Th17 et T CD4⁺ producteurs

d'IFN γ . En revanche, ces souris ont montré une nette résistance à l'infection par l'entérobactérie intracellulaire *Salmonella enteritica* sérovar Typhimurium en comparaison avec des souris sauvages (Shen et al., 2014). De manière connexe, ces études montrent que les Bregs limitent la pathogénèse de l'uvéite et de l'encéphalomyélite grâce à l'apport de l'IL-35 (Choi and Egwuagu, 2021).

4.3.5. FOXP3 :

Le facteur de transcription de la famille Forkhead, FoxP3, s'est révélé d'une importance cruciale pour le développement et la fonction des cellules T régulatrices. L'expression de FoxP3 a longtemps été restreinte aux seuls lymphocytes T régulateurs, mais des travaux récents ont décrit l'existence de populations B régulatrices qui expriment FoxP3 dans différentes maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque, la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux diffus (de Andrés et al., 2014)(Guo et al., 2015)(Vadasz et al., 2015a). De manière intéressante, l'expression de FOXP3 a également été rapportée dans des tumeurs solides murines, ainsi que dans des lignées cellulaires issues de tumeurs solides humaines. Sa détection dans des biopsies tumorales est souvent associée et justifiée par la présence d'un infiltrat lymphocytaire régulateur (Vadasz and Toubi, 2017). En revanche, le rôle de ce facteur de transcription, ainsi que son impact sur la progression tumorale, restent incertains.

4.3.6. IDO1 :

L'Indoleamine 2,3-dioxygénase 1 est une enzyme métabolique immunorégulatrice qui participe aux mécanismes d'immuno-échappement tumoral, comme elle a fait l'objet d'une partie de mes travaux de thèse, j'ai choisi de développer son analyse dans la littérature dans le dernier chapitre de ce manuscrit (cf. Chapitre III)

4.4. IMMUNOSURVEILLANCE DANS LA LLC :

Nous avons décrit jusqu'ici les acteurs et étapes de la réponse immunitaire anti-tumorale et les mécanismes qu'utilisent les cellules tumorales de façon générale pour échapper au système immunitaire, dans les paragraphes qui suivent je résumerai les mécanismes d'immunorégulation plus spécifiquement mis en place dans la LLC.

4.4.1. MECANISMES DE PROLIFERATION ET DE SURVIE :

La dérégulation du système de défense de l'organisme dans la LLC se matérialise par une forte incidence du risque infectieux et de l'émergence de maladies auto-immunes ; conséquences d'une perturbation du système immunitaire au profit de la prolifération et de la survie du clone LLC et qui empêche la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale correcte. La complexité de cette hémopathie repose notamment sur l'interaction entre les cellules B-

LLC et le microenvironnement tumoral. En effet, il a été longtemps admis que les cellules B-LLC s'accumulaient suite à un défaut du processus d'apoptose avec notamment la surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2, (Del Gaizo Moore et al., 2007). Il a été plus récemment établi qu'il existe un pool prolifératif de ces cellules, responsable du profil progressif de la LLC. Cette population cellulaire siégerait dans les ganglions lymphatiques, désorganisant ainsi l'architecture normale d'un ganglion où les centres germinatifs seraient remplacés par des pseudo-follicules riches en cellules leucémiques, en LT et en cellules mésenchymateuses dérivées du stroma médullaire (CSM) (Vandewoestyne et al., 2011). Les CSM jouent un rôle très important. En effet, les B-LLC vont éduquer ces cellules à leur profit à la fois par contact direct en activant la signalisation de la PI3K et de NFκB et en assurant la sécrétion de VEGF (Ding et al., 2010), mais aussi via les exosomes libérés par un mécanisme d'exocytose, ces microvésicules ont été décrites comme contenant des protéines et des miRNA responsables de l'augmentation du potentiel tumoral en terme de prolifération et de migration cellulaire (Paggetti et al., 2015).

Un des mécanismes qui conduit à la survie du clone leucémique est l'expansion anormale de B-LLC aux propriétés anergiques. Cette anergie définie comme une absence de réponse à l'antigène est plus marquée dans le groupe de patients dont l'IGHV est muté et est associée à une résistance accrue à l'apoptose (Apollonio et al., 2013). Les travaux de Drennan et al. avaient montré que des forts niveaux d'IL-10 produits par les cellules B-LLC étaient corrélés avec une faible capacité de signalisation, faisant de l'IL-10 un nouveau marqueur de l'anergie et indirectement de la survie cellulaire (Drennan et al., 2017)

Les cellules B-LLC augmentent également leur survie *via* plusieurs autres mécanismes cellulaires comme par exemple l'interaction entre le CD40 et le CD40L exprimé sur les lymphocytes T ou encore par l'intermédiaire du facteur d'activation des cellules B (BAFF) de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF). La production autocrine de BAFF par les B-LLC a été rapportée comme étant un facteur clé de la persistance du clone tumoral (Saulep-Easton et al., 2016). En effet, BAFF peut agir à la fois sous sa forme transmembranaire et sous sa forme soluble en interagissant avec trois récepteurs apparentés, à savoir le BAFF-R (récepteur de BAFF), BCMA (B-Cell maturation antigen) et TACI (transmembrane interactor and calcium modulator and cylophilin ligand interactor). Il a été de plus récemment décrit que BAFF participe à la résistance des cellules B malignes à l'idéalisib, à l'ibrutinib et au vénétoclax en maintenant la survie et en empêchant l'apoptose des cellules B-LLC (Tandler et al., 2020). Enfin, nous pouvons aussi citer APRIL (A proliferation inducing ligand) une autre protéine de la famille du TNF qui induit également la prolifération et fonctionne de même avec ce réseau cytokinique en passant par les récepteurs BCMA et TACI. Elle serait donc également un facteur de survie autocrine pour les cellules malignes de la LLC. Cette cytokine a fait récemment l'objet d'une étude afin de la définir comme un marqueur pronostic chez les patients atteints de LLC, mais, il n'a pas pu être établi de seuil des taux sériques d'APRIL pouvant prédire le délai avant traitement (Esatoğlu et al., 2021).

4.4.2. ROLE DES NLC DANS LA LLC :

Parmi les cellules qui constituent le microenvironnement ganglionnaire, les NLC (nurse like cells) ont montré de véritables fonctions pro-tumorales. Dérivant du lignage myélomonocytaire, elles sont considérées comme des TAM M2 de la LLC (Munk Pedersen and Reed, 2004). Elles ont d'abord été caractérisées comme étant impliquées dans la survie des B-LLC notamment par la production de BAFF et APRIL qui interviennent via les mécanismes décrits auparavant, mais aussi par l'intermédiaire de la chimiokine CXCL12, qui, une fois liée à son récepteur CXCR4 active la voie AKT-ERK et augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique MCL-1 (Nishio et al., 2005). CXCL12 joue également un rôle dans la rétention ganglionnaire des B-LLC par un mécanisme de régulation négative de S1PR (Sphingosine 1 phosphate receptor 1) qui permet aux B de LLC de rester au contact des NLC (Borge et al., 2014). Enfin ces NLC produisent des facteurs régulateurs très proches de ceux produits par les Bregs tels que le TGF β et l'IL-10, (Ysebaert and Fournié, 2011)(Giannoni et al., 2014). Une étude très récente de notre laboratoire a montré pour la première fois que ces cellules sont aussi capables de produire la chimiokine CCL21, qui une fois sécrétée, reste fixée à la membrane et attire vers elle les cellules B exprimant le CCR7 montrant un rôle des NLC dans la rétention des LB dans les ganglions (Zaaboub et Al, 2022).

4.4.3. ROLE DES BREGS DANS LA LLC :

En parallèle de cette dérégulation de la réponse immunitaire physiologique médiée par les cellules du microenvironnement, il existe également une modulation par une sous population des cellules B leucémiques elles-mêmes dites régulatrices. Quelques études se sont attachées à plus spécifiquement étudier les sous-populations Bregs dans la LLC (DiLillo et al., 2013) (Drennan et al., 2017). Du fait que les B-LLC sécréteurs d'IL-6, IL-10 et TGF β présentent des caractéristiques phénotypiques communes avec les Bregs (expression de CD5, CD27, CD38) et du fait de l'existence d'un déficit fonctionnel marquant des LT dans la LLC, plusieurs équipes ont tenté de caractériser les sous-populations tumorales sécrétrices d'IL-10 d'un point de vue phénotypique et fonctionnel (Mohr et al., 2016). En lien avec ces cellules régulatrices, le répertoire lymphocytaire T est fortement altéré dans la LLC. Ainsi, on retrouve une hausse du nombre de Tregs corrélée avec l'évolution de la maladie, les LT CD8 malgré un phénotype activé présentent un profond défaut de cytotoxicité et une incapacité à proliférer (D'Arena et al., 2011). Une forte expression de marqueurs d'épuisement tels que PD1 est observée sur les cellules T CD4 et T CD8 (McClanahan et al., 2015). NKG2D (Natural Killer Group 2D), un récepteur activateur clé dans la réponse anti-tumorale est faiblement exprimé dans les cellules NK. La fonction altérée des NK serait néanmoins réversible dans la LLC, au cours d'un traitement par le lénalidomide (Acebes-Huerta et al., 2014).

CHAPITRE 3 : L'ENZYME IMMUNOREGULATRICE INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE (IDO)

1. INTRODUCTION :

Plusieurs mécanismes contribuent au défaut de reconnaissance anti-tumorale et aux échecs des immunothérapies menées lors d'essais cliniques. Il est maintenant établi que certains de ces mécanismes font intervenir la protéine IDO qui est fortement utilisée par les cellules tumorales au dépend de la surveillance anti-tumorale. Cette protéine est une enzyme métabolique dont l'expression est induite par des stimuli inflammatoires tels que l'interféron gamma pour catalyser la transformation du tryptophane en divers dérivés d'Indoleamine. Cette induction est retrouvée dans de nombreux cancers parmi lesquels la leucémie lymphoïde chronique et elle contribue largement à la progression tumorale. Ce chapitre regroupera les données actuelles sur la structure, les fonctions et l'influence de cette enzyme sur la réponse immunitaire anti-tumorale.

2. LA VOIE DU CATABOLISME DU TRYPTOPHANE :

2.1. LE TRYPTOPHANE :

Le tryptophane (Trp/w) est l'acide aminé (AA) le plus rare puisqu'il n'est présent que dans 1% des protéines cellulaires, exception faite des protéines participant à la réponse inflammatoire aigüe où l'on retrouve un pourcentage plus élevé. Cet acide aminé aromatique est aussi dit "essentiel" car il est l'un des 9AA que le corps humain ne peut pas synthétiser et qui devra être apporté par l'alimentation (Le Floc'h et al., 2011). En dehors de son utilisation lors de la biosynthèse protéique, le Trp joue un rôle clé dans la synthèse d'un neuromédiateur : la sérotonine (5-HT = 5-hydroxytryptamine) au niveau gastro-intestinal et dans le cerveau afin de réguler l'appétit et l'humeur. La sérotonine une fois synthétisée devient à son tour précurseur de la mélatonine, une hormone responsable de l'homéostasie du cycle circadien (Robinson et al., 2020). On comprend ainsi pourquoi tout déséquilibre dans le métabolisme du Trp influe directement sur l'apparition de troubles neurologiques et psychiatriques. (Schwarcz and Stone, 2017). Cependant, seuls 5% du Trp catabolisé serviront à la production de la sérotonine alors que 95% seront utilisés dans la voie de la kynurénine, cette dernière étant sous la dépendance de l'enzyme indoleamine-2,3-dioxygénase (Richard et al., 2009).

2.2. LA VOIE DE LA KYNURÉNINE :

La TDO (Tryptophane-2,3-dioxygénase), IDO1 et IDO2 sont responsables de la catalyse de la première étape limitante de la dégradation du tryptophane en un composé instable la N-formylkynurénine. Cette dernière si elle n'est pas rapidement convertie en L-kynurénine par l'enzyme arylformamidase ou en milieu acide, sera dégradée. La kynurénine à son tour subit une séquence de transformations enzymatiques par différents enzymes métaboliques pour

généraliser une multitude de sous-produits qui seront toujours appelés kynurénines. Biochimiquement, ces réactions conduisent également à la génération du NAD (nicotamine adénine dinucléotide) un effecteur important des réactions d'oxydo-réduction dans les mitochondries. Les différentes recherches menées sur la kynurénine et ses métabolites ont grandement contribué à démontrer que ces molécules semblent fortement impliquées dans les mécanismes physiopathologiques chez l'homme et tout particulièrement dans le cancer (Richard et al., 2009)

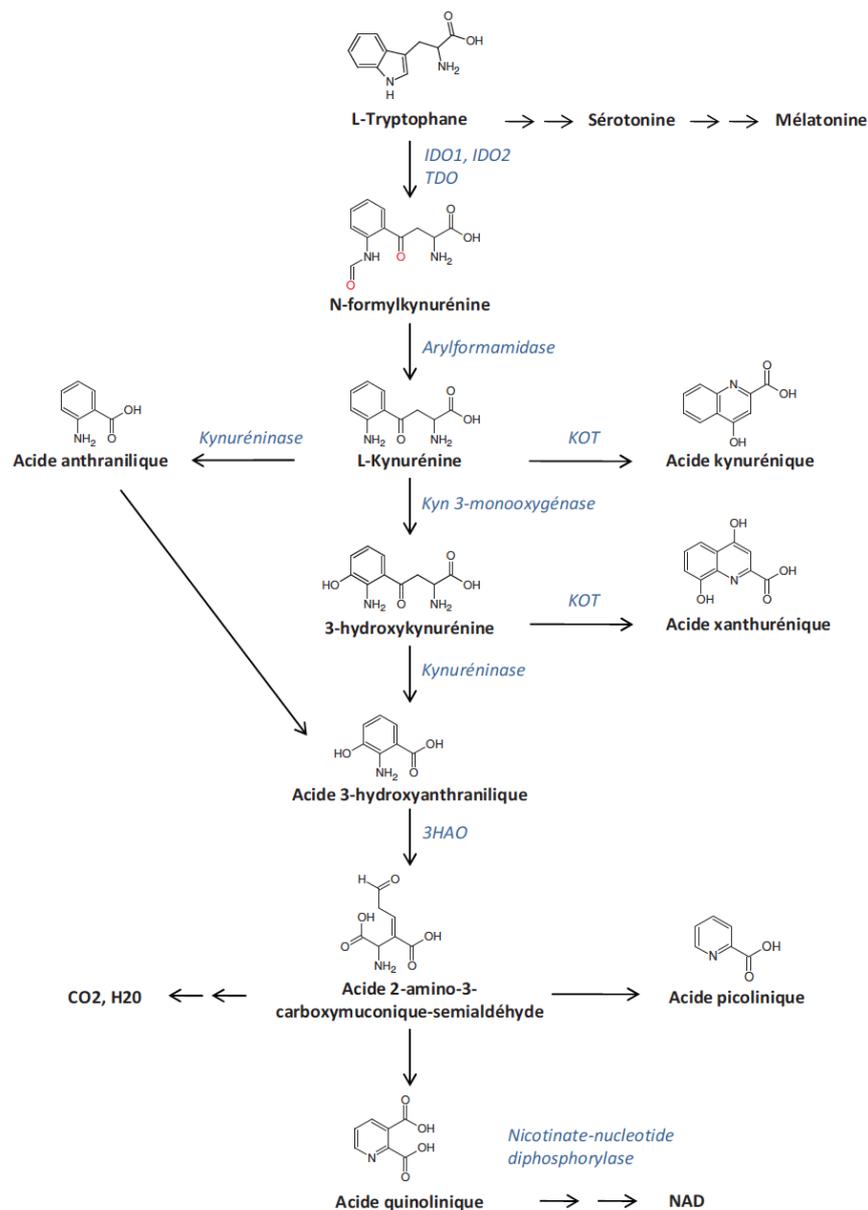


Figure 6 : La voie des Kynurénines (d'après Barth Heidi) TDO : tryptophane-2,3-dioxygénase ; KOT : kynurénine-oxoglutarate transaminase ; 3HAO : 3-hydroxythranilate-3,4-dioxygénase ; NAD : nicotamide adénine dinucléotide

3. TROIS DIOXYGENASES POUR CATALYSER LA MEME REACTION :

Biochimiquement, le TDO, IDO1 et IDO2 contrôlent la première étape du catabolisme du Trp conduisant à la production du cofacteur enzymatique la NAD. Cependant, le TDO et IDO2 sont restreints à certains tissus et exercent une activité catalytique nettement plus faible que IDO1, ce qui limite fortement leur implication dans la régulation immunitaire.

3.1. TDO :

La TDO fut la première enzyme découverte en 1936 par Kotake et al. à partir d'extrait de tissu hépatique de lapins. (Kotake et al., 1936), il a fallu plusieurs années pour caractériser cette molécule comme étant un homotétramère de 134kDA qui assure l'interaction puis la catalyse spécifique de la L-Trp (Zhang et al., 2007). Le rôle que joue TDO est restreint aux tissus dans lesquels il est fortement exprimé. En effet, dans le foie il régule l'excès de Trp généré pendant la diète afin de maintenir une homéostasie des niveaux alimentaires de Trp (Le Floc'h et al., 2011). Par ailleurs, en plus d'être le garant de l'équilibre plasmatique du Trp dans l'organisme, plusieurs études récentes impliquent le TDO dans les maladies liées aux troubles du système nerveux central (Höglund et al., 2019) et dans les réponses immunitaires anti-tumorales. Il n'est cependant pas retrouvé coexprimé avec IDO1, du moins dans le modèle du glioblastome (Schramme et al., 2020) (Hoffmann et al., 2020).

3.2. IDO1 :

IDO1 a été mise en évidence quelques années après TDO, en 1967, à partir d'extraits d'intestins de lapins (Yoshida et al., 1981). Une très faible homologie existe entre TDO et IDO1 ce qui suggère que les deux isoenzymes ont évolué séparément mais ont conservé une même fonction. L'expression d'IDO1 est ubiquiste, on la retrouve dans les tractus digestif et respiratoire, le système nerveux central, les reins, la rate, le placenta, ainsi que dans les CPA du système immunitaire (Carlin et al., 1989). Contrairement à TDO, dans un contexte physiologique, l'expression d'IDO1 est assez faible, mais elle peut augmenter dans certaines circonstances telles que l'inflammation, les allergies ou encore les cancers. Compte-tenu de l'implication de IDO-1 dans divers mécanismes physiopathologiques, sa large distribution et sa forte activité catalytique elle a fait l'objet d'études et de recherches plus approfondies. Nous décrivons plus en détails cette isoforme dans le chapitre suivant.

3.3. IDO2 :

L'IDO2 est la troisième et la dernière Indoleamine découverte à l'heure actuelle (Ball et al., 2007). Elle partage avec IDO1 une forte homologie au niveau des acides aminés. Même si IDO2 a été détectée à des niveaux élevés dans certains cancers, les mécanismes dans lesquels elle intervient ne sont pas encore très bien compris. Compte-tenu de son faible potentiel enzymatique sur la L-Trp, certains auteurs ont même spéculé sur un potentiel autre rôle que celui de enzymatique décrit pour IDO1 (Mandarano et al., 2020)

4. L'INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE

Dans ce chapitre nous définirons plus explicitement les modalités d'expression d'IDO1 ainsi que sa fonction biologique. Ce chapitre sera plus focalisé sur IDO1 par rapport à IDO2 et TDO puisque cette enzyme est impliquée de manière prépondérante dans les mécanismes de régulation immunitaire. Le terme générique « IDO » sera employé pour cette revue de la littérature et l'isoforme sera indiquée lorsqu'une analyse a montré une spécificité.

4.1. LE GENE IDO

Un seul gène situé sur le bras court du chromosome 8 humain et murin code pour la protéine IDO. Il est constitué de 10 exons répartis sur environ 15 kilobases de bases d'ADN. Bien que les fonctions d'IDO aient fait l'objet d'adaptations au cours de l'évolution, le gène a été conservé (Suzuki et al., 2003). La transcription du gène IDO est étroitement régulée en réponse à des stimuli inflammatoires transmis par des cellules spécialisées. L'étude du promoteur du gène IDO (aussi appelé INDO) a permis de mieux appréhender la régulation de l'expression de la protéine. On retrouve sur le promoteur d'IDO un ensemble d'éléments de réponse à la stimulation par les interférons, avec 3 séquences GAS (Gamma Interferon Activation Sequences) et 2 séquences ISRE (Interferon Stimulated Response Elements). En réponse à la stimulation par l'IFN γ , le facteur de transcription p-STAT1 se fixe sur les éléments de réponse GAS-1, GAS-2 et GAS-3 alors que le facteur IRF1 (Interferon Regulatory Factor), lui-même induit en réponse à l'interféron, se lie aux ISRE-1 et ISRE-2 (figure 7). Pour obtenir une induction maximale de IDO à la suite d'une stimulation par l'IFN γ , une coopération entre les 2 facteurs liés aux séquences GAS et ISRE est nécessaire (Chon et al., 1996).

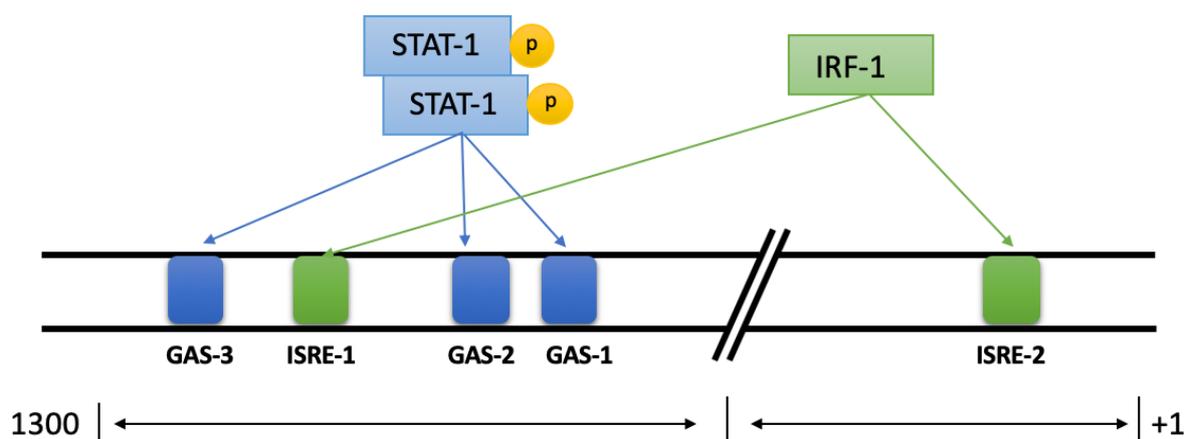


Figure 7 : Régions régulatrices sur le promoteur du gène IDO1 (adapté de Robinson et al., 2003) Deux séquences ISRE et 3 séquences GAS sont sous le contrôle des facteurs de transcriptions IRF1 et STAT1 respectivement

Le promoteur de IDO porte également des séquences consensus autres que GAS et ISRE qui permettent la fixation d'autres facteurs de transcription tels que : NF- κ B , C/EBP- β ou encore AP-1 (protéine activatrice 1) (Robinson et al., 2005) (Fujigaki et al., 2006).

4.2. LA PROTEINE IDO

4.2.1. FONCTION ENZYMATIQUE

IDO1 est une protéine α -hélicoïdale monomérique de 45 kDa. Elle est constituée de 403 AA ainsi que d'une molécule d'hème indispensable à son activité catalytique, les mécanismes cellulaires qui fournissent de l'hème exercent ainsi un contrôle sur l'activité de l'enzyme (Biswas et al., 2022). La résolution de la structure cristallographique de l'enzyme a montré que IDO1 est subdivisée en 2 domaines, un grand domaine C-terminal et un petit domaine N-terminal positionné au-dessus. Le petit domaine comprend 2 motifs inhibiteurs fonctionnels à base de tyrosine des immunorécepteurs (ITIM ; Y111 et Y249) dont le rôle sera détaillé dans les prochains paragraphes (Albini et al., 2017). Le grand domaine contient le site catalytique d'IDO, ce site ne comporte pas d'AA polaire à l'exception de la sérine 167, ainsi cette zone sert de site de fixation au noyau indole hautement hydrophobe du Trp. L'entrée du site actif est quant à elle pourvue d'un segment protéique dynamique de 20 AA (résidus 360 – 380) appelée boucle JK (JK-LOOP) qui relie les hélices J et K pour contrôler l'accès au site catalytique. En fonction de la présence du substrat L-Tryptophane ou d'inhibiteurs cette structure peut adopter trois types de conformations : fermée, intermédiaire et ouverte conditionnant ainsi l'activité catalytique. Cette boucle est située au contact de l'hème (Greco et al., 2019). Le site héménique quant à lui, est responsable de la fixation de l'oxygène moléculaire O₂ qui induit la réaction de dioxygénase catalysée par IDO en incorporant deux atomes d'oxygène dans le substrat (Sugimoto et al., 2006).

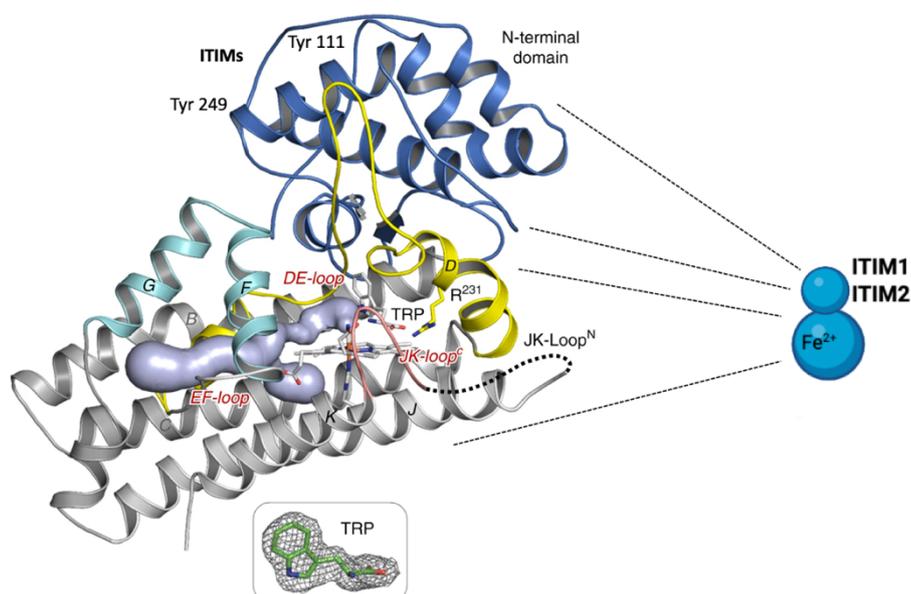


Figure 8 : Structure cristalline d'IDO1 et du Trp (adapté de Lewis-Ballester et al., 2017). La ligne pointillée noire indique la JK-Loop désordonnée. La surface teintée bleu clair illustre un tunnel d'accès au site actif qui pénètre à travers la boucle EF vers F270 dans l'E-Helix, le long d'un côté de l'E-Helix où il se divise en 2 branches atteignant la partie distale poche hémiques proximales

4.2.2. FONCTIONS DE SIGNALISATION :

4.2.2.1. SIGNALISATION VIA LES MOTIFS INHIBITEURS

Outre le rôle métabolique d'IDO, une fonction de signalisation a été plus récemment décrite pour IDO1 après l'identification de 2 séquences d'AA hautement conservées appelées ITIM1 et ITIM2 situées au niveau du petit domaine non catalytique de la protéine. Pallotta et al. ont démontré que parmi les kinases susceptibles de phosphoryler IDO1 sur les résidus Y115 et Y249 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), parmi lesquelles: Zap70, LCK (Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase), Lyn (LCK Yes Novel tyrosine kinase), Fyn (Fyn proto-oncogene, Src family Tyrosine kinase), CSK (C-terminal src kinase), Fyn était la plus largement exprimée. L'inhibition sélective de Fyn a considérablement altéré la phosphorylation d'IDO1 (Pallotta et al., 2011). Cependant, dans d'autres types cellulaires telles que les cellules dendritiques conventionnelles (cDC), c'est plutôt la kinase Src (Src proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase) qui est impliquée dans ce mécanisme (Bessede et al., 2014a).

Une fois les ITIMs d'IDO1 phosphorylés, ils servent de sites de fixation pour différents partenaires moléculaires contenant des domaines d'homologies à Src (SH2), et en fonction du contexte inflammatoire et des molécules inductrices, l'expression d'IDO peut être modulée à la hausse ou à la baisse pour répondre aux divers besoins immunologiques. A titre d'exemple de ces modulations opposées, nous pouvons citer les mécanismes induits par deux cytokines aux effets antagonistes l'IL-6 et le TGF β . Orabona et al ont ainsi montré que l'IL-6 produite en milieu inflammatoire induit en coopérant avec du CD28 soluble la production de la protéine SOCS3, qui, grâce à son domaine SH2 permet l'ancrage de phospho-IDO1 préférentiellement phosphorylée sur ITIM2. Cette liaison permet de recruter un complexe E3 ubiquitine ligase grâce au domaine boîte SOCS de SOCS3 et de transférer ainsi IDO1 vers le protéasome et la dégradation. (figure 9) Ce mécanisme réduit alors la demi-vie d'IDO1 et favorise une réaction immunitaire pro-inflammatoire en interrompant les mécanismes tolérogènes (Orabona et al., 2008). Au contraire, il a été montré dans les pDC que la signalisation liée au TGF β induit l'expression des protéines SHP (SHP-1 et SHP2) qui se fixent préférentiellement sur le motif phosphorylé ITIM1 de IDO1. Les phosphatases activent alors sélectivement la voie non canonique NF- κ B et la translocation nucléaire de p52 et RelB (Oncogene Related B) pour augmenter la transcription à la fois du TGF β et d'IDO1 lui-même dans une boucle de

suractivation qui soutient un programme immunorégulateur (Albini et al., 2017)(Chen, 2011) (Cf. figure).

4.2.2.2. SIGNALISATION VIA AHR

Le récepteur d'hydrocarbure aryle (AhR) est un facteur de transcription multifonctionnel qui répond aux xénobiotiques dont la majorité sont des substances toxiques de l'environnement. Il forme alors un hétérodimère avec la protéine de translocation nucléaire AhR (ARNT) puis migre dans le noyau pour se fixer sur les promoteurs des gènes dont il contrôle l'expression comme ceux impliqués dans la défense microbienne, la migration, la prolifération cellulaire et la modulation du système immunitaire (Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018). Cette dernière fonction est dépendante et spécifique du ligand, en effet l'exposition au puissant toxique naturel le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-dioxine (TCDD) est responsable de la différenciation des LT naïfs vers des Tregs immunosuppresseurs,(Mohinta et al., 2015) tandis que d'autres ligands favorisent l'induction d'un phénotype plutôt pro-inflammatoire Th17 démontrant la plasticité de la réponse de l'AhR (Veldhoen et al., 2008). Plusieurs études suggèrent que IDO1 par l'intermédiaire de la kynurénine et l'Acide kynurénique (KYNA) activent la voie IDO1/KYN/AhR. La fixation de ces métabolites sur l'AhR stimule les LT CD4⁺ au même titre que la TCDD vers un phénotype T régulateur positif pour Foxp3⁺ (Mezrich et al., 2010)

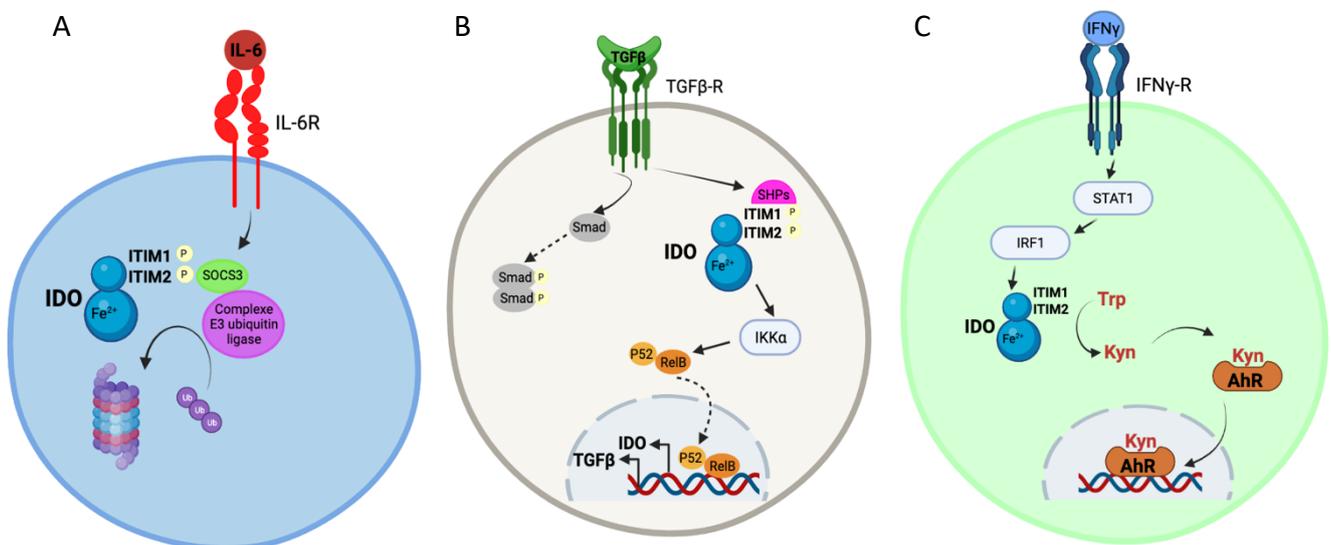


Figure 9 : Schéma récapitulatif de diverses voies de signalisation médiées par IDO. (A) Le contexte pro-inflammatoire promu par IL-6 active une cascade de signalisation qui conduit à la dégradation de IDO (B) un microenvironnement dominé par le TGFβ, régule positivement l'expression d'IDO et du TGFβ (C) Le contexte inflammatoire aigu dominé par l'IFNγ, conduit à l'activation de la signalisation via l'AhR.

5. EXPRESSION DE IDO :

5.1. EXPRESSION CONSTITUTIVE / INTRINSEQUE D'IDO1 :

IDO1 est exprimé de manière constitutive dans un groupe restreint de cellules, comprenant notamment les cellules placentaires, les endothélicytes, les cellules pulmonaires, les cellules épithéliales de la trompe de Fallope, les CPA dans les organes lymphoïdes secondaires (Théate et al., 2015). En dehors des tissus sains, l'expression constitutive d'IDO1 a été largement rapportée dans des tumeurs malignes et on retrouve une expression d'IDO1 aussi bien dans les cellules tumorales que dans les cellules qui constituent l'environnement tumoral telles que les fibroblastes et les cellules myéloïdes (Meireson et al., 2020). Un des mécanismes expliquant cette expression constitutive passe par la surexpression de la cyclooxygénase 2 (COX-2) dont le produit métabolique, la prostaglandine E2 (PGE2) se lie à son récepteur EP et active une voie autocrine de production d'IDO1 passant par les protéines PKC (protéine kinase C) et PI3K et contribuant ainsi au maintien d'un état basal d'IDO1 (Hennequart et al., 2017). Un autre mécanisme évoqué passerait par une signalisation IL-6 et AhR-dépendante dans laquelle la signalisation IL-6 conduisant à la dégradation d'IDO1 par le protéasome serait altérée dans les tumeurs conduisant à une stabilisation de la protéine (Litzenburger et al., 2014).

5.2. EXPRESSION INDUCTIBLE / EXTRINSEQUE D'IDO1 :

La principale cytokine inductrice d'IDO1 est l'interféron de type II (Interféron gamma), ce rôle important s'appuie sur la présence dans la région promotrice du gène IDO1 de plusieurs éléments de réponse à l'IFN γ . Ce mécanisme d'induction passe par le facteur STAT1 qui forme un homodimère et se lie aux séquences d'activation GAS, dans le même temps, l'IFN γ assure aussi la synthèse de NF κ B. Rappelons que NF κ B peut être induit à la fois par une voie de signalisation canonique (classique) dépendante de IKK β qui médie une réponse pro-inflammatoire (Schomer-Miller et al., 2006) et par une voie non canonique (alternative) impliquant IKK α impliquée elle dans la résolution du processus inflammatoire. Il est donc important de noter que l'IFN γ nécessite IKK α pour activer IDO1 dans le contexte de la résolution des mécanismes inflammatoires (Liu et al., 2017a). STAT1 et NF κ B transloquent dans le noyau pour induire en synergie la production d'un second facteur de transcription, IRF1 (Du et al., 2000). Les interférons de type I (IFN α et IFN β) sont également des ligands inducteurs d'IDO1, mais contrairement au type II, les facteurs de transcriptions qu'ils activent ne se fixent que sur ISRE et ont donc une moindre efficacité que l'IFN γ (Du et al., 2000). Outre les interférons, d'autres cytokines comme le TNF α , IL-1 β et IL-6 possèdent une signature pro-inflammatoire qui permet l'expression d'IDO1. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le mode d'action de ces cytokines, d'une part, il est décrit que le TNF α et IL-1 β agissent en synergie avec l'IFN γ pour induire les facteurs de transcription inducteurs eux-mêmes d'IDO1 dont STAT1, IRF1 et NF κ B, (Campbell et al., 2014). Il a également été démontré dans les monocytes que le TNF α et IL-1 β augmentent l'expression du récepteur à l'IFN γ ce qui optimise la production d'IDO1 (Shirey et al., 2006). D'autres stimuli pro-inflammatoires dont les molécules associées aux agents pathogènes nommés PAMPs présents sur divers organismes activent la réponse immunitaire innée par l'intermédiaire des TLR (Toll Like receptor), pouvant

ainsi contribuer à l'exacerbation de la réponse inflammatoire, ou au contraire à la tolérance immunitaire (Kumar et al., 2011). L'équipe de Bessede et al. a montré qu'un état d'immunosuppression pouvait être généré au cours de stimulations répétées aux LPS, mécanisme connu sous le nom de la tolérance aux endotoxines. *In vitro*, des cDC stimulés de façon répétée avec de faibles doses de LPS, augmentent la régulation de IDO1 (Bessede et al., 2014b). En parallèle, une autre étude dans les mêmes conditions et dans le même type cellulaire indique une régulation positive de l'IL-10 accentuant un mécanisme de régulation tolérogène (Salazar et al., 2017). Enfin, d'autres inducteurs d'IDO1 ont été caractérisés tel le facteur de croissance TGFβ qui intervient de nouveau plutôt dans les mécanismes de signalisation régulatrice immunitaire que dans l'activité catalytique d'IDO1.

L'engagement de co-récepteurs inhibiteurs conduit également à l'induction d'IDO1. Ce mécanisme est mis en place notamment lorsqu'une synapse immunologique est établie entre des Tregs et certains sous-types de DCs, dont les pDCs (Teft et al., 2006). Dans cette synapse on observe un engagement des co-récepteurs inhibiteurs fortement exprimés par les Treg : CTLA-4 et GITR (glucocorticoïd-induced TNF-related protein) avec respectivement les co-récepteurs CD80/CD86 et GITR-L présents sur les pDCs. Cette liaison initie une signalisation inverse dans les pDCs passant par la kinase IKKα qui active la voie alterne de NFκB pour former l'hétérodimère p52 et RelB et induire *in fine* l'expression d'IDO1 (figure 10) (Fallarino et al., 2003) (Grohmann et al., 2007). Comme les Tregs induisent l'expression de IDO1 dans les DCs, et que la différenciation vers les Tregs est elle-même sous l'influence de IDO1, on a alors l'établissement d'un réel dialogue bidirectionnel entre les Tregs et les DCs conduisant à promouvoir un microenvironnement tolérogène à travers l'expression d'IDO1 (Puccetti, 2007).

De manière intéressante l'administration de corticoïdes *in vivo* permet de réguler positivement l'expression de IDO1 par l'intermédiaire d'une expression augmentée de GITR et GITR-L respectivement à la surface des Tregs et des pDCs. Ce mécanisme explique en partie le mode d'action des AIS (Anti-inflammatoires stéroïdiens)(Grohmann et al., 2007).

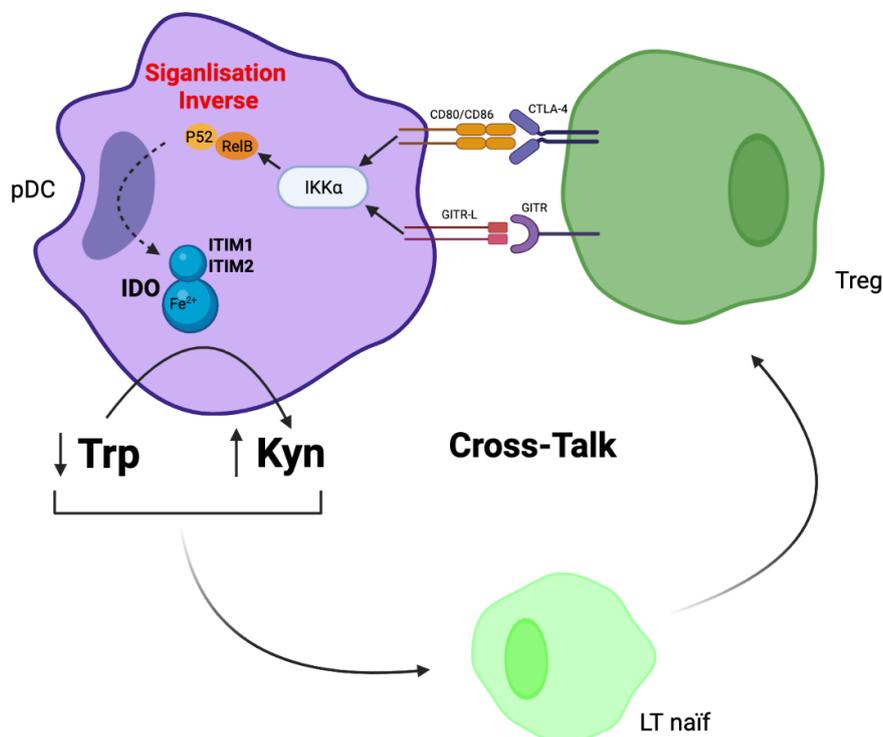


Figure 10 : Dialogue bidirectionnel entre la cellule dendritique et le lymphocyte Treg dans la promotion d'un microenvironnement tolérogène. L'engagement des co-récepteurs CTLA4, GITR par les Tregs activent la voie de signalisation de IKK α qui permet l'induction de IDO1 par les pDC responsables du catabolisme du Tryptophane en Kynurénine.

Enfin, d'autres activateurs non-immuns sont capables de stimuler l'expression d'IDO, nous pouvons citer certaines hormones comme les œstrogènes et les gonadotrophines chorioniques avec lesquelles l'expression d'IDO a pu être induite dans les DCs à la fois *in vivo* et *in vitro*. Ces observations permettent d'expliquer la rémission de certains patients atteints de maladies auto-immunes comme le diabète ou la SEP (sclérose en plaque) au cours de la grossesse (Zhu et al., 2007) (Ueno et al., 2007).

6. INFLUENCE SUR LA REPOSE IMMUNITAIRE :

6.1. EXPRESSION DE IDO DANS LES CPAs DU MICROENVIRONNEMENT :

Les CPAs sont les cellules patrouilleuses principales productrices d'IDO au cours d'une réponse inflammatoire. Cette enzyme métabolique induit une déplétion en Trp et un enrichissement en Kyn dans les CPAs elles-mêmes et dans leur microenvironnement. Les LT présents dans ce microenvironnement sont très sensibles aux variations métaboliques contrairement aux CPAs, il s'en suit une altération forte de leurs potentiels prolifératif et de différenciation (voir plus bas) (Munn and Mellor, 2013). Seymour et ses collaborateurs ont montré que les CPAs disposent de mécanismes d'échange entre Trp/Kyn. En effet ces cellules sont capables d'accumuler du Trp à partir du milieu extracellulaire et d'expulser la Kyn en excès. Cet échange contribue à dépléter davantage le milieu en Trp et à accumuler davantage de Kyn toxique pour les LT situés à proximité (Seymour et al., 2006).

6.2. IMPACT DE IDO SUR LES LYMPHOCYTES TREGS :

6.2.1. LA DEPLETION EN TRYPTOPHANE :

Les cellules immunitaires sont largement tributaires des AA pour assurer leurs besoins métaboliques et proliférer. Ce besoin en AA devient plus important lorsqu'elles rencontrent l'antigène et sont activées. De ce fait, toute déplétion en AA peut compromettre la réponse immunitaire et s'inscrit alors dans un mécanisme de "famine" (McGaha et al., 2012). Cette notion de famine revient à celle d'un stress métabolique lié à la variation de la concentration en Trp du fait de l'activation de IDO. Ce stress est perçu par différents « sensors » en particulier ceux de la cellule T. Parmi eux :

- La Kinase **GCN2** (General Control Non depressible 2) : il s'agit d'un capteur moléculaire de privation de Trp qui s'active lors d'accumulation d'ARNt non chargés en AA dans la cellule. Il n'y a alors plus d'activation du facteur initiateur de la traduction eIF2A (eukaryotic translation initiation factor 2A) conduisant à une baisse de transcription et une interruption du cycle cellulaire (Tomé, 2021)
- **mTOR** (mamalian target of rapamycin) : Cette protéine intègre les signaux hormonaux, métaboliques et énergétiques de l'environnement. Elle n'est pas spécifique d'une voie de signalisation particulière mais est située au carrefour de plusieurs voies, jouant ainsi un rôle central dans les processus de différenciation des cellules immunitaires (Cheng et al., 2022) (figure 11).

En termes de mécanisme, cet appauvrissement en Trp détecté par le sensor GCN2 aura un effet distinct en fonction du type de LT. On observe une profonde anergie fonctionnelle des LT CD8⁺ avec blocage dans le cycle cellulaire, une interruption de la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en effecteurs Th17 au profit d'un profil régulateur et un maintien de l'activation des Tregs matures (Munn et al., 2005) (Sundrud et al., 2009).

6.2.2. L'ACCUMULATION DE KYNURENINE

En plus de l'épuisement du Trp, il a été observé que certains produits en aval de sa dégradation tels que la Kyn, la 3-HK (3-Hydroxykynurénine), 3-HAA (3-Hydroxyanthranilic acid) et QUIN inhibent significativement la prolifération des LT activés et la polarisation des T naïfs en Th17 au profit d'un phénotype T régulateur CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ *in vitro* (Terness et al., 2002). *In vivo*, le traitement de souris avec de la L-kyn favorise l'installation d'une tolérance immunitaire et réduit les mécanismes inflammatoires dans diverses maladies inflammatoires et allergiques (Desvignes and Ernst, 2009). La Kyn agit via son récepteur AhR aux multiples fonctions dont l'immunosuppression et l'échappement tumoral (Opitz et al., 2011).

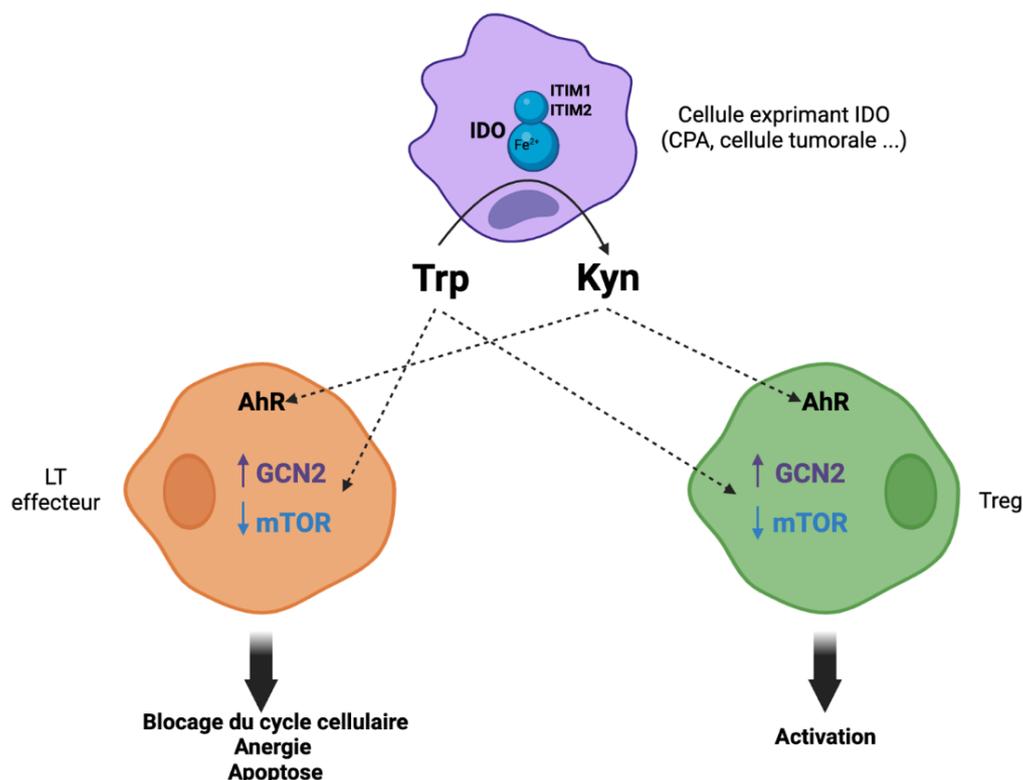


Figure 11 : Impact de la déplétion du tryptophane et de l'enrichissement en Kynurénine sur les lymphocytes T. L'appauvrissement du milieu en Trp et l'accumulation de Kyn sont détectés par les sensors GCN2 et mTOR qui activent des voies de signalisation dans les cellules T effectrices et régulatrices responsables de mécanismes biologiques tels que l'Anergie, l'activation et l'apoptose.

7. IMPLICATION DE IDO DANS LES PATHOLOGIES :

7.1. PATHOLOGIES NON-INFECTIEUSES :

7.1.1. TOLERANCE FŒTO-MATERNELLE

Le fœtus peut être présenté vis-à-vis de sa mère comme une greffe semi-allogénique car il possède des gènes d'héritage paternel qui codent pour des antigènes d'histocompatibilité étrangers à la mère, ainsi le système immunitaire doit s'adapter. Pour ce faire, les cellules du cytotrophoblaste répriment l'expression des molécules de CMHI et CMHII d'une part et surexpriment les molécules de HLA-G d'autre part, ces dernières se lient aux récepteurs inhibiteurs KIR afin de prévenir l'activation des cellules NK maternelles (Carosella, 2014). Ce n'est qu'en 1998 que Munn et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle fondamental joué par IDO dans la tolérance périphérique maternelle vis-à-vis du fœtus. Ils ont démontré que l'administration de 1-Méthyl Trp (1MT, un inhibiteur de IDO) à des souris gestantes avait pour conséquence un rejet rapide du fœtus du fait de la diminution de la protection contre l'attaque des LT (Munn, 1998). Cette découverte a profondément changé la vision de la participation d'IDO à la réaction de défense de l'hôte et a permis de comprendre comment IDO pourrait servir de médiateur essentiel de la tolérogénèse (Jia et al., 2009).

7.1.2. TRANSPLANTATION D'ORGANES :

IDO est de ce fait une enzyme qui présente un rôle clé dans l'immunologie des transplantations d'organes. Actuellement, plusieurs études sur la transplantation ont mis en avant le rôle de IDO. Ainsi, elles indiquent un effet bénéfique de la surexpression d'IDO dans le type cellulaire de l'organe transplanté qui prolonge la survie de la greffe *in vivo* dans des modèles murins (Li et al., 2007). Une approche similaire avec l'utilisation de l'inhibiteur de IDO, le 1-MT induit le rejet du transplant, confirmant le rôle joué par IDO dans l'établissement de la tolérance immunitaire des greffons (Miki et al., 2001). De même, il a été observé que IDO retarde de façon significative le rejet d'une allogreffe cardiaque qui était associée à un profil pro-inflammatoire Th1/Th17 altéré (Yu et al., 2008). Liu et ses collaborateurs ont également rapporté que l'atténuation du rejet d'allogreffe pulmonaire était liée à un blocage des lymphocytes T CD8⁺ alloréactifs (Liu et al., 2006a). Néanmoins, malgré une régulation

positive de l'expression d'IDO, il arrive qu'elle reste insuffisante pour retarder voire empêcher le rejet de greffe (Forouzandeh et al., 2008)

7.1.3. CANCERS :

Une des caractéristiques les plus répandues dans les cancers avancés est le catabolisme accru du Trp du fait d'une surexpression d'IDO dans les cellules tumorales périphériques et dans les ganglions lymphatiques (Munn, 2004). IDO est retrouvé fortement exprimé dans des tumeurs du col de l'utérus, de l'endomètre, de la vessie, du rein, dans le cancer du poumon et bien d'autres (Théate et al., 2015). Cette forte expression est significativement corrélée à un pronostic médiocre chez les patients atteints de ces cancers. Ces observations ont amené à mieux caractériser les mécanismes impliqués dans la progression et l'évasion des cellules tumorales. Plusieurs mécanismes décrits dans les chapitres précédents comme la déplétion du Trp et l'accumulation de la Kyn ont été impliqués dans la progression tumorale par le biais d'une modification et d'une altération de la réponse adaptative. De plus, il est couramment observé que nombre de gènes codant des inhibiteurs d'IDO sont très souvent réprimés dans les tumeurs, parmi eux nous pouvons citer BIN1 (bridging integrator 1), un inhibiteur de la transcription d'IDO ou encore SOCS3 qui régule négativement IDO via sa dégradation dans le protéasome (Ueno et al., 2007). Considérant que son expression accrue est répandue parmi un nombre important de cancers, plusieurs inhibiteurs ont été développés. De manière encourageante, ces inhibiteurs affaiblissent les fonctions immunosuppressives liées à la production de kynurénine, peuvent ainsi surmonter la résistance immunitaire et améliorent l'immunothérapie tumorale (Ricciuti et al., 2019).

7.1.4. TROUBLES NEUROLOGIQUES ET PSYCHIATRIQUES :

La voie du métabolisme du Trp est au cœur de tout un réseau complexe de communication entre le système immunitaire et le système neuroendocrinien. Nous avons vu précédemment que IDO était l'enzyme qui catalyse la première réaction de dégradation du Trp en Kyn, puis plusieurs autres enzymes prennent le relais pour catalyser d'autres réactions et produire d'autres métabolites secondaires (Cf. schéma voie ido). Globalement, on peut diviser la voie du Trp en deux axes en fonction de son action sur le système nerveux central : un axe neurotoxique (= excitotoxique) médié par la K3MO (Kynurenine-3-Mono-Oxygenase) à l'origine de la production d'A. quinolinique et un axe neuroprotecteur (= inhibiteur) médié par la KOT à l'origine de la production d'A. kynurénique. Tout dérèglement dans l'équilibre qui règne entre les niveaux d'A. quinolinique et d'A. kynurénique apparaît jouer un rôle clé dans l'apparition des troubles neurodégénératifs et psychiatriques (Campbell et al., 2014).

Pour illustrer l'implication de IDO dans les maladies du système nerveux et les troubles psychiatriques, je citerai pour exemple la dépression. Ce trouble mental est expliqué en partie par un statut pro-inflammatoire qui en plus d'être périphérique, siègerait également dans le

cerveau et plus précisément dans les astrocytes et la microglie (Guillemin et al., 2001). Cette inflammation est responsable de l'activation des enzymes IDO et K3MO. L'équilibre entre l'enzyme KOT et K3MO est ainsi déplacé du côté de la K3MO et donc vers une production intense d'A. quinolinique (Myint and Kim, 2014). Ce dernier perturbe l'homéostasie neuroendocrinienne en entraînant un effet excitotoxique par usurpation des récepteurs NMDA (acide N-Méthyl-D-Aspartique) présents sur les neurones glutaminergiques et une apoptose sélective des astrocytes Ceci se produit au dépend de l'A. kynurénique, qui lui est censé être neuroprotecteur par activité antagoniste des récepteurs NMDA (Myint and Kim, 2003). De plus, l'activation de la voie de la Kyn réduit la disponibilité du Trp pour la synthèse de la sérotonine, une neurohormone impliquée dans la régulation des comportements, de l'anxiété ou encore de l'apprentissage, un tel manque perturbe une transmission sérotoninergique optimale et induit un comportement dépressif (Sauvaget et al., 2021).

7.2. PATHOLOGIES INFECTIEUSES

Avant d'attribuer à IDO un rôle immunorégulateur, elle a d'abord été décrite comme étant une enzyme qui contribue à la défense de l'organisme contre diverses infections bactériennes, virales et parasitaires. Nous pouvons citer à titre d'exemple le rôle joué par IDO dans la lutte antiparasitaire contre le protozoaire *toxoplasma gondii*, plusieurs études indiquent qu'une stimulation par l'IFN γ préviendrait la formation de kystes de tachyzoïtes et empêcherait le développement d'une encéphalite toxoplasmique par mécanisme de privation en Trp (Anand et al., 2022). Dans le contexte des infections bactériennes et notamment celles qui sont associées à la formation de granulomes inflammatoires comme la tuberculose et la listériose, il est rapporté que des composants majeurs de ces granulomes dont les DCs et les macrophages sont conduits par ces germes à produire de grandes quantités d'IDO, ce qui se traduit par une abondance de Tregs associée à de grandes concentrations en TGF β destinés à contenir l'infection et sa persistance (Popov et al., 2006) (Suzuki et al., 2012). L'expression d'IDO est aussi rapportée dans plusieurs maladies virales, la mieux documentée est le VIH. Il a été montré qu'au cours de l'infection par le VIH, l'expression élevée d'IDO perturbait la balance Treg/Th17 au profit des Tregs altérant ainsi les capacités effectrices des cellules T, et de façon intéressante l'analyse de l'A. 3-hydroxyanthranilique, un métabolite secondaire issu de la voie de la kynurénine a montré son implication dans l'inversion du rapport Th17/Tregs (Jenabian et al., 2013).

OBJECTIFS

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie caractérisée par un dialogue interactif entre le clone tumoral et son microenvironnement qui contribue largement à la survie des cellules leucémiques, à leur prolifération et à la résistance aux traitements. Ce dysfonctionnement du système immunitaire générant une mauvaise réponse aux infections est relayé au sein même des cellules néoplasiques par la présence de sous-populations régulatrices aux propriétés immunosuppressives. Ces cellules B contribuent à la création de niches prolifératives dans les organes lymphoïdes et éduquent à leur profit le microenvironnement au travers de facteurs immuno-régulateurs. Plusieurs études dont certaines menées au laboratoire ont montré que les B-LLC étaient capables de sécréter des facteurs régulateurs et des cytokines jouant un rôle important dans la suppression directe ou indirecte de la réponse inflammatoire et dans le maintien de la tolérance. Parmi ces régulateurs nous retrouvons l'IL-10, la cytokine la plus fréquemment étudiée et considérée depuis plusieurs années comme le principal inducteur d'une immunosuppression. Le TGF β et Foxp3 pour lesquels peu d'études ont évalué les capacités d'expressions dans le modèle de la LLC, et enfin, l'enzyme métabolique IDO1 qui a largement été étudiée dans plusieurs types cellulaires dont principalement les DCs mais jamais dans les lymphocytes B de LLC.

Ce projet de thèse vise à une meilleure compréhension des circuits moléculaires qui participent à l'hétérogénéité des sous-populations leucémiques présentes chez les patients indolents ou progressifs. Dans ce but nous avons voulu analyser l'impact fonctionnel de ces facteurs sur les cellules qui participent à la surveillance anti-tumorale. Une meilleure compréhension de ces circuits moléculaires est fondamentale pour concevoir des stratégies de traitement ciblées, en particulier pour les patients à haut risque qui échouent aux traitements standards.

Les objectifs de ce travail se répartissent ainsi en 2 axes :

- 1) Dans la continuité des résultats obtenus au sein du laboratoire, l'objectif est d'identifier des sous-populations de lymphocytes B capable d'exprimer les cytokines immunorégulatrices IL-10, TGF β et le facteur de transcription Foxp3, de déterminer

l'impact fonctionnel de ces cytokines sur les cellules du microenvironnement tumoral, et enfin d'évaluer la possible corrélation entre ce potentiel d'expression des facteurs immunomodulateurs et la progression clinique des patients.

- 2) Puisque l'expression d'IDO a également été impliquée dans la caractérisation de certaines populations cellulaires B immunorégulatrices nous avons analysé l'expression de cette enzyme dans le cadre du modèle de la LLC. Nous avons à la fois recherché le type de stimulations et les mécanismes moléculaires capables de réguler cette enzyme.

RESULTATS

Article 1

Immuno-regulatory malignant B cells contribute to Chronic Lymphocytic Leukemia progression

Arsène Mékinian ^{1, 2}, Anne Quinquenel ^{§, 1, 2}, Koceïla Ait Belkacem ^{§, 1, 2}, Ferial Kanoun^{1, 2}, Elisabetta Dondi ^{1, 2}, Emilie Franck ^{1, 2}, Marouane Boubaya ⁴, Maïssa Mhibik ^{1, 2}, Fanny Baran-Marszak ^{1, 2, 3}, Rémi Letestu ^{1, 2}, Florence Ajchenbaum-Cymbalista ^{1, 2, 3}, Vincent Lévy ^{4, 5}, Nadine Varin-Blank * ^{1, 2} and Christine Le Roy * ^{1, 2}.

¹ INSERM, U978, Bobigny, France

² Université Paris 13 dite « Sorbonne Paris Nord », UFR SMBH, Labex INFLAMEX, Bobigny, France

³ Service d'Hématologie Biologique, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

⁴ URC, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

⁵ CRC, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

These authors contributed equally to this work:

[§] Co-second authors and

* Co-senior and -corresponding authors, UMR InsermU978 / Université Paris 13 dite « Sorbonne Paris Nord », UFR SMBH, 74 Rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France; Emails: nadine.varin@inserm.fr and christine.le-roy@inserm.fr

Competing Interests statement: none

Keywords: IL10, TGF β 1, FOXP3, Regulatory B cells, CLL progression

Running title: Immuno-regulatory functions in CLL progression

Counts: Title 90 /150 characters; abstract 190/200 words, manuscript 4362/4500 words, 5 figures and 1 table, 5 supplementary figures and 1 supplementary table; 60/80 references

Abstract

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a heterogeneous B cell neoplasm ranging from indolent to rapidly progressive disease. Leukemic cell subsets with regulatory properties evade immune clearance; however, the contribution of such subsets during CLL progression is not completely elucidated. Here, we report that CLL B cells crosstalk with their immune counterparts, notably by promoting the regulatory T (Treg) cell compartment and shaping several helper T (Th) subsets. Among various constitutively- and BCR/CD40-mediated factors secreted, tumour subsets co-express two important immunoregulatory cytokines, IL10 and TGF β 1, both associated with a memory B cell phenotype. Neutralizing secreted IL10 or inhibiting the TGF β signalling pathway demonstrated that these cytokines are mainly involved in Th- and Treg differentiation/maintenance. In line with the regulatory subsets, we also demonstrated that a CLL B cell population expresses FOXP3, a marker of regulatory T cells. Analysis of IL10, TGF β 1 and FOXP3 positive subpopulations frequencies in CLL samples discriminated 2 clusters of untreated CLL patients that were significantly different in Tregs frequency and time-to-treatment. Since this distinction was pertinent to disease progression, the regulatory profiling provides a new rationale for patient stratification and sheds light on immune dysfunction in CLL.

Introduction

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), a neoplasm prevalent in the elderly, presents with a heterogeneous clinical course. While several patients exhibit indolent leukaemia that does not impact their life expectancy, others experience progressive disease with a rapid need for treatment [1]. In progressive CLL cases, clonal expansion of small mature B lymphocytes accumulates in the bone marrow and secondary organs. Despite the development of inhibitors and immunotherapies, treatments are not yet curative. The residual clonal cancer cells repopulate both lymphoid organs and peripheral blood, which is linked to a deficient antitumour immune surveillance [1, 2]. The heterogeneity of the CD5⁺CD19⁺ leukemic cells relies on the expression of phenotypic markers such as CD38, CD23, CD44, CD49d and CD27, stereotyped CDR3 sequences of immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) and genetic alterations at risk of progression [3-7]. Functionally, the heterogeneity also depends on antigen receptor (BCR)-triggered pathways leading to an apoptotic defect in progressive cases and an anergized phenotype for indolent cases [8-11].

CLL is also characterized by an imbalance of the subpopulations involved in immune surveillance and tumour recognition. T cell subsets, including CD4⁺ helpers (Th) and regulatory T cells (Tregs), have an altered ratio in this haematological malignancy [12, 13]. Thus, Tregs are increased in CLL and correlate with several clinical/biological features of progressive disease. Also, CD8⁺ T cells from CLL patients show functional defects in proliferation and cytotoxicity but preserve cytokine production reflecting T-cell exhaustion [14]. Ineffective anti-tumour immunity during neoplasm progression and production of several regulatory molecules and cytokines by specific B cell subsets ascribed to regulatory B cells lead to such impairment of immunological homeostasis [15-18]. These B cell subsets play an important role in the direct or indirect suppression of inflammatory response and the maintenance of tolerance. In peripheral blood from both healthy individuals and patients with autoimmune diseases or neoplasms, various IL10 producing subtypes have been reported [19-25]. Characterization of these subsets in murine models and human pathologies identified several phenotypes with suppressive activity without defining a unique consensus [17]. Among

others, murine CD5⁺ B1a and CD1d^{high}CD5⁺CD19^{high} B10 cells were IL10 producing cells [26, 27]. Studies unravelling the functional properties of the CD5⁺ B1a lineage have uncovered regulatory properties leading to a bias of the immune cell repertoire, including the expansion of the Treg population and suppression of Th1 and Th17 differentiation [28]. Subsets of human Breg cells can suppress Th1 differentiation and convert CD4⁺ T cells into Tregs *via* IL10 production [19, 29]. Induction of IL10 in various Breg subsets may require signals from activated CD4⁺ T cells with CD40L playing a significant stimulatory role [30]. In addition, induced Breg populations can also exert a suppressive mechanism *via* the production of TGFβ1, IL35 and indoleamine-2,3 dioxygenase (IDO) [31, 32], accounting also for Treg/Th17 balance and altered metabolism, respectively [33, 34]

Remarkably, various Breg populations express phenotypic markers commonly observed in CLL B-cell subsets, irrespective of their IGHV mutational status. Due to the expression of CD5, CLL cells have been hypothesized for a long time as being derived from a human B1 lineage recognizing natural antibodies [35, 36]. At present, CLL-B cells are considered antigen-experienced B cells with an IGHV mutational status, being either a T-dependent (mutated IGHV, M-IGHV) or T-independent (unmutated IGHV, UM-IGHV) memory phenotype with both subsets expressing CD27 [1]. CLL malignant B cells have a clear survival advantage over the other normal B cells [37]. Furthermore, diverse triggering events have been shown to induce IL10 in these cells, which share immunosuppressive capacities with B10 cells [24, 25].

In the present study, we first investigated the functional impact of CLL B cells on their immune counterparts *ex-vivo* and characterized the malignant secretome involved in tumour surveillance. Focusing on IL10 and TGFβ1-producing CLL subsets, which display a similar phenotypic signature, we found that the two cytokines can be co-expressed but are differentially regulated upon BCR/CD40L triggering. We also show that secreted IL10 and TGFβ1 have specific regulatory properties towards T cell differentiation and secretion. Importantly, we identified in a subset of leukaemic cells, the transcription factor FOXP3, a hallmark of Tregs and of several cancer cells. Finally, we demonstrate that an IL10-, TGFβ1- and FOXP3-expression signature allows the identification of two patient sub-groups with distinct time-to-treatment curves. These novel findings provide critical insight into how CLL cells modify their immunological environment during disease progression.

Patients, Materials and Methods

Patients

Blood samples were obtained during clinical follow-up of 97 CLL patients presenting at various stages of the disease after informed consent and approval by the local ethic committee (CLEA, GHPSSD, Avicenne hospital). CLL diagnosis was confirmed using international guidelines [38, 39]. Table 1 summarizes the clinical and biological parameters (Service d'Hématologie Biologique, Avicenne hospital), including age, sex, Binet stage and IGHV mutational status at the experimental time, as well as treatment status for the cohorts of patients (**Table 1**).

Human cells isolation, cells lines and cell cultures

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated by density gradient. Lymphocytes were isolated from total blood by negative selection using Rosette B and CD4⁺ isolation kits (STEMCELL Technologies, Grenoble, France). PBMCs, isolated B and T cells subsets purity was assessed by flow cytometry and were typically >95% pure. Cell viability was quantified with the Vi-CELL™ XR Cell Viability Analyzer based on the Trypan Blue Exclusion method (Beckman Coulter, Life Sciences, Villepinte, France). All cells (4x10⁶ cells/ml) were cultured in RPMI 1640 containing L-glutamine, supplemented with 100 U/mg/ml penicillin/streptomycin and 10% FCS (PAA, Les Mureaux, France) at 37°C and 5% CO₂ for up to 72 h. PBMCs and B cells were treated for 48h with blocking antibodies (Abs): rat anti-IL10 (JES3-9D7, Becton Dickinson, Pont-de-Claix, France), rat anti-IL10 receptor (3F9, BioLegend, Paris, France) or with the selective inhibitor of TGFβRI (SB 431542, Bio-Techne, TOCRIS, Noyal Châtillon, France). B cells were stimulated or not with a combination of soluble CD40L (1 µg/ml; Miltenyi Biotec, Paris, France) and coated anti-IgM (20 µg/ml; Jackson ImmunoResearch, Montluçon, France), a combination of soluble CD40L and IL21 (50 ng/ml, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France), human recombinant IL10 (40 ng/ml) or TGFβ1 (5 ng/ml) (Miltenyi Biotec). CD4⁺ T cells were stimulated or not on coated anti-CD3 mAb (10 µg/ml; Hit-3a, Ebioscience, ThermoFisher Scientific) and anti-CD28 mAb (1 µg/ml; CD28-2, Ebiosciences) plates. For cytokine detection by flow cytometry, PIB treatment - PMA (500 ng/ml), Ionomycin (1 µg/ml) and Brefeldin A (BFA) (10 µg/ml) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)- was added for the last 4 h of culture. Co-culture experiments were performed with purified autologous CD4⁺ T / B cells at various ratios (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10) with a total of 2x10⁶ cells for 3 days in the presence or not of CD3/CD28 and/or α-IgM/CD40L stimulation. U2OS cells (HTB-96, ATCC) and HEK293T cells (CRL-3216, ATCC) were cultured, respectively, in McCoy's 5A or DMEM supplemented with 10 % FCS and 100 U/mg/ml penicillin/streptomycin.

Detailed protocols used in the following sections are described in the Supplementary Information. Antibodies and probes are listed in the Supplementary Table 1.

Cell sorting

After doublet exclusion, CD5⁺CD19⁺ cells purified from CLL peripheral blood were sorted further by gating for CD5⁺, CD19⁺, CD3⁻ and CD27^{high} cells on a FACS ARIA III cell sorter (BD Bioscience).

Western blotting

Total protein lysates (2 to 50 µg) were separated on 10% SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and incubated with the indicated antibodies followed by incubation with appropriate secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies. Detection was performed using ECL kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and images were acquired with a Chemidoc MP (Bio-Rad).

Flow cytometry

Freshly isolated PBMCs, leukaemic B cells, CD4⁺T in culture or in co-culture for 0, 2 or 3 days, were stimulated or not with anti-IgM/CD40L, or treated or not with anti-IL10 or TGFβRI inhibitor, and/or with PIB. Cells were stained for viability, extracellularly labelled with antibodies for CD antigens, fixed and permeabilized, intracellularly stained for cytokines and/or FOXP3 according to manufactures' instructions. After washes, cells were analyzed on FACSCanto II or Symphony™ A3 SORP analyzer (Becton Dickinson) driven by the BD FACSDIVA™ software and data compiled with the FlowJo™ software (BD Biosciences). To detect RNA targets, B cells or PBMCs were processed according to the manufacturer's instructions (PrimeFlow RNA assay, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) using target-specific probe sets.

Quantification of cytokine secretion

Cytokines (IL-1β, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL13, IL17, TNFα, IFNγ and TGFβ1) were quantified in the supernatants of CLL B cells cultured and stimulated or not for 72h by V-plex assays (MSD) according to the manufacturer's protocols.

Statistical analyses

Data are expressed as means \pm SEM or frequencies. For the comparison, Mann-Whitney U test or Wilcoxon signed-rank test (paired data) were used. The Spearman's rank correlation coefficient test was used to assess the relationship between pairs of secreted cytokines. Unsupervised hierarchical cluster analysis was performed using IL10 and TGF β 1 and/or FOXP3 percentages of expressing cells. The distribution of Time-to-Treatment was estimated using the Kaplan-Meier method. The difference between clusters was tested by Log-rank. All tests were two-sided at a 0.05 significance level. Analyses were performed using the R statistical software version 3.1.2 and Graphpad (Prism 7).

Results

CLL cells crosstalk with their immune counterparts.

To determine whether CLL cells may impact other immune cells, PBMCs from CLL patients were cultured for two days and subsequently evaluated by flow cytometry to determine the proportion of various immune subsets. Monocytes ($CD14^+CD16^+/CD14^+CD16^-/CD14^-CD16^+$) (mean 1.20 ± 0.25 at $t=0$ vs 0.59 ± 0.18 at $t=2$ days, $n=11$), as well as CLL B cells, decreased in most of the samples tested (99.1 ± 1.19 vs 97.9 ± 1.60 , $n=17$). While the overall percentage of T cells remained in the same range during the 2 days-culture (9.57 ± 1.70 vs 12.59 ± 2.20 , $n=16$), the proportion of $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells increased or decreased, respectively ($CD4$: 67.98 ± 3.18 vs 71.71 ± 2.76 ; $CD8$: 29.83 ± 3.36 vs 26.01 ± 2.89 , $n=17$) (**Figures 1A and S1A**). To further characterize this modulation, autologous purified $CD4^+$ T cells and CLL B cells were cultured separately or together, and the proportion of $CD4^+$ T cells expressing FOXP3 was evaluated. The autologous co-culture increased the number of FOXP3⁺ regulatory T cells. In coculture, BCR-mediated stimulation of B cells led to an increase of the Tregs population while TCR-mediated stimulation of T cells alone did not (**Figure 1B**). The $CD4^+CD25^+CD127^{low}FOXP3^+$ Tregs enhancement confirmed the increase of FOXP3⁺ T cells in the presence of B cells (**Figure 1C**). Moreover, the co-culture of autologous $CD4^+$ and B cells strongly impacted T cell capacity to produce two important pro-inflammatory type 1 cytokines: TNF α and IFN γ . This regulatory effect was dependent on the ration of T/B cells (1/1 to 1/10) present in the co-culture (**Figures 1D-E, S1B-C**). Altogether these results assessed the regulatory function of CLL B cells with a suppressive activity on Th1 cellular response and the induction of $CD4^+$ Tregs.

Specific subsets of CLL B cells express IL10 together with TGF β 1.

Based on the regulatory function of CLL B cells observed, we next evaluated the expression of two major immunosuppressive cytokines, IL10 and TGF β 1, in a cohort of 28 patients. Flow cytometry analysis of $CD5^+CD19^+$ cells (**Figure S2A**) in PBMC samples showed a highly variable proportion of cells expressing IL10 or TGF β 1 (**Figure 2A**), with several of them expressing both cytokines (**Figure 2B**). The variable expression and co-expression of IL10 and TGF β 1 were confirmed at the transcriptional level using RNA-Flow cytometry analysis, (**Figure S2B**). We also examined whether IL10 and TGF β 1 production in purified CLL B cells was regulated by anti-IgM/CD40L. Although several patient samples showed a more pronounced positive or negative modulation, comparable frequencies of IL10⁺ cells were found with or without anti-IgM/CD40L stimulation ($n=30$, ranging upon stimulation from 0.12 to 88.1 %, mean 28.12 ± 4.85 %). By contrast, the overall proportion of TGF β 1 expressing cells was significantly increased upon triggering ($n=33$, ranging from 0.28 to 99.3 % vs 0.22 to 97.5%, mean 48.45 ± 6.67 % vs 42.26 ± 6.39 %) (**Figure 2C, connected lines, and Figure S2C**), suggesting that BCR-mediated activation may be involved in the modulatory function of CLL B cells.

The phenotypic signature of IL10⁻ or TGFβ1⁻ positive subsets was specified by flow cytometry using different phenotypic markers previously described in various regulatory populations (CD5, CD19, CD27, CD24, CD25 and CD38). IL10⁺ and IL10⁻ cells exhibited significantly different expression levels of CD5, CD19 and CD27 (**Figure 2D**). This difference in expression was also observed in TGFβ1⁺ and TGFβ1⁻ cells without any stimulation. Stimulation with anti-IgM/CD40L resulted in similar expression profiles (**Figure S2D**). As already described for CLL clonality, phenotyping of IL10⁺ or TGFβ1⁺ subsets suggested that both belong to memory B cells. IL21/CD40L stimulation significantly increased the expression of Granzyme B (GrB) in B cells from healthy subjects, whereas it remained weakly expressed in CLL patients regardless of stimulation (**Figure S2E**).

CLL B cells secrete IL10, TGFβ1 and other soluble factors.

The capacity of CLL B cells to secrete various cytokines was evaluated using a multiplex ELISA-like quantification of the leukemic cell supernatants following 3 days of culture with or without CD40L/anti-IgM stimulation. IL10 was detected at a much lower level than TGFβ1. While CD40L/anti-IgM stimulation did not modulate IL10 levels, secreted TGFβ1 levels were slightly decreased (**Figure 3A**). Full activation of Smad2/3, a direct cytoplasmic effector of TGFβ signalling, was independent of exogenous TGFβ1 treatment, with only a minor increase in Smad2/3 phosphorylation upon TGFβ1 triggering. Treatment of the B cells with a TGFβ type I receptor inhibitor (SB431542) fully inhibited Smad2/3 phosphorylation in every condition, supporting a self-activating loop as previously described (**Figure S3A** and [40]).

Secretion of several other cytokines and factors necessary for regulation of immune cells was detected in CLL B cells supernatants. Low levels of TNFα, IL8 or IL6 were significantly induced upon stimulation (**Figure 3B**), while IL4, IL1β, IFNγ, IL2, IL17 and IL13 remained unchanged (**Figure S3B**). As shown in **Figure 3C**, the regulatory orientation of the culture supernatant was confirmed with an inverted correlation between the secretion of TGFβ1 and those of pro-survival or -inflammatory cytokines. Our results show that CLL cells display a specific secretome and identify immunoregulatory subsets that can further respond to BCR/CD40 stimulation and increase B cell activation.

Functional impact of secreted IL10 and TGFβ1 on their immune counterparts

To clarify the role of IL10 and TGFβ1 on other immune counterparts, PBMCs from CLL patients were cultured with an anti-IL10 blocking antibody or the TGFβ type I receptor inhibitor (SB431542). Viability of the cells, following 2 days of culture, was not significantly affected up to 10 μg/ml anti-IL10 antibody (left graph) or 5 μM SB431542 (right graph) treatments (**Figure S4A**). We confirmed the blocking activity of the anti-IL10 antibody by Western blot. The anti-IL10 and anti-IL10 receptor antibodies efficiently blocked IL10-driven activation of Stat3 at both pSer⁷²⁷ and pTyr⁷⁰⁵ (**Figure S4B**).

Given the *ex-vivo* and *in vitro* regulatory effects of CLL B cells on immune cells (**Figure 1**), we cultured PBMCs from CLL patients for 2 days with or without inhibitors and analyzed Treg, Th2 and Th1 frequencies by flow cytometry (**Figure S4C**). Blocking TGF β signalling decreased Treg frequencies significantly (**Figure 4A**), whereas trapping IL10 increased the proportion of IL4-producing T cells and decreased those of IFN γ -ones (**Figure 4B-C**). These data highlight the critical role of TGF β s in the development and maintenance of the Treg subset and the inhibitory role of IL10 on Th2/Th1 differentiation.

Given that CLL B cells can produce IL10 and TGF β 1 and their functional impact on their immune cells, we examined the clinical relevance of the frequencies of IL10- and TGF β 1-expressing cells. Unsupervised hierarchical cluster analysis of IL10- and TGF β 1-expressing B cells from a first cohort of 28 CLL patients (UPN) distinguished 2 clusters (Cluster 1 n=17 & Cluster 2 n=11) with a higher proportion of cells expressing both cytokines in group 2 (**Figure 4D**). Cluster 2 had a higher number of treated patients (5 out of 10) when compared to cluster 1 (2 out of 13). High proportions of IL10⁺ and TGF β 1⁺ CLL B cells in treated patients, highlighted in this analysis, possibly reflect CLL progression.

Expression of FOXP3, IL10, TGF β 1 in CLL B cells may constitute a progression indicator.

CLL B cells express membrane markers such as CD5 and CD25, which are associated with T and B regulatory cells and regulatory cytokines such as IL10 and TGF β 1. We considered whether CLL B cells may further mirror Tregs by expressing the transcriptional regulator FOXP3. Western blotting with a FOXP3 antibody (clone PCH101) revealed the expression of FOXP3 in purified CLL B cell extracts (**Figure 5A**; n=10). CD4⁺ T cells were used as a positive control for FOXP3 expression. We also verified the expression of FOXP3 in CLL B cells using the D6O8R antibody, which recognizes a different FOXP3 epitope than the PCH101 clone. Expression of FOXP3 was enhanced in CD5⁺CD19⁺CD27⁺ cells (**Figure S5A**; n=3).

FOXP3 expression was also confirmed by RNA-Flow cytometry on CLL PBMCs (n=5). We stained CLL B, CD4⁺ and Treg cells for specific extracellular markers and intracellular FOXP3 protein (PCH101) and RNA (FOXP3 probe). While the percentage of FOXP3 positive cells and the median fluorescence intensity were higher in CD4⁺ and Treg cells, CD19⁺CD5⁺ CLL B cells did expressed both FOXP3 RNA and protein (**Figures 5B and S5B**).

We next examined the clinical relevance of FOXP3⁺ B CLL cells in a second cohort of 23 untreated CLL patients (**Table 1**). We analyzed expression of IL10, TGF β 1 and FOXP3 in CLL B cells (CD19⁺ CD5⁺ CD27⁺) by flow cytometry on thawed PBMC samples. Unsupervised hierarchical clustering of IL10-, TGF β 1- and FOXP3- expression frequencies in CLL B cells revealed the discrimination of two clusters of patients (**Figure 5C**; Cluster 1; n=15 and Cluster 2; n=8). A higher proportion of Tregs was found in patients from Cluster 2 when compared to patients in Cluster 1 (**Figure 5D**). We assessed time-to-treatment for the second cohort of

patients to confirm the clinical significance of these two clusters. A short time-to-treatment was observed in Cluster 2 patients compared to Cluster 1 patients ($p=0.01$) (**Figure 5E**), demonstrating that expression of IL10-, TGF β 1- and FOXP3 in CLL B cells may predict disease progression in CLL patients.

Discussion

Recent advances in understanding the heterogeneity in risk of progression for CLL patients have established a dysfunction of anti-tumour immune survey. Our study highlights the importance of modulating functions of the clonal B cell expansion, which correlate with disease progression. The analysis of two independent cohorts of CLL B cells and PBMCs from a total of 97 patients demonstrated that CD5⁺CD19⁺CD27⁺ memory CLL B cells produce and secrete IL10 and TGFβ1, as part of the tumour cell secretome. The leukaemic B cell subsets exhibited regulatory functions on their immune counterparts, similar to Bregs. IL10 mainly inhibits Th2/Th1 differentiation while TGFβ induces Tregs. We discovered that FOXP3, a functional marker of Tregs, is also expressed in CLL B cells. Moreover, we found that expression levels of IL10, TGFβ1 and FOXP3 in tumour B cells from untreated CLL B patients were predictive of disease progression.

We validated the regulatory properties of the leukaemic B cell populations in PBMCs and showed a significant drop of in the number of monocytes, as well as an expansion of CD4⁺ Tregs. Co-culture experiments with autologous T cells confirmed that leukaemic B cells drive the expansion of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ Tregs and the reduction of effector T cells expressing TNF-α and IFNγ. The T cell subsets are involved in tumour clearance and anti-pathogens response [20, 23, 41]. Furthermore, the changes observed in cellular immune composition were cellular ratio-dependent. Indeed, the CD4⁺T/CLL B cells ratio used for the co-culture experiment were reflected the cellular bias observed *in vivo* for CLL patients [4, 42]. These findings refer to hallmarks of functional Bregs and are in line with the acquisition of regulatory properties for CLL cells contributing to the disruption of immune survey mechanisms and tumor escape.

IL10 and TGFβ1 are key regulators of immune homeostasis. Several reports have implicated IL10-producing CLL B cells (B10, [24, 43]) in the dysfunction of the T cell compartment accompanying disease progression [3, 21, 24, 25]. CLL B cells are also described as TGFβ1-producing cells [3, 40]. Both immunomodulatory factors are important contributors to the peripheral conversion of CD4⁺ T cells into FOXP3⁺ induced Tregs (iTregs) during an active immune response [3, 31, 44]. Interestingly, iTregs also produce both IL10 and TGFβ1, are found in solid tumour infiltrates and are indicative of a poor anti-tumour response during cancer progression [45]. In accordance with this regulatory B cell role, we demonstrated in CLL that TGFβ contributes to the conversion of helper T cells into Tregs, without affecting directly the Th1 or Th2 frequencies. In the context of a Th2/Th1 imbalance in CLL cases [2, 13], IL10 had an effect on the differentiation of Th1/Th2 cells. Given the low levels of IL10 secreted in CLL B cells, future dose-response experiments should clarify whether a threshold of IL10 secretion is mandatory to suppress the differentiation. We demonstrated the heterogeneous expression of IL10 and TGFβ in B cells from CLL patients. We highlighted the presence of various CLL B cell subsets expressing either only one or both cytokines. These findings

strengthen the notion of the heterogenous immune modulating functions of the clonal B cell expansion.

Phenotypic assessment of the regulatory populations in autoimmune diseases led to the description of various subtypes with IL10- or TGF β 1-dependent suppressive mechanisms [17, 19]. An initial study on CLL characterized a B10-like CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ regulatory subset [21]. 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 [20, 21, 23, 36, 46]. CD11b⁺ and GrB⁺ cells did not represent a significant proportion of CLL B cells (data not shown) and GrB expression was not significantly induced upon IL21/CD40L triggering as compared to healthy controls. A study identified the CD19⁺CD24⁺CD38^{hi} CLL subset as IL10 and TGF β 1 high producer cells responsible for transforming naïve CD4⁺ T cells into Tregs, while IL10 production in IGHV mutated CLL cells was correlated with anergy [3, 25]. Other studies identified CTLA4-induced regulatory B cells as TGF β 1 and IDO producers [31]. TGF β 1 is mandatory for Tregs induction but also for CD8⁺ T cell anergy and these immuno-modulations have been documented in CLL [12, 47, 48]. In our CLL cohort, CD5⁺CD19⁺CD27⁺ cells represented the discriminant phenotypic features of IL10^{+vs-} and TGF β 1^{+vs-} subsets, which also resembled CD19⁺CD81⁺CD27⁺CD25⁺PD-L1^{hi} tumour evoked Bregs producing both IL10 and TGF β 1 in sarcomas [49]. As we observed with the decrease of CD5 expression in BCR/CD40 stimulated cells, many surface markers used to identify Bregs are up- or down-regulated during immune activation [17]. Overall, the heterogeneous features of CLL regulatory B cells cannot be limited to one specific phenotype, and this heterogeneity is due to the induction and activation by surrounding cells.

Tregs are key players in the maintenance of immune tolerance, and their expansion is regulated during this process. Also, a comprehensive role in tolerance has been attributed to regulatory B cells which exhibit a number of common features with Tregs, among which IL10 or TGF β 1 production. Loss of function or number decrease in Breg cells result in autoimmune diseases [19]. Interestingly, we demonstrated that CLL B cells, not only express IL10 and TGF β 1 but also the transcription factor FOXP3. Using various techniques, we demonstrated the expression of both FOXP3 mRNA and protein in purified CLL B cells after exclusion of any Tregs or other immune cells, and using FOXP3-positive cells such as Tregs and CD4⁺ T cells as a control. FOXP3 expression has been described in tumour infiltrating Tregs in epithelial solid tumours such as pancreatic adenocarcinoma, in glioma cells and in Bregs present in systemic lupus erythematosus (SLE) [50-52]. Anti-tumour and oncogenic properties have been attributed to FOXP3 depending on the cellular context and interacting partners [53]. For example, FOXP3 interaction with NFAT or NF κ B regulates anti-tumour immunity [54, 55]. TGF β 1 and TGF β 2 have been implicated in FOXP3 induction in peripheral Tregs and adenocarcinoma expansion [56]. Moreover, FOXP3 and TGF β 1 are concomitant intermediates in Tregs/Th17 homeostasis. CLL B cells, also expressed CD25, another key marker and regulator of Tregs, which has been observed in IL10⁺ mature Breg cells with antigen specific suppressive functions in SLE patients [52]. Furthermore, FOXP3 associates with STAT3, which

is constitutively phosphorylated at S⁷²⁷ in CLL, to promote the expression of IL10 in a subset of Tregs. (REF). FOXP3 expression is also regulated by both CD5 and TGFβ1 in this subset of Tregs [57]. Whether some coordinated regulation of FOXP3, TGFβ1, CD5 and CD25 expressions may occur in CLL B cell subtypes remains to be determined.

Recent studies have highlighted the integrative evaluation of various immune subsets and the production of cytokines and soluble factors as better predictors of a dysfunctional immune survey [58]. Such combinatorial analysis of IL10 and TNFα expression in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Bregs proved better efficacy than individual evaluation during renal allograft rejection [59]. Similarly, computing the expression of various cytokines with a polyfunctional index delineated a heterogeneous response in infectious disease [60]. Our work showed that using an unsupervised hierarchical cluster analysis of IL10, TGFβ1 and FOXP3 underscored the heterogeneous profile of the patients and may predict disease progression. Our unsupervised hierarchical cluster analysis differentiated two clusters of patients based on the proportion of CLL B cells expressing IL10, and TGFβ1. In a first cohort, our analysis on purified CLL B cells showed a differential association with CLL progression between the two clusters of patients. The relevance of this analysis was further confirmed in a second cohort with PBMCs of untreated patients for which the need of treatment was considered. Therefore, the characterization and quantification of the regulatory-competent cells should improve the prediction for the heterogeneous course and survival outcome of CLL patients. In line with this evaluation, the differential proportion of Tregs observed in the two clusters may also be relevant. Clustering IL10, TGFβ1 and FOXP3 may also provide a better understanding of the contribution of the regulatory subsets to the systemic immunodeficiency and lack of tumour clearance observed in CLL patients.

All these data argue for a comprehensive regulation of the three immunomodulatory factors with a differential expression among CLL patients at various stages of the disease.

Acknowledgements

AM was the recipient of a Poste d'Accueil INSERM. AQ was the recipient of a Jansen fellowship. EF was the recipient of Labex INFLAMEX fellowship. This work has received the financial support of Labex INFLAMEX, contract ANR11 IDEX00502, and from the Fondation Laurette Fugain. KAB, FK and MM are recipients of MRT fellowships. We thank Mrs. Stéphanie Le Coquil for assistance in PBMCs and B cells purification, Mrs. Laure Aubard for cell sorting and flow cytometry panels design on the TISCELL13 core facilities, Mrs. Malika Gantier for the anonymization of CLL samples, and Dr. Luisa Izzi (Montréal, Québec) for language revision.

Author Contributions: AM, AQ, KAB, FK, EF, MM, ED and CLR performed the experiments. AM, NVB and CLR conceived the project, analyzed the data, generated figures and wrote the

manuscript. MB and VL performed the statistical and unsupervised hierarchical cluster analyses. FBM determined the IGHV mutational status from CLL cases and RL shared his methodological expertise. FAC and VL annotated patient samples with clinical and biological parameters and completed the follow-up.

Competing Interests:

Authors declare no funding and financial conflicts of interest.

Abbreviations:

CLL, Chronic Lymphocytic Leukaemia; FOXP3, Forkhead box P3; IL10, Interleukin 10; TGF β 1, Transforming Growth Factor beta 1; IGHV, immunoglobulin heavy chain variable region; M-IGHV, Mutated IGHV; UM-IGHV UnMutated IGHV; BCR, antigen receptor of B lymphocytes; Th, T helper cell; Treg, regulatory T cell; Breg, regulatory B cell; GrB, Granzyme B; IDO, Indoleamine-2,3 DiOxygenase; MFI, Mean Fluorescence Intensity.

References

1. Fabbri, G. and R. Dalla-Favera, *The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(3): p. 145-62.
2. Riches, J.C., A.G. Ramsay, and J.G. Gribben, *T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia*. Semin Cancer Biol, 2010. **20**(6): p. 431-8.
3. Manna, A., et al., *Targeting CD38 is lethal to Breg-like chronic lymphocytic leukemia cells and Tregs, but restores CD8+ T-cell responses*. Blood Adv, 2020. **4**(10): p. 2143-2157.
4. Kipps, T.J., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17008.
5. Landau, D.A., et al., *Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse*. Nature, 2015. **526**(7574): p. 525-30.
6. Redondo-Muñoz, J., A. García-Pardo, and J. Teixidó, *Molecular Players in Hematologic Tumor Cell Trafficking*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 156.
7. Bosch, F. and R. Dalla-Favera, *Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment*. Nat Rev Clin Oncol, 2019. **16**(11): p. 684-701.
8. Rosenwald, A., et al., *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1639-47.
9. Klein, U., 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): p. 1625-38.
10. Muzio, M., et al., *Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy*. Blood, 2008. **112**(1): p. 188-95.
11. Märklin, M., et al., *NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 755.
12. Taylor, J.G. and J.G. Gribben, *Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects*. Semin Cancer Biol, 2015. **34**: p. 36-45.
13. Podhorecka, M., et al., *T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia--the three-color flow cytometry analysis*. Leuk Res, 2002. **26**(7): p. 657-60.
14. Jitschin, R., 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): p. 750-60.
15. Inoue, S., et al., *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): p. 6785-92.
16. Gorosito Serrán, M., et al., *The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production*. FEBS Lett, 2015. **589**(22): p. 3362-9.

17. Rosser, E.C. and C. Mauri, *Regulatory B cells: origin, phenotype, and function*. *Immunity*, 2015. **42**(4): p. 607-12.
18. Noh, J., et al., *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): p. 247-9.
19. Mauri, C. and M. Menon, *The expanding family of regulatory B cells*. *Int Immunol*, 2015. **27**(10): p. 479-86.
20. Blair, P.A., 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): p. 129-40.
21. Iwata, Y., et al., *Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells*. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 530-41.
22. Shalapour, S., et al., *Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy*. *Nature*, 2015. **521**(7550): p. 94-8.
23. Matsumoto, M., et al., *Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation*. *Immunity*, 2014. **41**(6): p. 1040-51.
24. DiLillo, D.J., et al., *Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function*. *Leukemia*, 2013. **27**(1): p. 170-82.
25. Drennan, S., 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): p. 1686-1694.
26. Baumgarth, N., *The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(1): p. 34-46.
27. Horikawa, M., et al., *Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(11): p. 4268-80.
28. Carter, N.A., 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): p. 5569-79.
29. Flores-Borja, F., et al., *CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(173): p. 173ra23.
30. Hagn, M., 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): p. 383-95.
31. Nouël, A., et al., *B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in a CTLA-4 dependent manner*. *J Autoimmun*, 2015. **59**: p. 53-60.
32. Horii, M. and T. Matsushita, *Regulatory B cells and T cell Regulation in Cancer*. *J Mol Biol*, 2021. **433**(1): p. 166685.

33. Flavell, R.A., et al., *The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(8): p. 554-67.
34. Sanjabi, S., et al., *Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(4): p. 447-53.
35. Hamblin, T.J. and D.G. Oscier, *Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell*. Blood Rev, 1997. **11**(3): p. 119-28.
36. Griffin, D.O., N.E. Holodick, and T.L. Rothstein, *Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-*. J Exp Med, 2011. **208**(1): p. 67-80.
37. Chiorazzi, N. and M. Ferrarini, *B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 841-94.
38. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5446-56.
39. Eichhorst, B., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2015. **26 Suppl 5**: p. v78-84.
40. Lagneaux, L., et al., *TGF-beta activity and expression of its receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 1998. **31**(1-2): p. 99-106.
41. Lemoine, S., et al., *Human T cells induce their own regulation through activation of B cells*. J Autoimmun, 2011. **36**(3-4): p. 228-38.
42. Chiorazzi, N. and F.K. Stevenson, *Celebrating 20 Years of IGHV Mutation Analysis in CLL*. Hemasphere, 2020. **4**(1): p. e334.
43. Forconi, F. and P. Moss, *Perturbation of the normal immune system in patients with CLL*. Blood, 2015. **126**(5): p. 573-81.
44. Lee, K.M., et al., *TGF-beta-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance*. Eur J Immunol, 2014. **44**(6): p. 1728-36.
45. Adeegbe, D.O. and H. Nishikawa, *Natural and induced T regulatory cells in cancer*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 190.
46. Lindner, S., et al., *Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2468-79.
47. Parekh, V.V., et al., *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): p. 5897-911.
48. Jak, M., et al., *Enhanced formation and survival of CD4+ CD25hi Foxp3+ T-cells in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(5): p. 788-801.
49. Premkumar, K. and B.S. Shankar, *TGF-betaR inhibitor SB431542 restores immune suppression induced by regulatory B-T cell axis and decreases tumour burden in murine fibrosarcoma*. Cancer Immunol Immunother, 2021. **70**(1): p. 153-168.

50. Hinz, S., et al., *Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(17): p. 8344-50.
51. Held-Feindt, J., et al., *The transcription factor Forkhead box P3 (FoxP3) is expressed in glioma cells and associated with increased apoptosis*. *Exp Cell Res*, 2013. **319**(5): p. 731-9.
52. Vadasz, Z., et al., *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**: p. 254245.
53. Szyłberg, Ł., D. Karbownik, and A. Marszałek, *The Role of FOXP3 in Human Cancers*. *Anticancer Res*, 2016. **36**(8): p. 3789-94.
54. Takeuchi, Y. and H. Nishikawa, *Roles of regulatory T cells in cancer immunity*. *Int Immunol*, 2016. **28**(8): p. 401-9.
55. Kim, J.H., et al., *Molecular networks of FOXP family: dual biologic functions, interplay with other molecules and clinical implications in cancer progression*. *Mol Cancer*, 2019. **18**(1): p. 180.
56. Colamatteo, A., et al., *Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 3136.
57. Henderson, J.G., et al., *CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens*. *Immunity*, 2015. **42**(3): p. 471-83.
58. Van den Eynde, M., et al., *The Link between the Multiverse of Immune Microenvironments in Metastases and the Survival of Colorectal Cancer Patients*. *Cancer Cell*, 2018. **34**(6): p. 1012-1026.e3.
59. Cherukuri, A., 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): p. 1575-85.
60. Larsen, 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): p. 2596-605.

Figure legends

Figure 1: CLL B cells undertake a regulatory crosstalk with their immune counterparts.

(A) Frequencies of various cell subsets (monocytes, n=11; leukemic B cells, n=17; T cells, n=16; CD4⁺/CD8⁺ T cells, n=17) were evaluated by flow cytometry from CLL patients PBMCs prior to or upon 2 days of culture. Dotted lines link individual patient samples. Wilcoxon signed-rank test on means * P≤0.05, ** P≤0.01, *** P≤0.001, *ns* not significant. (B-E) Purified autologous CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 (+, S) or not (-, NS) were cultured for 2 days in with (+) or without (-) CLL B cells activated (+) or not (-) with CD40L and anti-IgM as indicated and analyzed by flow cytometry. Frequencies of FOXP3⁺ cells (B), of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ Treg cells (C) out of CD4⁺ T cells in the culture are graphed (T/B ratio 1:1; n=5). Autologous CLL CD4⁺ T and B cells were cultured for 48h at the indicated ratios (T/B). Scatter dot plots indicate the frequencies of TNFα⁺ (D; n=5) and IFNγ⁺ (E; n=9) cells out of CD4⁺ T cells. ANOVA test *p < 0.01; ** p<0.001.

Figure 2: Specific subsets of CLL B cells express IL10 together with TGFβ1.

(A) Percentage of IL10-(black bars) or TGFβ1-(grey bars) expressing cells among CD19⁺ CD5⁺ cells from patient samples (UPN) were evaluated by flow cytometry and graphed; (n=28). (B) Representative dot plot showing IL10⁺ and TGFβ1⁺ staining in CD19⁺/CD5⁺ cells from a patient PBMC sample (bars indicate the respective control isotypes, UPN 239, left). Graphic representation of the frequency of CLL B cells co-expressing IL10 and TGFβ1 among PBMCs from patients' samples (right). (C) Graphic representation of IL10⁺ or TGFβ1⁺ purified CLL B cells frequencies. Cells were stimulated or not with CD40L/ anti-IgM for 3 days (IL10 n=29, TGFβ1 n=33) and quantified by flow cytometry. Dotted lines link individual patient samples. Paired t-test, ** P≤0.01, *ns*, not significant P>0.05. (D) Purified B cells were cultured for 3 days, labelled with the indicated membrane markers and stained for cytoplasmic IL10 or TGFβ1. MFI ratio of CD5, 19, 27, 24, 25, 27 and 38 between IL10 positive versus negative (n=16, left) or TGFβ1 positive versus negative (n=17, right) cells are graphed. Wilcoxon signed-rank test * P≤0.05, ** P≤0.01, **** P≤0.0001.

Figure 3: CLL B cells secrete IL10, TGFβ1 as well as others soluble factors.

Graphic representation of IL10 or TGFβ1 secreted levels (A), TNFα, IL8 or IL6 (B) evaluated by "multi-ELISA"-like technology (n=17) from the culture supernatant of purified CD5⁺CD19⁺ cells stimulated (+) or not (-) with CD40L/anti-IgM for 72h. Wilcoxon matched-paired signed rank test, * P≤0.05; ** P≤ 0.01. (C) A Spearman correlation was established between the levels of

IL10 or TGFβ1 and various cytokines secreted in the supernatant of cells stimulated (right) or not (left) for 72 h.

Figure 4: Functional impact of IL10 and TGFβ1 on their immune counterparts.

Representative flow cytometry dot plots (UPN 008 and 196) and graphic representation of Treg (CD5⁺ CD4⁺ CD127^{low} CD25⁺) (A) Th2 (CD19⁻ CD4⁺ IL4⁺) (B) and Th1 (CD19⁻ CD4⁺ IFNγ⁺) (C) frequencies in PBMCs (n=7) left untreated (-) or treated with α-IL10 Ab (10 μg/ml) or TGFβRI inhibitor (SB431542, 5 μM) for 2 days. In the representative dot plots, gates indicate positive events with their respective percentages. (D) Unsupervised hierarchical cluster analysis of IL10 and TGFβ1 expression in CLL B cells from a cohort of 28 patients (UPN) allowing the distinction of 2 clusters (1 (green color) & 2 (red color)); immunoregulatory factors frequencies (values (%)) in CLL B cells from each patient are depicted in shades of red (higher) and green (lower). Percentage of treated patients (more than two years) prior to the experiment time in Cluster 1 (15%) and Cluster 2 (50%) are presented as pie (*cf.* Table 1).

Figure 5: CLL B cells express FOXP3 with IL10 and TGFβ1, which altogether constitutes a progression indicator.

(A) Thirty μg of CLL B or CD4⁺T cell lysates from 10 patients (UPN) were analyzed by western blot with the indicated antibodies; GAPDH was used as a loading control. Vertical dashed line separates a cropped membrane split into two parts with the same exposure time (B). PBMCs from CLL patients were subjected to RNA flow cytometry protocol, in which CLL B (1st line), CD4⁺T (2nd line) and Tregs (3rd line) cells were labeled with dedicated markers and stained for the FOXP3 protein (PCH101) and its RNA (FOXP3 probe). Dot plots depict the targeted cell type and each rectangle shows the positive events with its percentage (UPN 34). (C) Unsupervised hierarchical cluster analysis of IL10, TGFβ1 and FOXP3 expression in CLL CD19⁺ CD5⁺ CD27⁺ B cells from a cohort of 23 patients (UPN are indicated) determined 2 clusters (1, green and 2, red). Immunoregulatory factors frequencies in CLL B cells are depicted in shades of red (higher) and green (lower). (D) Frequencies of Tregs among PBMCs are graphed and compared between the two clusters; Mann Whitney test and $P=0.0473$. (E) According to patients' clinical annotations (Table 1, cohort 2), Kaplan-Meier plot shows the time-to-treatment distribution for clusters 1 and 2. Log-rank test was used and P value is indicated.

Table 1: Patients' biological and clinical parameters.

Numbers of CLL samples	n=97
Sex (Female/Male ratio)	34 / 63 (35.05% / 64.95%)
Age (years)	Mean: 66.91 Median: 66
IGHV mutational status	
Unmutated:	39 (40.20%)
Mutated:	55 (56.70%)
NA:	3 (3.10%)
Binet Stage at the experiment time (number and %)	
A:	61/97 (62.89%)
B:	14/97 (14.43%)
C:	10/97 (10.30%)
ND:	12/97 (12.37%)
Treatment (more than 2 years prior to the experiment time)	
Cohort #1 (n=28)	
Cluster 1 (n=17; 4 NA)	2/13 (15.38%)
Cluster 2 (n=11; 1 NA)	5/10 (50.00%)
Need of Treatment	
Cohort #2 (n=23)	
Cluster 1 (n=15)	5/15 (33.33%)
Cluster 2 (n=8)	5/8 (62.50%)

ND: Not Determined

NA: Not Available

Supplementary information: Methods

Western blotting

CLL B cells purified from individuals and CD4⁺ T cells pooled from 10 CLL samples were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with protease inhibitors (0.2 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 20 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin and 1 mM PMSF). Negatively selected and sorted B cells, U2OS, as well as MOCK- or FOXP3-transfected HEK293T cells were lysed in 1% NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 10% Glycerol with protease inhibitors). IL10 or TGFβ1 stimulated, α-IL10, α-IL10 receptor or SB431542 treated CLL B cells were lysed in 2% NP-40 lysis buffer containing anti-proteases.

Flow cytometry

Isolated PBMCs were cultured or not for 2 days, stained for viability (FVS-510, Becton Dickinson) for 10 min at 4°C according to manufactures' instructions, washed, labelled with the indicated antibodies in 2% FCS/PBS for 1h at 4°C and washed. Monocytes, B and T cell subsets were analyzed on FACSCanto II driven by the BD FACSDIVA™ software and data compiled with the FlowJo™ software (BD Biosciences).

Following 3 days of co-culture, cells were labelled with antibodies for 30 min at 4°C, washed in 2% FCS/PBS, fixed with 2% PFA/PBS for 20 min at 4°C, permeabilized with 0.5% saponin, 1% BSA in PBS for 30 min at room temperature, stained for FOXP3 in permeabilization buffer for 1h at room temperature and analyzed on the FACSCanto II (BD). A similar protocol was used for IL10 and TGFβ1 intracellular staining on 48h-cultured PBMCs and on 72h-anti-IgM/CD40L stimulated or not B cells.

Cytoplasmic TNFα and IFNγ in CD4⁺ T cells was analyzed after treatment with PIB. Briefly, after staining with Lifedead V500 (Ebiosciences) for 10 min at 4°C, cells were labelled with antibodies for 20 min at 4°C, fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm buffer (BD Biosciences) following the manufacturer's protocol and then incubated with anti-TNFα and -IFNγ or control isotype for 1h before processing on FACS Canto II (BD).

The functional impact of anti-IL10 or TGFβRI inhibitor on T cell subsets (IL4 and IFNγ) was analyzed on PBMCs cultured or not for 2 days, treated with PIB, stained for viability (FVS440UV BD) before extracellular (20 min at 4°C) and intracellular staining (1h at 4°C) using the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences). Cell subsets were analyzed on a Symphony™ A3 SORP analyzer (Becton Dickinson).

Intracellular staining for IL10, TGFβ1 and FOXP3 was performed on 48h-cultured PBMCs (cohort #2) treated with PIB, stained for viability (BD Horizon Fixable Viability Stain 440UV) for 10 min at 4°C and labelled for 30 min at 4°C with a mix of antibodies diluted in PBS

supplemented with 2% FCS and 10% BD Horizon Brilliant Stain Buffer Plus. Using the FOXP3 Transcription Factor staining buffer set (eBioscience, ThermoFisher Scientific) and according to manufacturer's protocol, cells were fixed for 45 min at RT, permeabilized for 10 min with 5% Fc Block™ (BD) and then incubated with a mix of antibodies targeting both cytokines and the transcription factor for 45 min or with isotypic controls. Samples were analyzed on the Symphony™ A3 SORP analyzer (Becton Dickinson).

For detection of RNA targets, B cells or PBMCs were processed according to the manufacturer's instructions (PrimeFlow RNA assay, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) using target-specific probe sets. Briefly, cells were treated with PIB, extracellularly labelled with a mix of antibodies for 30 min at 4°C and intracellularly stained with or without the RNA probes targeting IL10 and TGFβ1. Samples were analyzed on Canto II flow cytometer (BD).

For simultaneous FOXP3 mRNA and protein detection, thawed PBMCs (2×10^6) were cultured for 2 days, treated with PIB, stained for dead cells (BD Horizon Fixable Viability Stain 440UV) for 10 min at 4°C and extracellularly labelled for 30 min at 4°C with a mix of antibodies diluted in PBS supplemented with 2% FCS and 10% BD Horizon Brilliant Stain Buffer Plus. Cells were then fixed, incubated with human BD Fc Block™ for 10 min at 4°C before being intracellularly stained for FOXP3 or an irrelevant antibody for 45 min at 4°C in 1X PrimeFlow RNA permeabilization buffer. After a second step of fixation, cells were incubated with an RNA probe targeting FOXP3 for 2 h at 40°C, the signal was amplified by sequential steps and CLL B, CD4⁺ T and Treg were analyzed on the Symphony™ A3 SORP analyzer before processing with FlowJo.

Supplementary Figures

Supplementary Figure 1: CLL cells undertake a regulatory crosstalk with their immune counterparts

(A) Representative gating strategy for the selection of monocytes (CD14 vs CD16) and of single viable CLL B (CD5 vs CD19) and T cells (CD8 vs CD4) (UPN 119). (B) Representative histogram stagger offset of the CD19 MFI among CD4⁺ and B cells co-cultures depicting the various ratios of autologous purified cell types (1st peak: CD4⁺ T - CD19⁻; and 2nd peak: CLL B - CD19⁺) (UPN 112). (C) Representative dot plots showing the frequencies of TNF- α (top series) and IFN- γ (bottom series) in unstimulated (NS) and stimulated (S) CD4⁺ T cells co-cultured at the indicated ratios with CLL B cells (UPN 112); gates were determined based on the respective isotype antibodies.

Supplementary Figure 2: Specific subsets of CLL B cells express IL10 together with TGF β 1.

(A) Representative gating strategy for selection of single and viable CLL B cells (CD5⁺ vs CD19⁺) expressing IL10 or TGF β 1; numbers indicate the frequencies of these populations obtained after flow cytometry analysis and gates were determined based on the respective negative control staining (UPN 239). (B) Representative histogram overlays of IL10 (red) or TGF β 1 (blue) mRNA expression in CLL B cells from UPN 369 using RNA flow methodology; the RPL13A probe (green) was used as a positive control. Percentage of IL10- or TGF β 1-mRNA expressing CLL B cells among CD19⁺CD5⁺ cells obtained by RNA flow cytometry; dotted lines link individual patient samples. Quantification of CLL B cells co-expressing IL10 and TGF β 1 mRNA (n=5). (C) Representative dot plots of purified unstimulated or CD40L- α -IgM-stimulated CLL B cells labelled with α -IL10 or α -TGF β 1 antibody and their respective isotype controls (UPN 258). (D) Purified B cells were cultured for 3 days, stimulated with anti-IgM/CD40L, labelled with the indicated membrane markers and stained for IL10 (top) or TGF β 1 (bottom). MFI ratio of CD5, 19, 27, 24, 25, 27 and 38 between IL10^{+/-} (n=16) and TGF- β 1^{+/-} (n=15) cells are graphed. Wilcoxon signed-rank test * P \leq 0.05, ** P \leq 0.01, **** P \leq 0.0001. (E) Frequencies of Granzyme B⁺ in CLL or healthy control B cells were evaluated upon CD40L/anti-IgM or CD40L/IL-21 stimulation as a control by flow cytometry. Mann Whitney test with * P \leq 0.05 and *ns*, not significant.

Supplementary Figure S3: CLL B cells are sensitive to TGF β 1 stimulation and secrete BCR-independent cytokines.

(A) CLL B cells were treated with (+) or without (-) with exogenous TGF β 1 (5 ng/ml) in the presence of the indicated concentrations of SB 431542. After two days, total cell lysates were

analyzed by western blot with the indicated antibodies (UPN 334). Quantification of both phospho-Smad2/3 normalized to Smad2/3 was graphed (n=3). **(B)** Quantities of the indicated cytokines secreted in the culture supernatant of purified CD5⁺CD19⁺ cells, stimulated (+) or not (-) with anti-IgM/CD40L and analyzed by “multi-ELISA” assay. Wilcoxon matched-paired signed rank test, *ns*, not significant $P > 0.05$.

Supplementary Figure S4: Functional impact of IL10 and TGFβ1 on their immune counterparts.

(A) Graphs depict viable PBMCs number (left, n=4) or percentage (right, n=6) upon 2 days-treatment with increasing concentrations of α-IL10 or SB 431542, respectively. **(B)** CLL B cells were treated with (+) or without (-) with exogenous IL10 (40 ng/ml) in presence (+) or absence (-) of inhibitors targeting the soluble cytokine (anti-IL10; 10 μg/ml) or blocking the binding to its cognate receptor (anti-R-IL10; 2.5 μg/ml). After two days, total cell lysates were hybridized with the indicated antibodies (UPN 358). Quantification of both phospho-Stat3 normalized to Stat3 was graphed (n=6); Wilcoxon test * $P = 0.0312$. **(C)** Representative gating strategy used in flow cytometry analysis to target CD4⁺T cells from 48h cultured PBMCs (UPN 196).

Supplementary Figure S5: FOXP3 is expressed in CD19⁺CD5⁺CD27⁺CLL B cells.

(A) Cell sorting gating strategy of B cells negatively selected for CD19⁺ CD3⁻ CD5⁺ CD27⁺; numbers are percentages of cells for each dot plot. Western blot analysis of FOXP3 expression using the D608R antibody on purified as well as purified and subsequently sorted CLL B cells. U2OS and HEK293T cells transfected with FOXP3 or Mock expressing vectors were used as controls. Vertical dashed line separates a cropped membrane split into two parts with the same exposure time **(B)** Gating strategy for viable PBMCs subjected to RNA Flow cytometry approach shown in Figure 5B (UPN 34). **(C)** Gating strategy for viable CLL B cells stained for IL10, TGFβ1 and FOXP3 (UPN 265).

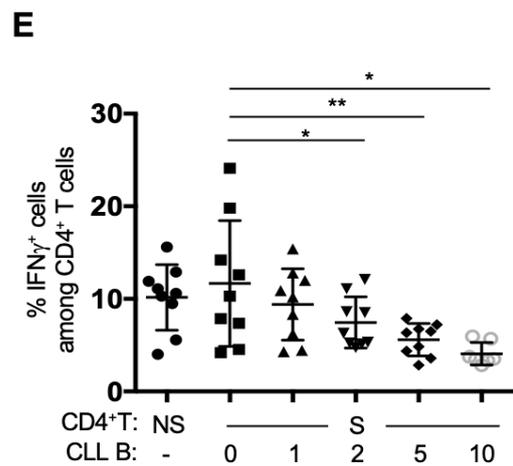
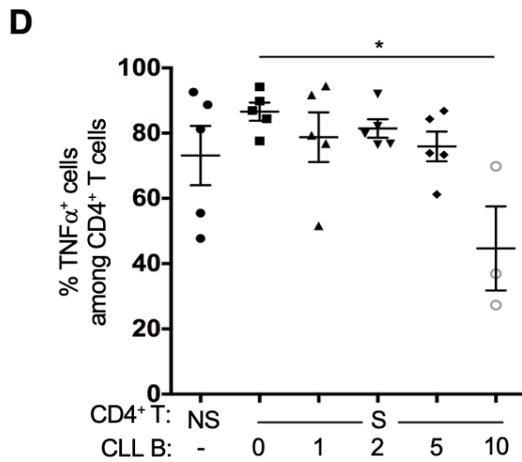
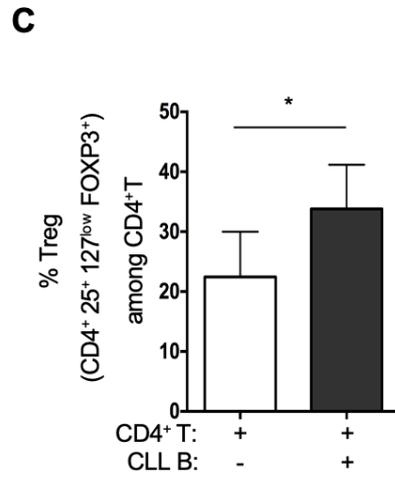
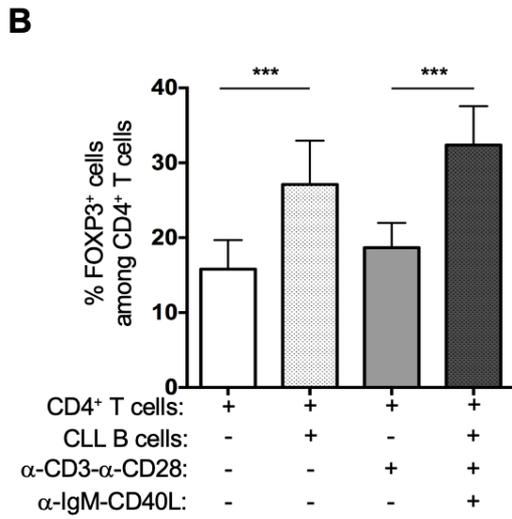
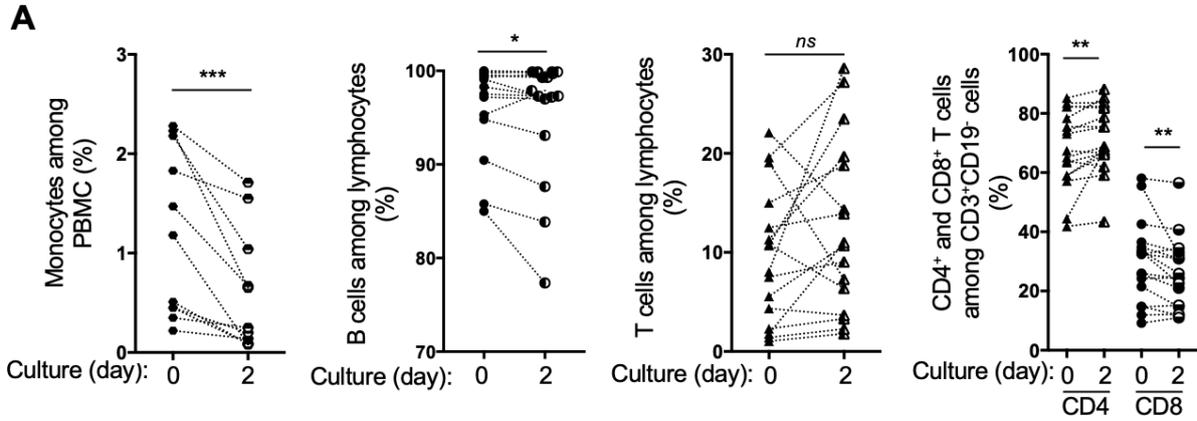


FIGURE 1

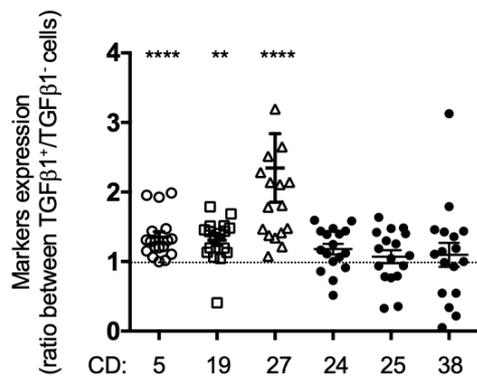
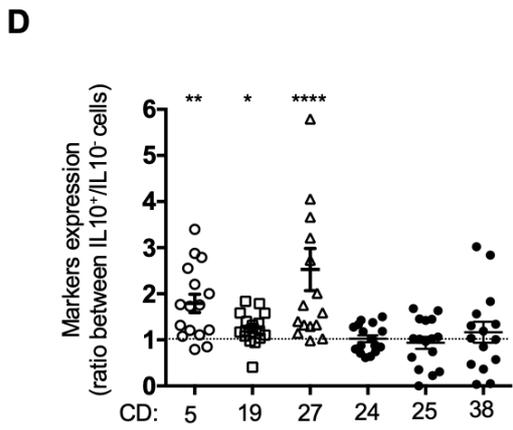
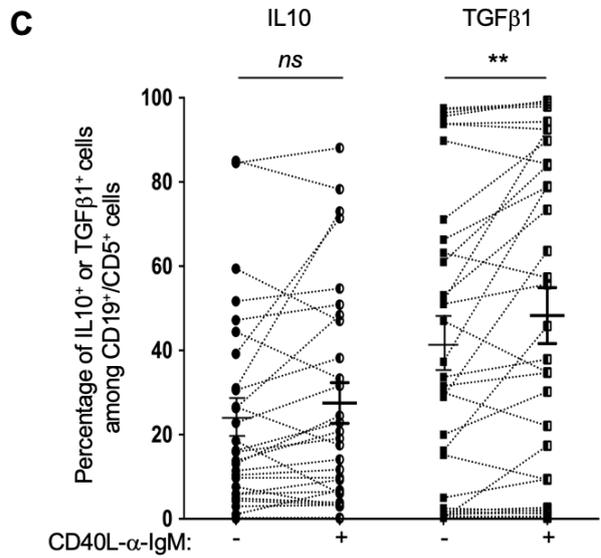
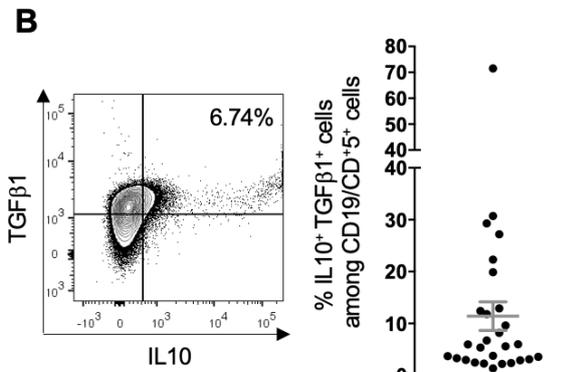
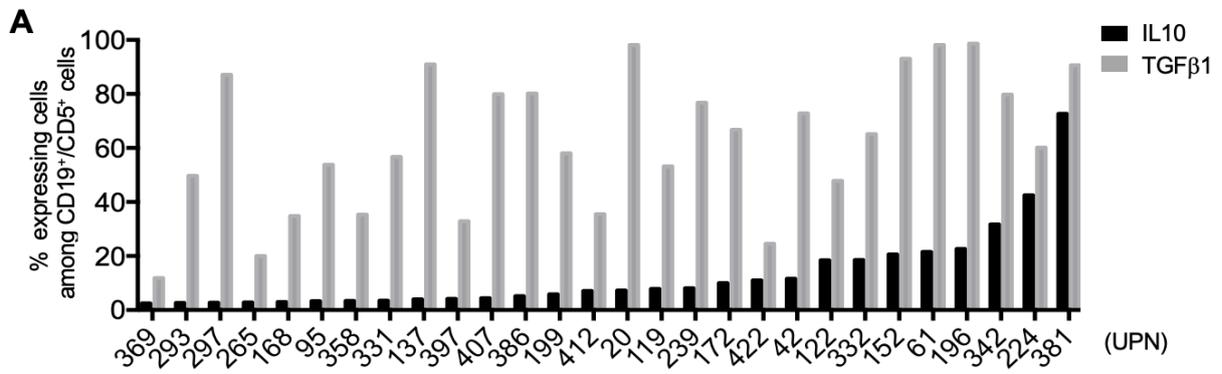


FIGURE 2

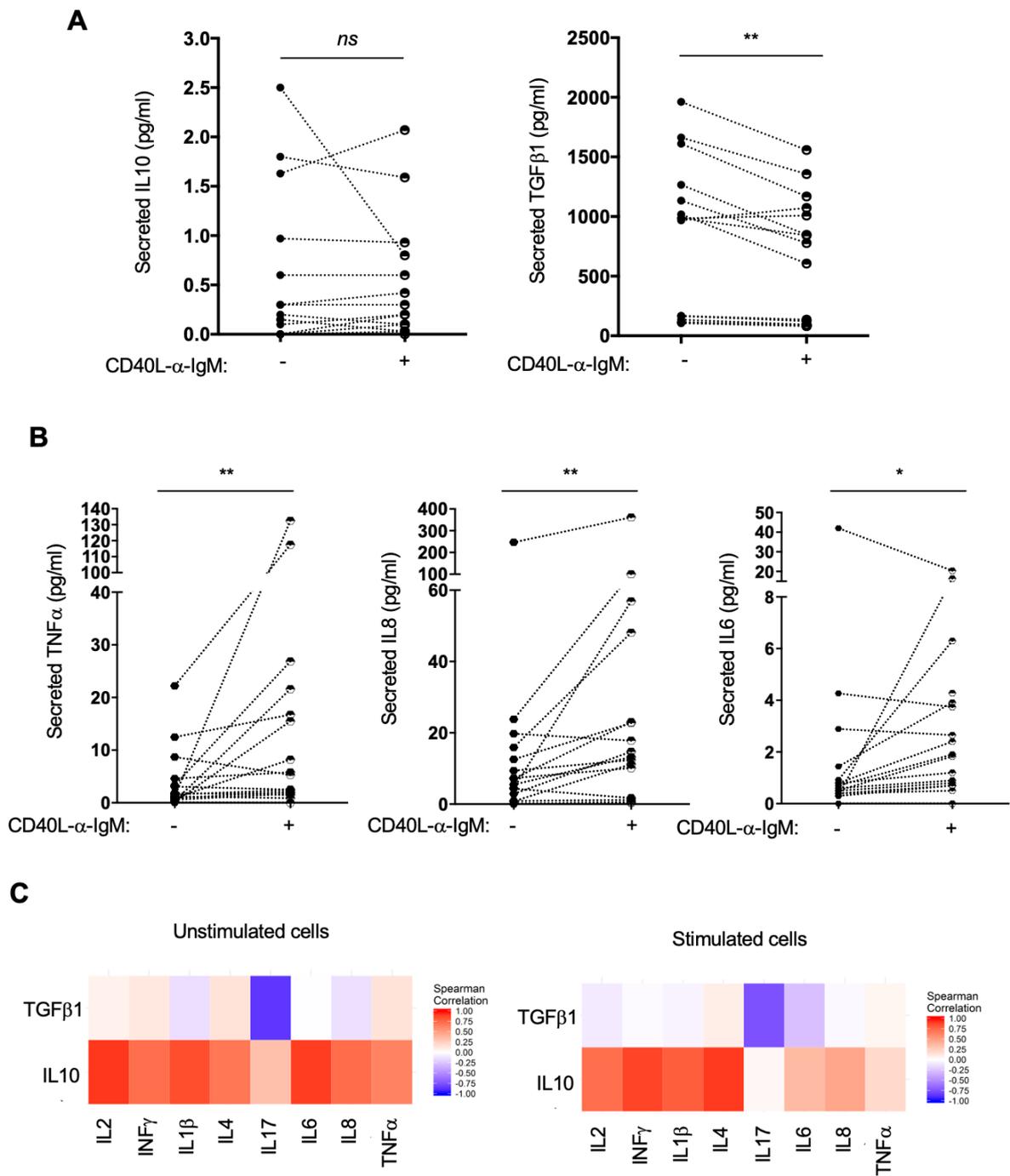


FIGURE 3

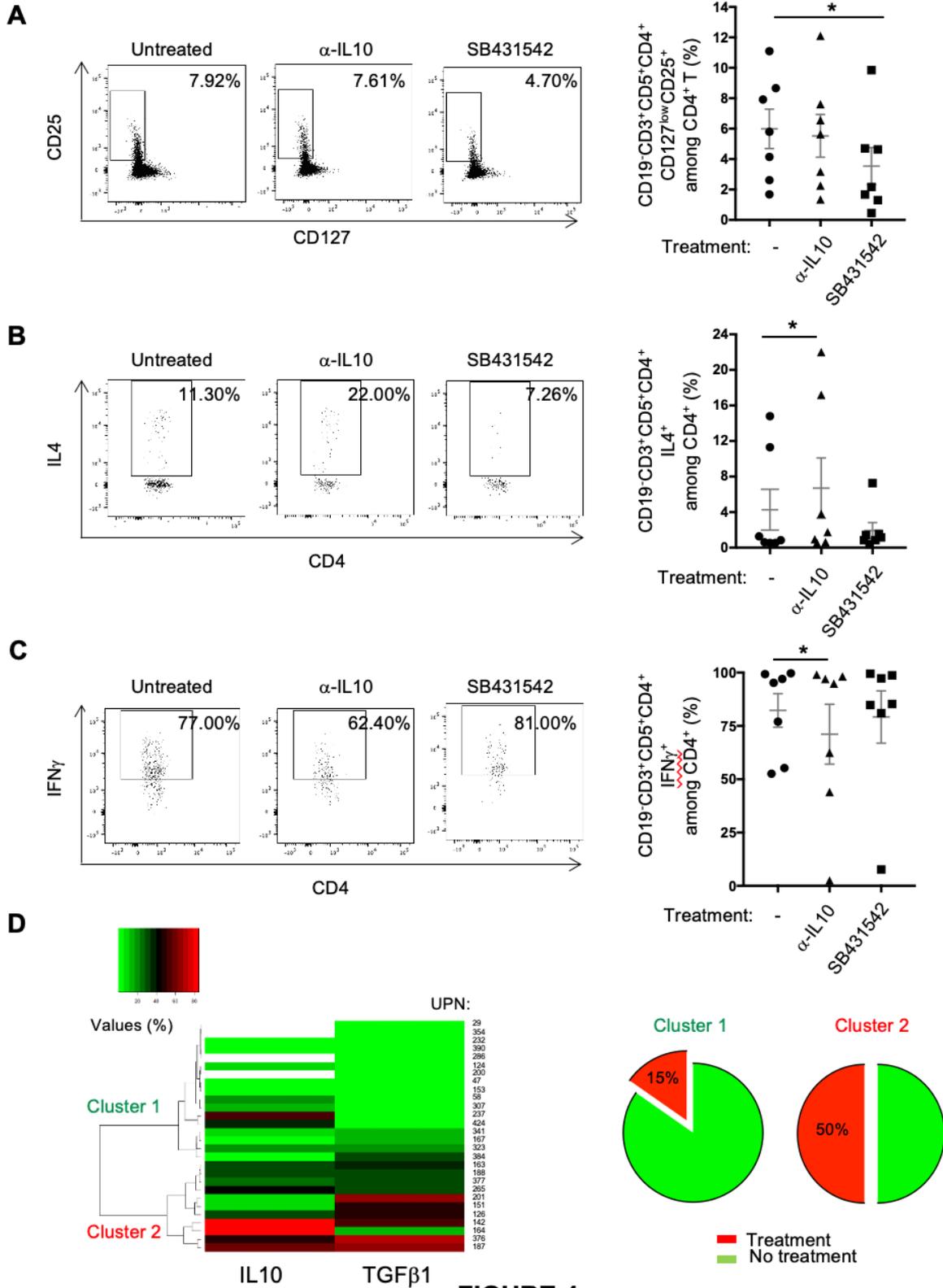


FIGURE 4

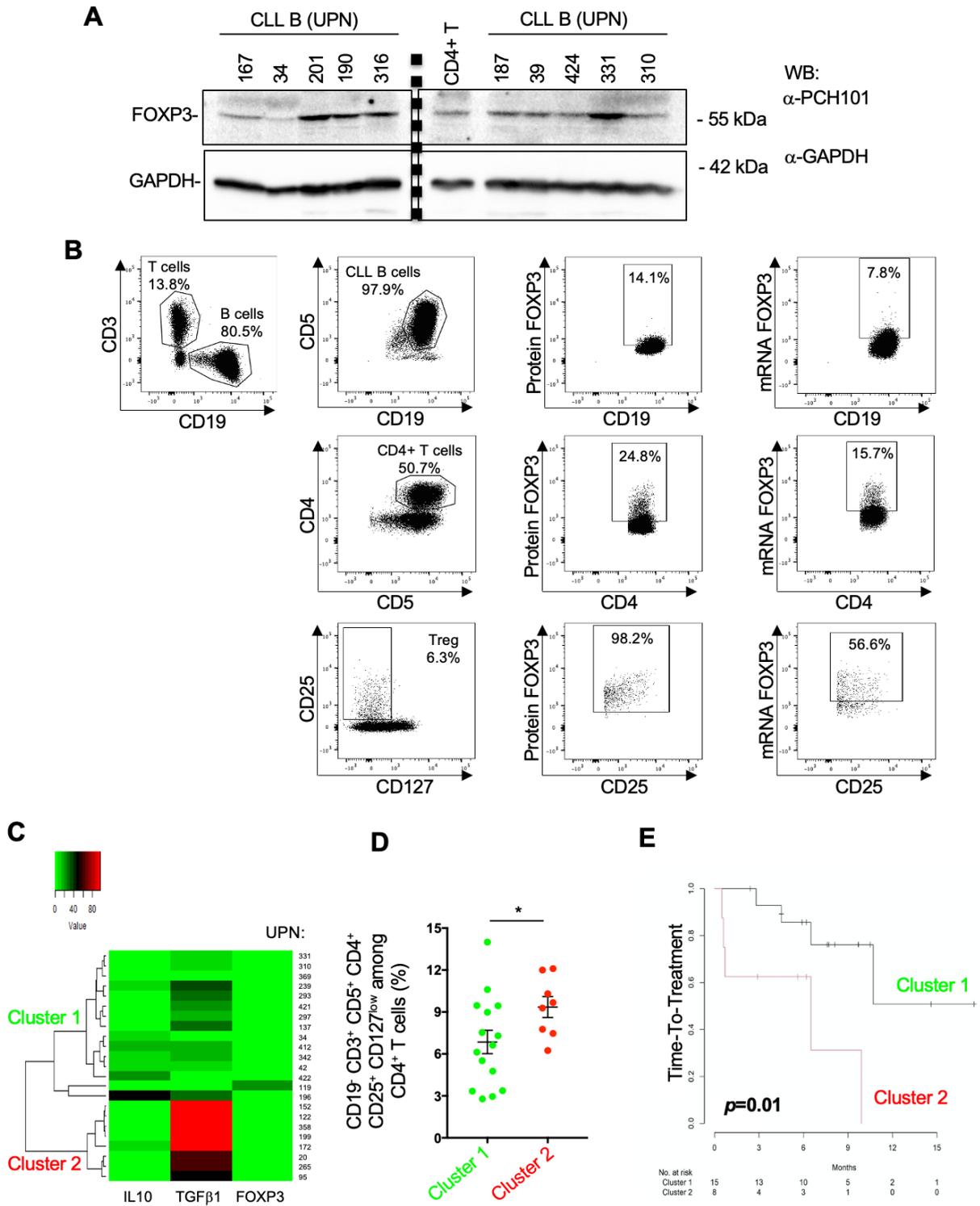


FIGURE 5

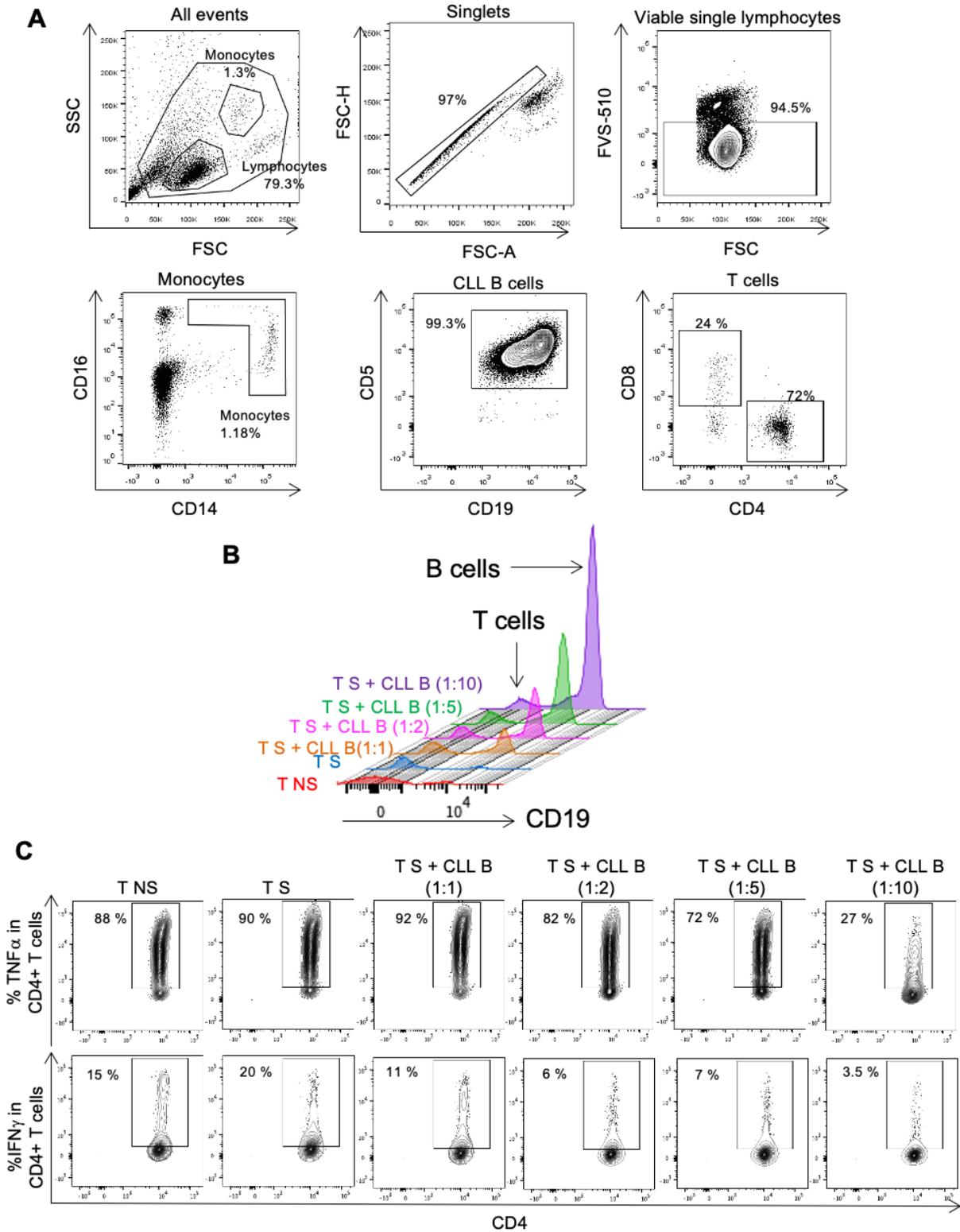


FIGURE S1

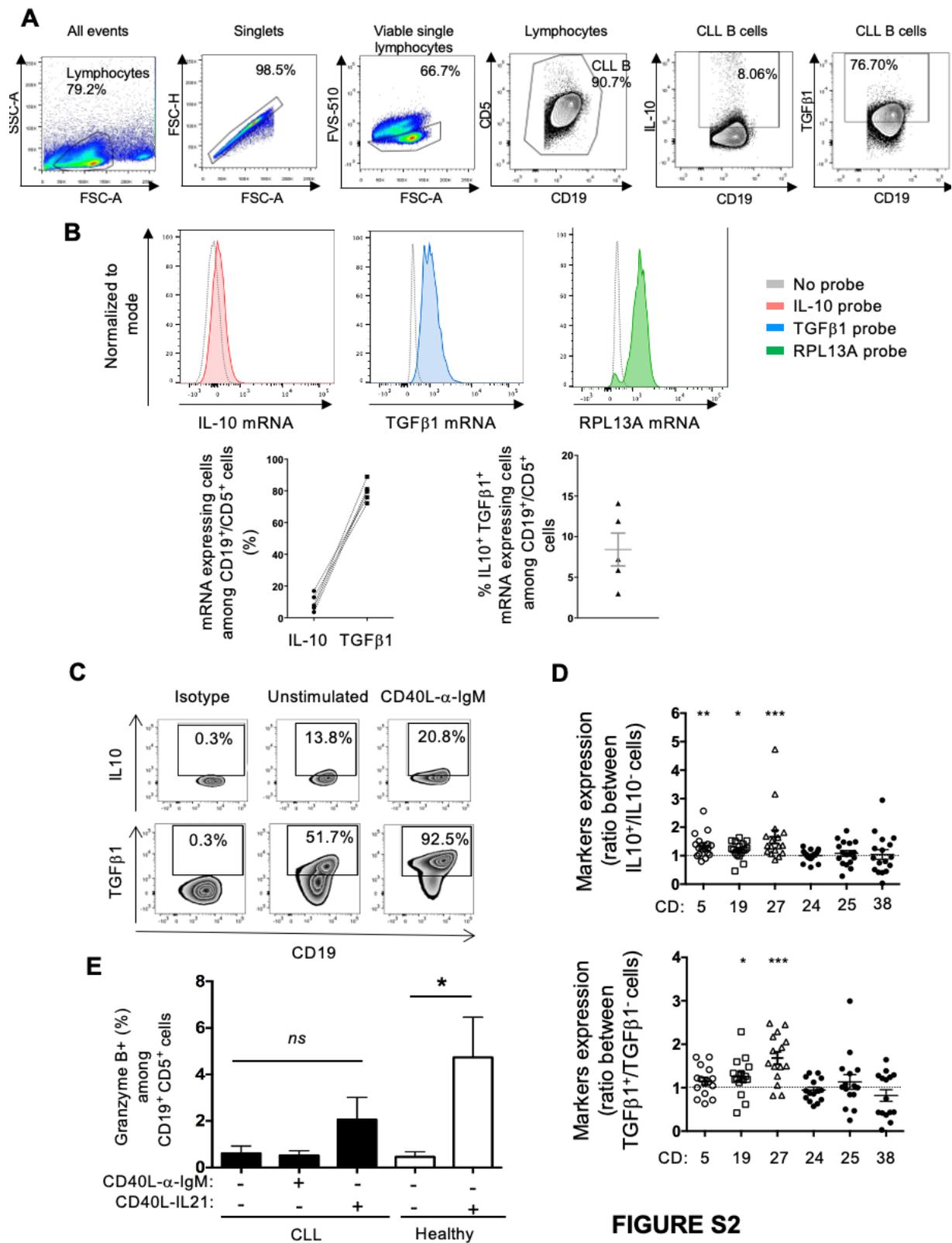
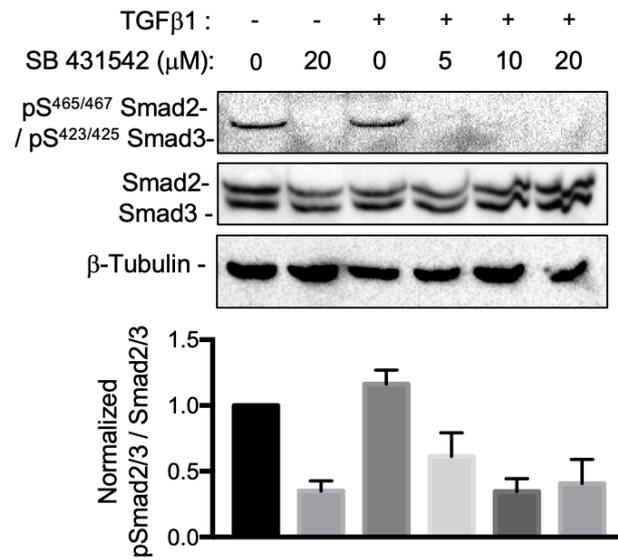
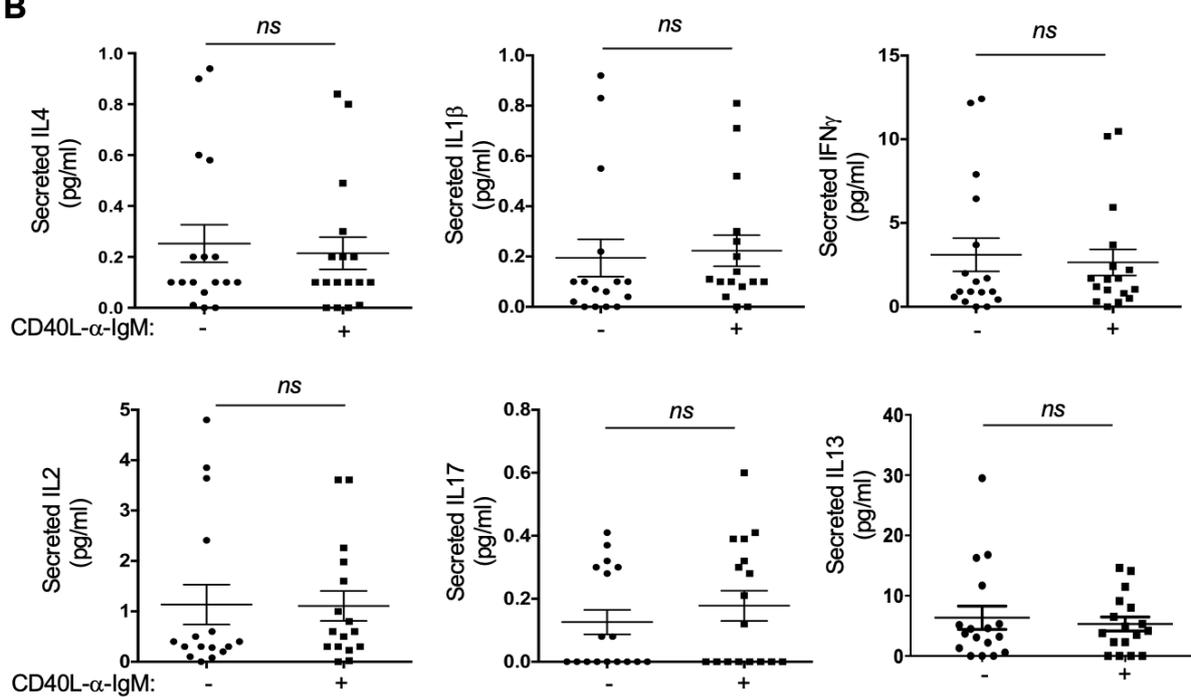


FIGURE S2

A**B****FIGURE S3**

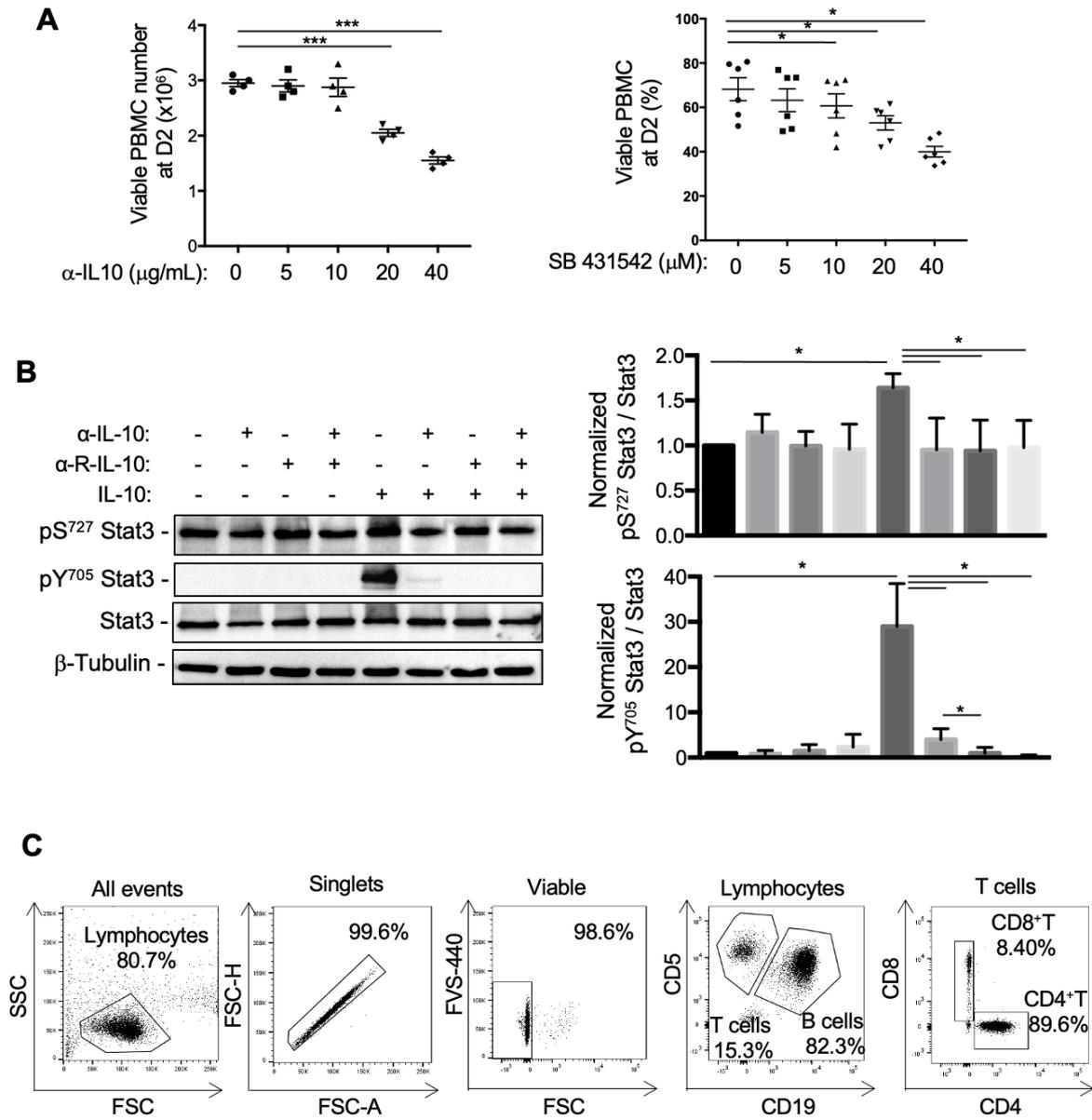


FIGURE S4

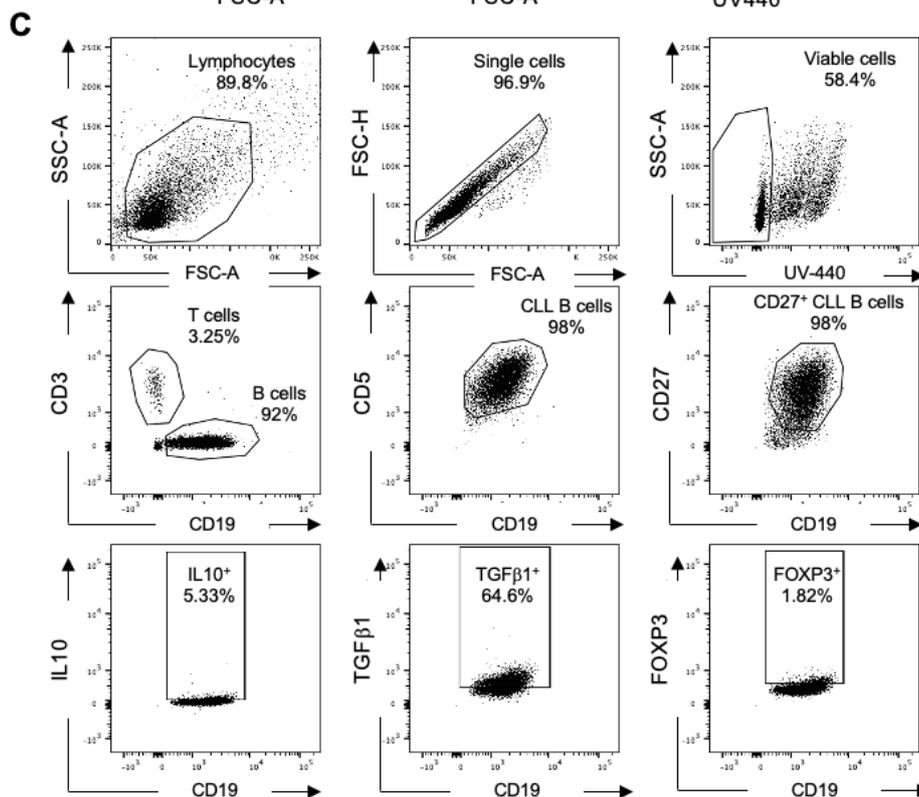
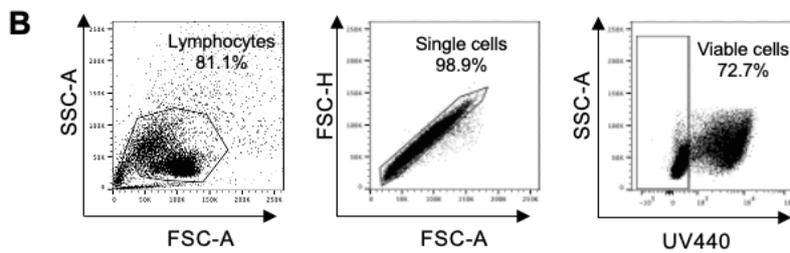
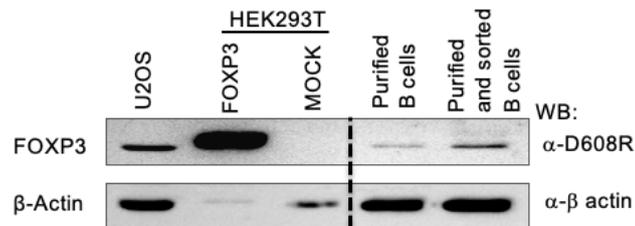
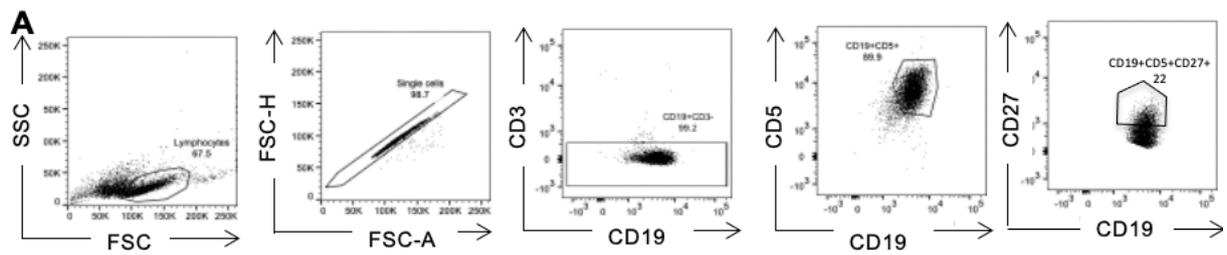


FIGURE S5

Article 2

Opposing effects of IFN γ and TGF β 1 control 2,3 Indoleamine dioxygenase expression in Chronic lymphocytic B cells

Koceila Ait Belkacem^{1,2}, Helene Jin^{1,2}, Marie Ducroux^{1,2}, Leila Abbadie^{1,2}, Vincent Levy⁴, Florence Cymbalista^{1,2,3}, Christine Le Roy^{1,2}[§] and Nadine Varin-Blank^{1,2}^{§*}

(1) INSERM, U978, Laboratory SIMHEL, Bobigny, France

(2) USPN, 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

§ These authors are co-senior authors

* Corresponding author: Nadine Varin-Blank

email: nadine.varin@inserm.fr

U978 Inserm, UFR SMBH, USPN

74 rue Marcel Cachin 93017 Bobigny

Keywords: 2,3 Indoleamine dioxygenase, Interferon gamma, Transforming Growth Factor beta, Chronic Lymphocytic Leukemia

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a neoplasm of mature CD5⁺B lymphocytes. Patients present with a heterogeneous clinical course from indolent to incurable progressive disease, which is associated with increased susceptibility to infection and secondary malignancies due to defects in tumor recognition. Part of these defects is due to an altered crosstalk with the immune microenvironment and regulatory properties are attributed to the clonal malignant B cell expansion.

CLL B cells by expressing IL10, TGF β 1 and FOXP3 exert regulatory functions which alter immune survey and provide tumor survival signals. This study explored the expression of another regulatory factor, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) that plays a key role in tryptophan (Trp) catabolism fueling cellular metabolism, thus providing a tolerogenic environment.

IDO is expressed at low levels in CLL B cells and functions in Trp catabolism. IFN γ strongly induces IDO expression in CLL B cells involving the activation of STAT1, the subsequent induction of IRF1, which finally promotes IDO and PDL1 transcriptions. Importantly, the presence of TGF β 1 inhibits the later phase of this IFN γ -dependent mechanism. Analysis of the expression of the two inflammatory or regulatory cytokines indicates a heterogeneous profile with IFN γ -mediated expression of IDO and TGF β 1-mediated inhibition modulating tolerance or reversely regulatory pathways.

Introduction

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a common neoplasm of the elderly in western countries. Patients present with a heterogeneous clinical course that do not affect life expectancy for a large proportion of them while others experience a rapidly progressive disease and need of treatment (1). CLL is associated with quantitative and qualitative alterations of both innate and adaptive immune cells, which increase susceptibility to infection, as well as autoimmune disease. Patients have also a certain propensity to develop secondary malignancies due to defects in tumor recognition and immune survey (2, 3).

Leukemic cells consist of mature and experienced B lymphocytes, which accumulate in the blood flow and in hematopoietic organs. In the course of clinical progression, a proliferative pool has been characterized in enlarged and fully disorganized lymph nodes (4, 5). A number of genetic alterations have been described with variable burden among patients (6-8). However, one of the prevalent criteria to distinguish patients at risk of progression to those with an indolent disease remains the mutational status of the heavy chain variable region of immunoglobulins involving or not T cell dependent immune response (IGHV) (9).

In lymph nodes and bone marrow, CLL cells have an enhanced survival that relies not only on defective apoptosis *in vivo* but also on reciprocal crosstalk with stromal and immune cells of the tumor microenvironment. On one hand, CLL cells receive protective and activating signals from the surrounding stromal cells (10, 11). In addition, CLL cells regulate by various mechanisms their immune counterparts. Specifically, they lead to deleterious signals toward cells responsible for tumor recognition and removal, while educating to their profit cells such as monocytes that generate protective signals (2, 12-15).

Several reports including ours described a variable proportion of cells with regulatory properties within the clonal B cell expansion. Tedder and colleagues evidenced a B-10 like population, secreting IL10 and promoting CD4⁺ Treg expansion (16). Drennan and al. characterized this population among IGHV mutated patients and IL10 production was identified as dependent of its promoter demethylation (17). Production of several other regulatory factors, such as TGFβ1 or FOXP3, has been observed among both indolent and

progressive patients. These factors strongly impact the balance between Th1/Th2 *versus* Treg populations and conduct a strong exhaustion of cells recognizing tumor B cells, including CD8 cytotoxic T cells and NK or NKT cells (10, 13, 15).

Among the various parameters and signaling effectors involved in these regulatory mechanisms, a key role is given to molecular sensors of cellular energetic capacity and essential amino acid metabolism, such as the tryptophan one (18). Alteration of the homeostasis of these metabolites leads deficiency in the production of NAD⁺ and ATP, which both are fueling cellular metabolism. Also, deregulated expression of various enzymes responsible for the homeostatic control of these essential amino acids contributes to a marked inflammation, autoimmunity, transplant tolerance, chronic infection and cancer (19-23).

Tryptophan (Trp) catabolism through the kynurenine pathway drives innate host defense against microbial infection. This catabolism, which is initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), drives an immunoregulatory pathway that promotes a protective immune response balanced between inflammation and tolerance(21, 24, 25). Beside its enzymatic properties, IDO plays a critical role in peripheral tolerance and its expression is tightly regulated at both transcriptional and stability levels. One major transcriptional regulation of IDO is operated by type I/II Interferon (IFN) response while stability of the enzyme is under control of a SOCS3-dependent proteasomal degradation. IDO is also acting in a feedback loop in type I IFN production preventing *via* this bidirectional crosstalk excessive inflammation (26, 27).

Trp catabolites and IDO expression have been involved in several hematopoietic diseases and leukemic neoplasms. Addressed in CLL disease, this study proposes a model focusing on the mechanisms underlying IDO expression in the context of a defective immune tumor survey. Our results show that IFN γ is a major inducer of IDO expression through a STAT1/IRF1 pathway. In line with the heterogeneous profile of inflammatory or regulatory cytokines of CLL patients, our results indicate a competitive role for TGF β 1 on IDO expression, which might reflect a regulatory pathway involved in tumor tolerance.

MATERIALS AND METHODS

Patients

CLL blood samples were obtained during clinical observance of patients at various stages of the disease after informed consent and approval by the local ethic committee (CLEA, GHPSSD, Avicenne hospital). CLL diagnosis was confirmed using international guidelines. Table 1 summarizes the clinical and biological parameters (Service d'Hématologie Biologique, Avicenne hospital), including age, sex, Binet stage, CD38 expression, IGHV mutational status, cytogenetic features, P53 mutation at the experimental time, as well as treatment status for the cohort of patients.

Human cell isolation, cell lines and cell cultures

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated by density gradient. Lymphocytes were isolated from total blood by negative selection using B and CD4⁺ isolation kits (Miltenyi and STEMCELL Technologies, France). Purified B cells subsets purity was assessed by flow cytometry and were typically > 95% pure. Cell viability was quantified with the Vi-CELLS™ XR Cell Viability Analyzer based on the Trypan Bleu Exclusion method (Beckman Coulter, Life Sciences, France). All primary cells and HG3 cell line (4×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI 1640 containing L-glutamine, supplemented with 100 U/mg/ml/penicillin/streptomycin and 10% FCS (PAA, France) at 37°C and 5% CO₂ for the indicated times. B cells were treated with IL-10 (40 ng/ml, Miltenyi Biotec) , TNF α (40 μ g/ml, Miltenyi Biotec), TGF β 1 (5 μ g/ml, Miltenyi Biotec), LPS (5 μ g/ml ; Miltenyi Biotec), IL-6 (40 ng/ml, Miltenyi Biotec), IFN γ (0.5 ng/ml or 40 ng/ml, Miltenyi Biotec). For cytokine detection by flow cytometry, Brefeldin A (BFA) (10 μ g/ml, Sigma Aldrich), PMA (500 ng/ml, Sigma Aldrich) and Ionomycin (1 μ g/ml, Sigma Aldrich) were added for the last 4 hours of culture.

Immunoprecipitation and Western blotting

Protein extracts were prepared in NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCL [pH 7.5], 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 % NP-40) containing protease inhibitors (10 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml pepstatin, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium fluoride and 1 mM Na₃VO₄). Proteins were separated by SDS-PAGE transferred on Hybond membrane (Life technologies) and probed with appropriate primary and HRP-conjugated secondary antibodies (Table 2). Detection was performed using ECL kit (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) and image were acquired with a Chemidoc MP (Bio-Rad). Quantification was performed using Image Lab 4.10 (Bio-Rad). For immunoprecipitation, cell extracts were incubated overnight with the indicated antibodies after 1 hour preclearing. Beads were further washed with the lysis buffer and precipitates were eluted in 4X Laemmli buffer prior to immunoblotting.

Cell fractionation

Membrane, cytoplasmic and nuclear fractions were prepared using the subcellular cell fractionation kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions starting from 10x10⁶ B cells. Protein concentration was quantitated using the BCA protein assay kit (Pierce).

Flow Cytometry

Freshly isolated PBMCs, leukemic B cells in culture or not were stained for viability, extracellularly labelled with antibodies for CD antigens, fixed and permeabilized, intracellularly stained for cytokines (Table 2). After washes, cells were analyzed on Symphony™ A3 SORP analyzer (Becton Dickinson) driven by the BD FACSDIVA™ software and data compiled with the FlowJo™ software (BD Biosciences).

Quantification of cytokines secretion, IDO and metabolites

Cytokines (IFN γ , IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-4, IL-6, IL-8, TNF α and TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3) were quantified in the serum of CLL patients by U-plex assays (MSD) according to the manufacturer's protocols. IDO intracellular production was quantified by IDO DuoSet ELISA Development System Kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 450 nm. Tryptophan and kynurenine concentrations were measured with competitive enzyme-linked immunosorbent assay using the kynurenine/tryptophan ratio ELISA pack (cat.no ISE-2227, ImmuSmol, Bordeaux, France)

Quantitative reverse transcription PCR

RNAs were extracted using Trizol Reagent (Invitrogen) followed by RNeasy Mini kit (QIAGEN). Reverse transcription was performed with iScript cDNA Synthesis Kit following the manufacturer's protocol (Biorad). All genes expression (Table 3) were analyzed by quantitative RT-PCR with SYBR Green reagents using the StepOnePlusTM System instrument (ThermoFisher scientific). Results were normalized to Cyclophilin and all experiments were done in duplicate. Primers used for amplification were purchased from Eurogentec.

Statistical analysis

Data are expressed as means with SEM or numbers with frequencies. For the comparison of quantitative values, the parametric t-test Student test was used for the continuous variables. For competition experiments, the Anova-test Oneway was used. Analyses were carried out using Graphpad statistical software.

Results

CLL cells show a cytokinic and immune heterogeneous regulatory profile

Strong prevalence of B lymphocytes over T cells in CLL peripheral blood is a feature of the disease as compared to healthy donors. Noteworthy, CLL is accompanied by a large decrease of immune cells responsible for tumor recognition and removal (28). In a cohort of untreated CLL patients, we observed a profound reduction of T cell percentages, for both CD4 and CD8, as well as NK and NKT cells; reversely, the B cell compartment was strongly amplified compared to control PBMCs. Within the CD4⁺ T cell population a modest increase of regulatory T cells was observed in several blood samples while Th1 cells strongly declined and Th2 remained low in malignant PBMCs (**Figures 1A and S1A**). The levels of various cytokines representative of the different populations were then analyzed in the serum of the patients and compared to those of healthy donors. High levels of IFN γ were found in the serum of a number of patients compared with controls. The other cytokines tested, including IL4, IL6, IL8, IL10, TNF α , IL17 and IL35 were present at low levels in both groups; TNF α being nevertheless differentially higher for CLL patients. At the opposite, TGF β 1 levels were significantly lower in patients' sera, while TGF β 2 and TGF β 3 were not significantly different and present at very low levels in CLL and HD samples (**Figure 1B**).

Due to the opposite roles of these factors in immune crosstalk during inflammatory and tolerogenic process, we analyzed the cellular subsets responsible for these high levels of IFN γ . Using multiparametric flow cytometry methodology, the production of IFN γ was investigated in different subpopulations (**Figure S1B**). Greater proportions of IFN γ ⁺ T4, T8, NK and NKT (%) were seen in healthy controls compared with CLL PBMCs. Although in smaller proportion in CLL samples, IFN γ ⁺ B, CD8 T and NKT cells expressed more the cytokine (MFI) than their normal counterparts (**Figure 1C**).

CLL cells express basal and inducible indoleamine 2,3-dioxygenase

CLL B cells exert regulatory properties toward their immune counterparts involved in tumor recognition by expressing and secreting factors, such as IL10 and TGF β 1 (Mekinian et al., in press). These factors are produced by leukemic subpopulations present in heterogeneous proportions among patients during disease progression. Other regulatory molecules, including indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), impact also directly or indirectly immune tumor survey (20, 25). Moreover, IFN γ , which was present in high quantities in CLL sera (Figure 1B, left), has been shown as a major IDO-inducer in solid tumor infiltrates (24). Therefore, we determined whether CLL B cells might express the regulatory enzyme. Purified B cell extracts from 15 CLL patients (UPN) were analyzed by biochemical assays. A basal expression of IDO was barely detected by western blot analysis for several patients at levels comparable to those of the human CLL cell line HG3 (**Figure 2A left**). Cellular lysates were also subjected to ELISA as a more sensitive methodology, which allowed detection of IDO in every sample tested (**Figure 2A right**). Then, the activity of the enzyme was evaluated by quantification of one major metabolite, kynurenine, which allowed to delineate two groups of samples. This result was confirmed on a larger set of samples with one group showing higher amounts of kynurenine, while the second one was comparable to levels found in healthy donor samples (Figure 2B left and right). The highest levels of kynurenine were linked to those of the IDO enzyme and the ratio between Trp and its catabolite kynurenine tends to be lower in CLL samples compared to control samples showing some consumption of Trp (**Figure S2A**).

Several cytokines and immune activation were then tested for their capacity to induce IDO expression at the translational et transcriptional levels. As described in several solid tumors, IFN γ (40 ng/ml/4x10⁶cells) exposure showed the more pronounced effect on IDO protein expression. As shown by western blot quantification, stimulations with IL10, IL6, TNF α , TGF β 1 or immune activation with LPS showed only a weak effect on IDO protein levels. The IFN γ -dependent transcriptional induction was confirmed on IDO transcript by RT-qPCR analysis and LPS showed also a weak increase of the enzyme mRNA (**Figure 2C**). A similar induction of the IDO protein was observed upon IFN γ stimulation and not upon TNF α in the human cell line HG3 (**Figure S2B**).

IFN γ -dependent induction of IDO and PDL1

In order to clarify the mechanism responsible for IDO induction in CLL B cells, a kinetic of activation was performed on purified primary cells and the levels of expression and activation of IFN γ -dependent effectors were analyzed by western blot. Upon 1h-activation with IFN γ , STAT1 phosphorylated at Y701 was already detected (**Figure 3A**). The latter was recruited into the complex formed at IFN γ receptor, as shown by immunoprecipitating STAT1 and INF γ -R1 (**Figure S3A**). Maximum phosphorylation of Y⁷⁰¹ STAT1 was reached after 6 h of incubation and remained elevated at longer time points (**Figure 3A**). A similar activation was seen in HG3 cell line (**Figure S2B**). In a sub-cellular fractionation, the activated STAT1 accumulated in the nucleus during this time frame (**Figure S3B**). A self-induction mechanism of STAT1 was also seen as described in other cellular models possibly participating to the sustained recruitment at IFN γ R up to 24h activation. Moreover, an increase of STAT1 was observed at the protein level after 12h of IFN γ -treatment and induction was confirmed by RNA accumulation after 6h of incubation (Figure 3B, left). Nuclear accumulation of phospho-Y⁷⁰¹ STAT1 was consistently followed by induction of IRF1, one of its important target gene, which was visible both at the RNA and protein levels already after 1h IFN γ activation. In line with IRF1 induction, a second wave of activation led to the expression of IDO seen after 6h and 12h of IFN γ incubation for RNA and protein respectively (**Figure 3A-B**). Finally, we evaluated the levels of Trp and its catabolite Kynurenine in the culture supernatant, which validated the enzymatic activity of IDO with a significant decrease of the ratio Trp/Kynurenine after 48h (**Figure 3C**).

The IFN γ -dependent activation cascade of CLL-B cells was further validated by the concomitant induction of PDL1, another key player of tumor survey. The kinetic of induction of the immune checkpoint were similar to those of IDO with a significant induction of the RNA at 6h of IFN γ treatment and detection of the protein by western blot (Figure 3D-E) or flow cytometry after 12h (Figure S3C). A graphic representation of the transcriptional and translational regulations of STAT1, IRF1, IDO and PD-L1 shown in Figure S3D highlights the two waves of induction leading first to IRF1 expression followed by those of IDO and PDL-1.

IFN γ and TGF β 1 have antagonistic roles on IDO production by CLL B cells

The analysis of sera from CLL patients and healthy donors showed a significant and opposite difference of IFN γ and TGF β 1 production by immune cells (Figure 1B). IFN γ was more abundant in CLL sera while TGF β 1 was preponderant in healthy controls. Considering their respective roles during an inflammatory response and their opposite impact on the regulatory orientation during anti-tumor survey, we analyzed their relevant role in IDO production by CLL B cells (29). First, dose-response stimulations were realized on purified B cells with IFN γ and TGF β 1 at lower concentrations consistent with those observed by ELISA. Cellular activation of various patient samples was observed upon stimulation with IFN γ or TGF β 1 as low as 0.5ng/ml/ 4x10⁶ cells (**Figure 4A**). In every sample tested, stimulation with IFN γ for 24 h allowed detection of phosphorylated Y⁷⁰¹ STAT1 and induction at various extents of IDO (**Figures 4A-C**). Similar results were obtained in the HG3 cell line (**Figure S4A**). Stimulation by TGF β 1 up to 1 ng/ml/4x10⁶ cells resulted in several samples, but not all, in the phosphorylation of Ser^{465/467} Smad2 (Figures 4A) without affecting IDO expression. Of note, expression of Smad3 was not observed in the tested patient samples while both Smad2 and 3 were expressed in the HG3 human CLL cell line. However, the later did not respond in terms of Smad phosphorylation to TGF β 1 treatment (**Figure 4A-C and Figure S4A**).

Thus, these experiments allowed to define the stimulatory conditions (0.5 ng/ml IFN γ and 1 ng/ml TGF β 1) to dissect the influence of both cytokines on IDO production. Then, isolated or combined stimulations were used on patient samples to evaluate the activation of IFN γ - and TGF β 1- dependent effectors and induction of both IRF1 and IDO. As shown in **Figure 4C**, the presence of TGF β 1 strongly interfered with the IFN γ -mediated induction of IDO; at the opposite, expression of IRF1, the earlier inducer of the pathway, was not affected in these conditions. Indeed, STAT1 phosphorylation was activated by IFN γ and not modified in the presence of TGF β 1. Finally, when stimulation by TGF β 1 resulted in Smad2 phosphorylation, the combined presence of IFN γ did not modified significantly the activation of this TGF β signaling effector. Furthermore, activation of one of the non canonical signaling pathways of TGF β leading to p38 phosphorylation was always detected in the patient samples and even at high levels for several samples at basal levels (**Figure 4C and S4B**).

The activating role of IFN γ on CLL B cells was confirmed by the profile of cytokines produced in the supernatant of the cells upon stimulation. Secretion of the inflammatory response cytokines, such as IL4, IL6, IL17A or TNF α was increased by IFN γ and not by TGF β 1 treatments. None of the two factors modified the secretion of IL8. Furthermore, co-stimulation with TGF β 1 did not alter this secretory profile. Alternatively, TGF β 1 stimulation did not modify the secretory profile of CLL B cells toward the production of regulatory cytokines, such as IL10 or IL35 (**Figure 4D**). This result argues for a regulatory role of TGF β 1 on IFN γ -dependent induction of specific targets important for the tumor tolerance of the immune counterparts.

Discussion

Regulatory roles are attributed to several cytokines and factors, such as IL10, TGF β 1, Granzyme, IL35 and IDO, due to their impact on different immune cells that are involved in pathogen clearance, inflammation resolution and tumor clearance (30). Important balances between activation and inhibitory signaling are mediated by these factors, which implicate them in the development and progression of various pathologies, including host *versus* graft response, chronic inflammation, autoimmunity and cancers (31, 32). If these regulatory functions are now regularly investigated in solid tumors, assessment of these mechanisms and crosstalk in hematopoietic neoplasms remains challenging.

We undertook in this study the characterization of the mechanisms by which CLL cells might express IDO, a central player in antigen presenting cells and in the maintenance of tolerogenesis of the immune system(20, 25). This tolerant microenvironment is one of the key features accompanying CLL lymphocytosis and ultimately clinical progression. This study was built on previous findings demonstrating regulatory properties of CLL B cells toward their immune counterparts leading to enhanced leukemic cell survival and altered immune survey (Mekinian et al. in press). The regulatory population was characterized by expression of a relative homogeneous pattern of IL10 secretion and a highly heterogeneous profile of TGF β 1 secretion among CLL samples: several CLL B cells expressing high levels of the growth factor while others had very poor expression. Our data show a heterogeneous profile of TGF β 1 supported by a high pattern of IFN γ expression in CLL patients' sera, arguing for a chronic inflammatory context. PBMCs analysis confirmed the altered Th1 response and the defect in NK and NKT cells accompanying CLL disease and defective tumor clearance. The heterogeneous profiles of circulating higher IFN γ and lower TGF β 1 compared with healthy donors brought the question of their relative impact on the regulation of IDO expression that is described as a target of both cytokines in different cellular contexts (24, 33). Even if the proportions of IFN γ ⁺ CLL B cells were rather low, their production was more abundant than those of the normal counterpart. We also observed a similar difference in CD8⁺ and NKT cells. The latter finding is in agreement with IDO's indirect suppressive activity on these cells and the low levels of these cells in CLL PBMCs.

We established that IDO was detected at low levels in several CLL B cell samples. This finding strongly suggests the tight regulation both at the transcriptional and post-translational levels of this important metabolic enzyme that controls access to tryptophan(33). Importantly, Trp depletion results in suppression of T cell proliferation and increased apoptosis(19, 23). We observed a strong induction of IDO upon stimulation with IFN γ . This induction involved activation of various effectors, such as STAT1, already described in other cell types, as well as induction of IRF1, that is able to promote IDO transcription. A mild effect of LPS was also observed on the transcriptional regulation of *Ido1* and was not significant at the protein level probably due to the post- translational regulation of IDO by SOCS3- dependent proteasomal degradation. This mechanism was uncovered in a more acute inflammatory context where IL6-driven signaling leads to IDO degradation (27). The precise study of IFN γ -driven mechanism of induction demonstrated a kinetic with two successive waves seen at both RNA and protein levels. In a first step, the recruitment of STAT1 at IFN γ R and its phosphorylation allowed activation of the transcription factor. In turn STAT1 translocated to the nucleus to promote expression of IRF1 as well as a self-modulation of its expression. *De novo* expression of STAT1 prolonged the initial effect of the stimulation. This modulation was seen even when low concentrations of IFN γ were used showing that concentrations compatible with those observed in the fluidic microenvironment might allow a comprehensive activation of CLL cells. A second wave consisting in the maximal expression of IRF1 after 6h of IFN γ stimulation allowed the transcription of IDO and a slightly delayed increase of the protein. Interestingly, we also observed the induction of a second target gene of IRF1, the checkpoint molecule PDL1 that has also strong modulatory functions in the immune response. Its expression activates inhibitory receptors and leads to T cell exhaustion and lost of efficient immune response (34, 35).

At the opposite, IDO in CLL B cells was not induced by a TGF β 1-dependent mechanism as previously described in plasmacytoid DCs (24). Nevertheless, B cells exhibited some TGF β 1 driven activation of the canonical as well as non-canonical signaling pathways. TGF β 1 stimulation led, in several samples, to a relevant phosphorylation of Smad2 and, phosphorylation of p38, in a majority of samples, even in basal conditions. However, CLL B cells showed a restricted capacity to respond to TGF β 1 since patients' samples did not express Smad3. Interestingly, the HG3 CLL cell line was unable to respond to TGF β 1 stimulation in

terms of Smad2/3 phosphorylation and effectors of non-canonical signaling pathways should be investigated. This absence of response to rather low doses of TGF β 1 is an argument against a role for IDO as working at inducing a stably regulatory phenotype in these cells (pallota et al (24). However, its catalytic function toward Trp and production of its catabolite kinurenine was maintained in these cells since after 48h of culture with IFN γ we observed a significant decrease of the Trp/kin ratio. Our results also highlight a competitive mechanism between IFN γ - and TGF β 1- cellular activation in the leukemic cells probably depending on a IFN γ -oriented or TGF β 1-dominant microenvironment. Indeed, early effectors of IFN γ -mediated induction are not the direct target of this inhibitory effect of TGF β 1 since phosphorylation of STAT1 was not modified in the culture where both cytokines were present. The absence of an effect of TGF β 1 on IRF1 induction gives credit to a competitive mechanism taking place at the transcriptional level for the expression of IDO. Of note, TGF β 1 *via* phosphorylation of Smad2/3 regulates positively its own expression and it remains to determine whether the limited expression of these effector might impose a TGF β 1 *versus* IDO competitive regulation (22). In line with this point, we analyzed two samples from one individual at two stages of the disease and found expression of IDO correlated with the highest levels of IFN γ which also corresponded with lower levels of TGF β 1 (UPN 334). Altogether, our results give credit to a model in which a IFN γ dominant microenvironment would favor expression of IDO to maintain a tolerogenic response in frame with a stable lymphocytosis while dominant expression of TGF β 1 would inhibit IDO expression and favor the direct activation of regulatory pathways including differentiation of Tregs, self-induction of TGF β 1 and lack of tumor recognition. A larger analysis with patient samples at various stages of the disease should shed lights on this working hypothesis and give new insights on the fine immune regulation operated by CLL B cells based on signals provided by the surrounding tumor microenvironment.

References

1. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17008.
2. Seiffert M, Moussay E, Paggetti J. Editorial: New Insights into the Complexity of Tumor Immunology in B-cell Malignancies: Tumor Immunology and Immunotherapy. *Front Oncol*. 2022;12:853620.
3. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(3):401-13.
4. Herndon TM, Chen SS, Saba NS, Valdez J, Emson C, Gattmaitan M, et al. Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia*. 2017;31(6):1340-7.
5. Zaaboub R, Vimeux L, Contremoulins V, Cymbalista F, Lévy V, Donnadieu E, et al. Nurselike cells sequester B cells in disorganized lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia via alternative production of CCL21. *Blood Adv*. 2022;6(16):4691-704.
6. Edelmann J, Holzmann K, Tausch E, Saunderson EA, Jebaraj BMC, Steinbrecher D, et al. Genomic alterations in high-risk chronic lymphocytic leukemia frequently affect cell cycle key regulators and NOTCH1-regulated transcription. *Haematologica*. 2020;105(5):1379-90.
7. 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.
8. Lazarian G, Guièze R, Wu CJ. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):984-93.
9. Chiorazzi N, Stevenson FK. Celebrating 20 Years of IGHV Mutation Analysis in CLL. *Hemasphere*. 2020;4(1):e334.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(6):431-8.
14. Taylor JG, Gribben JG. Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects. *Semin Cancer Biol*. 2015;34:36-45.
15. Hanna BS, Roessner PM, Yazdanparast H, Colomer D, Campo E, Kugler S, et al. Control of chronic lymphocytic leukemia development by clonally-expanded CD8. *Leukemia*. 2019;33(3):625-37.
16. 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.
17. 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.
18. Böttcher M, Baur R, Stoll A, Mackensen A, Mougiakakos D. Linking Immuno-evasion and Metabolic Reprogramming in B-Cell-Derived Lymphomas. *Front Oncol*. 2020;10:594782.

19. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* 2013;34(3):137-43.
20. Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol.* 2016;37(3):193-207.
21. Chen W. IDO: more than an enzyme. *Nat Immunol.* 2011;12(9):809-11.
22. Angioni R, Sánchez-Rodríguez R, Viola A, Molon B. TGF- β in Cancer: Metabolic Driver of the Tolerogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel).* 2021;13(3).
23. Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity.* 2018;48(1):19-33.
24. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol.* 2011;12(9):870-8.
25. Munn DH, Mellor AL. IDO and tolerance to tumors. *Trends Mol Med.* 2004;10(1):15-8.
26. Puccetti P. On watching the watchers: IDO and type I/II IFN. *Eur J Immunol.* 2007;37(4):876-9.
27. Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, et al. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(52):20828-33.
28. Burger JA. The CLL cell microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2013;792:25-45.
29. Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguillón JC, et al. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front Immunol.* 2021;12:611795.
30. Aravena O, Ferrier A, Menon M, Mauri C, Aguillón JC, Soto L, et al. TIM-1 defines a human regulatory B cell population that is altered in frequency and function in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):8.
31. Larson C, Oronsky B, Carter CA, Oronsky A, Knox SJ, Sher D, et al. TGF-beta: a master immune regulator. *Expert Opin Ther Targets.* 2020;24(5):427-38.
32. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity.* 2019;50(4):924-40.
33. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, et al. The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. *Front Immunol.* 2018;9:151.
34. Benci JL, Johnson LR, Choa R, Xu Y, Qiu J, Zhou Z, et al. Opposing Functions of Interferon Coordinate Adaptive and Innate Immune Responses to Cancer Immune Checkpoint Blockade. *Cell.* 2019;178(4):933-48.e14.
35. Qian J, Wang C, Wang B, Yang J, Wang Y, Luo F, et al. The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):290.

Figure Legends

Figure 1: CLL cells show a cytokinic and immune heterogeneous regulatory profile

(A) Frequencies of various subpopulations among PBMCs (LB, LT, LT4, LT8, NK and NKT) or among CD4⁺ T cells (Tregs, Th1, Th2) were evaluated by flow cytometry on CLL patient samples (n = 15) compared to healthy donor (n = 4). Unpaired t-test, *** P ≤ 0.00005, *** P ≤ 0.0005, ** P ≤ 0.001. **(B)** Graphic representation of cytokines (IFN γ , IL10, IL35, IL17A, IL4, IL6, IL8, TNF α and 3 different isoforms of TGF β (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) measured out by multi-ELISA-Like technology "U-Plex" (n= 15) in sera from CLL and healthy donors (n = 4), Unpaired t-test, **** P ≤ 0,0001. **(C)** Quantification of relative proportion and MFI of IFN γ production in various subpopulations of cells (LB, T4, T8, NK, NKT) were assayed by flow cytometry on CLL patients samples (n = 15) and compared to healthy donors (n = 4); Unpaired t-test, ns, not significant P ≥ 0.05, ** P ≤ 0.001, *** P ≤ 0.0005.

Figure 2: CLL cells express basal and inducible indoleamine 2,3-dioxygenase

(A) Human purified CLL B cells were lysed and total cell extracts were analyzed by immunoblotting (UPN are indicated) or ELISA immune-assay. Western blots were processed with IDO antibody; Cyclophilin was used as a loading control. HG3 cells were treated (C+) or not (C-) with IFN γ for 24 h and used as controls. **(B)** Histogram shows the concentration of indoleamine 2,3-dioxygenase in B cell lysates (blue bars) and kynurenine (red bars) in supernatant of CLL patients (UPN); both were evaluated by ELISA immunoassay (n=15) right: kynurenine quantification of a larger cohort of patients (n = 37) was compared to healthy donors (n=7). **(C)** Human CLL B cells were treated for 24 h with TGF β 1 (5 μ g/ml), LPS (5 μ g/ml), IL10 (10 μ g/ml), IL6 (40 ng/ml), TNF α (40 μ g/ml) or IFN γ (40 ng/ml). Tubulin was used as loading control (n = 3). From CLL B cells, total RNAs were extracted and IDO expression was analyzed by RT-qPCR. The housekeeping gene used was PP2A. Paired t-test, ns, not significant P ≥ 0.05, * P ≤ 0.0312

Figure 3 : IFN γ -dependent induction of IDO and PDL1

(A) Western blot analysis of a B-CLL lysate treated with 40 ng/ml IFN γ for the indicated times and denoted antibodies (n=6). **(B)** Expression of STAT1, IRF1 and IDO were assessed by RT-qPCR in CLL B cells after treatment with 40 ng/ml IFN γ for the indicated times; PP2A was used as a housekeeping gene (n=6). Paired t-test, *P \geq 0.0178, ** P \leq 0.0079 *** P \leq 0.0002. **(C)** The Tryptophan over kynurenine ratio was calculated based on ELISA quantification in culture supernatant of purified CLL-B cells stimulated with 40 ng/ml of IFN γ (n = 6) at times 0 and 48 hours. Paired t-test, **P \geq 0.0022. **(D)** Western blot analysis of a B-CLL lysate upon treatment with 40 ng/ml IFN γ for the indicated times using anti-PDL1 antibody for detection and tubulin as a loading control (n=6). **(E)** Expression of PDL1 in CLL B cells after a treatment with 40 ng/ml IFN γ for the indicating times was assessed by RT-qPCR; PP2A was used as a housekeeping gene (n=6). Paired t-test, ** P \leq 0.0079.

Figure 4 : IFN γ and TGF β 1 have antagonistic roles on IDO production by CLL B cells

(A) Dose response to IFN γ or TGF β 1 were assayed on purified CLL B cells by western blot. The indicated concentrations of IFN γ or TGF β 1 were used for 24 h stimulation; detection was performed with the indicated antibodies. Tubulin and PLC γ 2 were used as loading controls (n = 3). **(B)** Quantification of IDO expression normalized to Cyclophilin in CLL B cells stimulated for 24h in presence or not of IFN γ (0.5 ng/ml), TGF β 1 (1 ng/ml) or both (n=4). **(C)** Western blot analysis of a B-CLL lysates treated with 0.5 ng/ml IFN γ or 1 ng/ml TGF β 1 or both for 24h. Detection was performed using anti-pY⁷⁰¹ STAT1, anti-STAT1, anti-pSer^{465,468}-Smad2/ - pSer^{423,425}-Smad3, anti-Smad2/3, anti-pT^{180Y187}-P38, anti-P38, anti-IRF1, anti-IDO and anti-cyclophilin used as loading control (n=4). **(D)** Graphic representations of secreted cytokines in B cell supernatants (IFN γ , IL-10, IL-35, IL-17A, IL-4, IL-6, IL-8, TNF α) that were evaluated by multi-ELISA-Like technology "U-Plex" after stimulation with or without IFN γ , TGF β 1 or both (n= 5). Paired t-test, ** P \leq 0.0079.

Supplementary Figures

Supplementary Figure 1: CLL cells show a cytokinic and immune heterogeneous regulatory profile

(A) Gating strategy on PBMCs from a representative CLL patient indicates how LT (CD19- CD3+), LB (CD3- CD19+), CLL-B (CD3- CD19+ CD5+), T4 (CD19- CD3+ CD4+), T8 (CD19- CD3+ CD8+), Tregs (CD25+ CD127low), NK (CD56+ CD3-) and NKT (CD56+ CD3+) were identified using light scatter profile (SSC vs FSC), excluding doublet cells (FSC-H vs FSC-A) and viable staining without any stimulation. **(B)** Representative gating strategy identifying IFN γ production in different subpopulations (LB, LT8, Th1, NK and NKT) of PBMCs from CLL or healthy donors by flow cytometry.

Supplementary Figure 2: CLL cells express basal and inducible indoleamine 2,3-dioxygenase

(A) Link between IDO and Kynurenine quantities determined by ELISA in CLL patients' samples. Lines link individual patient samples. Paired t-test **** $P \geq 0.0001$. Tryptophan concentration in serum (middle) and ratio between tryptophan and Kynurenine (right) in CLL patients (n= 37) were graphed. **(B)** Dose response activity in HG3 cell line was assayed to evaluate the expression levels of phospho^{Y701} STAT1, STAT1 and IDO upon IFN γ (0 to 40 ng/ml) or TNF α (0 to 40 ng/ml) stimulations then analyzed by western blot with corresponding antibodies; PLC γ 2 was used as a loading control.

Supplementary Figure 3: IFN γ -dependent induction of IDO and PDL1

(A) Total cell extracts from CLL B cells stimulated or not with IFN γ (40 ng/ml) for 1h or 24h and then immunoprecipitated for its cognate receptor (using anti-IFN γ R1 antibody) or for its early effector (using anti-STAT1 antibody). Immunoprecipitated complexes were analyzed with anti-phospho-Y⁷⁰¹ STAT1, anti-IFN γ R1 and anti-STAT1 (n=4). **(B)** Western blots showing the subcellular localization of phosphoY⁷⁰¹-STAT1, STAT1, IRF1 and IDO; anti- β 1-integrin, anti-tubulin and anti-hRNP1 antibodies were used to assess the purity of membrane (mb), cytoplasmic (cyto) and nuclear (Nuc) fractions, respectively (n=3) **(C)** Representative dot plots showing the percentage of PD-L1⁺ CLL B cells (rectangle) upon 24 h of IFN γ stimulation (n=3) **(D)** Graphical analysis of expression levels of mRNA generated by qRT-PCR (dotted line) and protein obtained by western blot (solid line) of the various effectors phosphoY⁷⁰¹ STAT1, STAT1, IRF1, IDO and PDL1 after treatment of CLL B cells with 40 ng/ml IFN γ during the indicated time. This graph highlights the shift between RNA and protein expressions of the effectors.

Supplementary Figure 4: IFN γ and TGF β 1 have antagonistic roles on IDO production by CLL B cells

(A) Dose response to IFN γ and TGF β 1 was examined in HG3 cell line by western blot. HG3 were stimulated with the indicated concentrations of IFN γ or TGF β 1 and the expression levels of the effectors were assessed with the indicated antibodies; PLC γ 2 was used as a loading control (n = 3). **(B)** Quantification of pY⁷⁰¹-STAT1, IRF1, pS^{465.468}-Smad2/-pS^{423.425}-Smad3 and pT^{180Y187}-P38 expression normalized to the indicated proteins in CLL B cells cultured for 24 h in presence or not of IFN γ , TGF β 1 or both (n=4).

Table 1: Patient's biological and clinical parameters

UPN	Age (year)	Sex	Lymphocytosis (G/L)	Stage	IGHV status	CD38 expression
013		M	45		M	
135		F	105		UM	-
187		M	223		M	
437		F	395			
198		M	94	Progression	UM	+
198		M	128	Progression	UM	+
215		M	25	indolent	M	-
226		F	70		UM	+
256		M	99	indolent	M	-
265		M	14	indolent	M	-
285		M	74		M	-
298		M	219	Progression	UM	-
307		F	50	indolent	M	+
334		M	44	indolent	M	+
334		M	20	indolent	M	+

F = Female ; M = Male ; UM = unmutated ; M = Mutated ; ND = Not Determined

Table 2: Antibodies used in western blot and flow cytometry

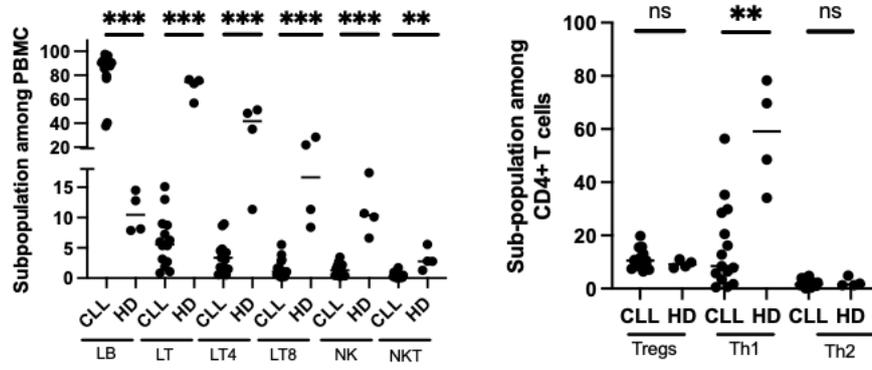
Application	Antibody name	Clone	Fluorochrome	Compagny
Western Blot	p-Smad2 (Ser465/467) / Smad3 (Ser423/425)	D27F4	None	Cell Signaling Technologies (CST)
	Smad2/3	D7G7		
	P38 MAPK	Polyclonal		
	p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Polyclonal		
	p-STAT1 (Tyr701)	58D6		
	STAT1	Polyclonal		
	PDL1	E1L3N		
	IRF-1	D5E4		
	IFNGR1	Polyclonal		
	IDO	D5J4E		
	Cyclophilin	Polyclonal		
	Tubulin	Polyclonal		
Flow Cytometry	CD3	SK7	BUV496	Becton Dickinson (BD)
	CD4	SK3	BUV480	
	CD5	L17F12	BUV615	
	CD8	RPA-T8	BUV395	
	CD16	3G8	BUV563	
	CD19	SJ25C1	BV786	
	CD25	M-1251	PECY7	
	CD56	NCAM16.2	BUV661	
	CD127	HIL-7R-M21	FITC	
	PD1	EH12.1	BV421	

	IFNGR1	GIR-94	PE	
	IL-4	8D4-8	APC	
	IFN γ	4S.B3	PECYY	
	PDL1	10F.9G2	Percp-Cy5.5	Biolegend

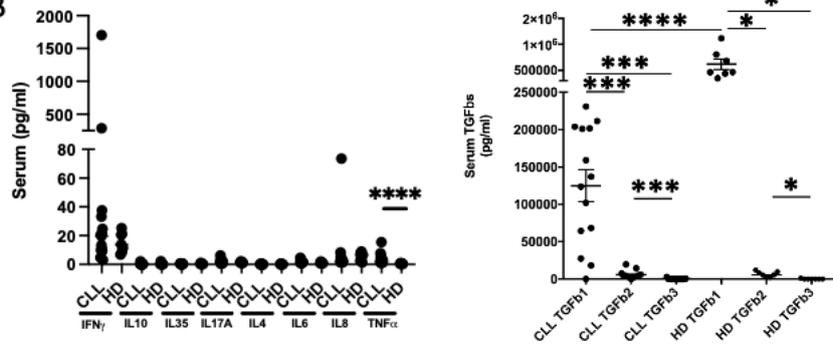
Table 3: Primers used in RT-PCR

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
IRF1	CTATGGAGACTTTAGCTGTAAGG	GCTGTAGACTCAGCCCAATAT
IDO	GGATCCTAATAAGCCCCTGAC	ACTGCAGTCTCCATCACGAAA
PDL1	GGTCATCCAGAACTACCTC	TAAGATGGCTCCCAGAATTACC
STAT1	AGATTTAATCAGGCTCAGTCGG	TACTGTCAAGCTCTTTCTGTTTGTC
PP2A	GGATCCATGGACGAGAAGGTGTTTAC	AAGCTTCAGGAAGTAGTCTGGGGTACGACG

A



B



C

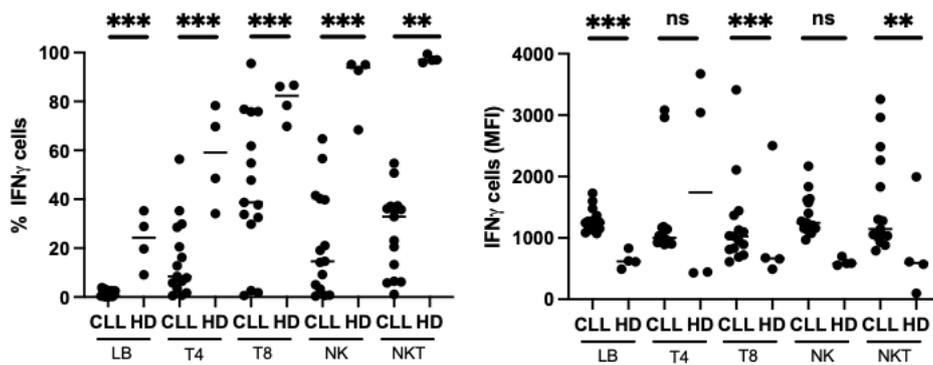


Figure 1

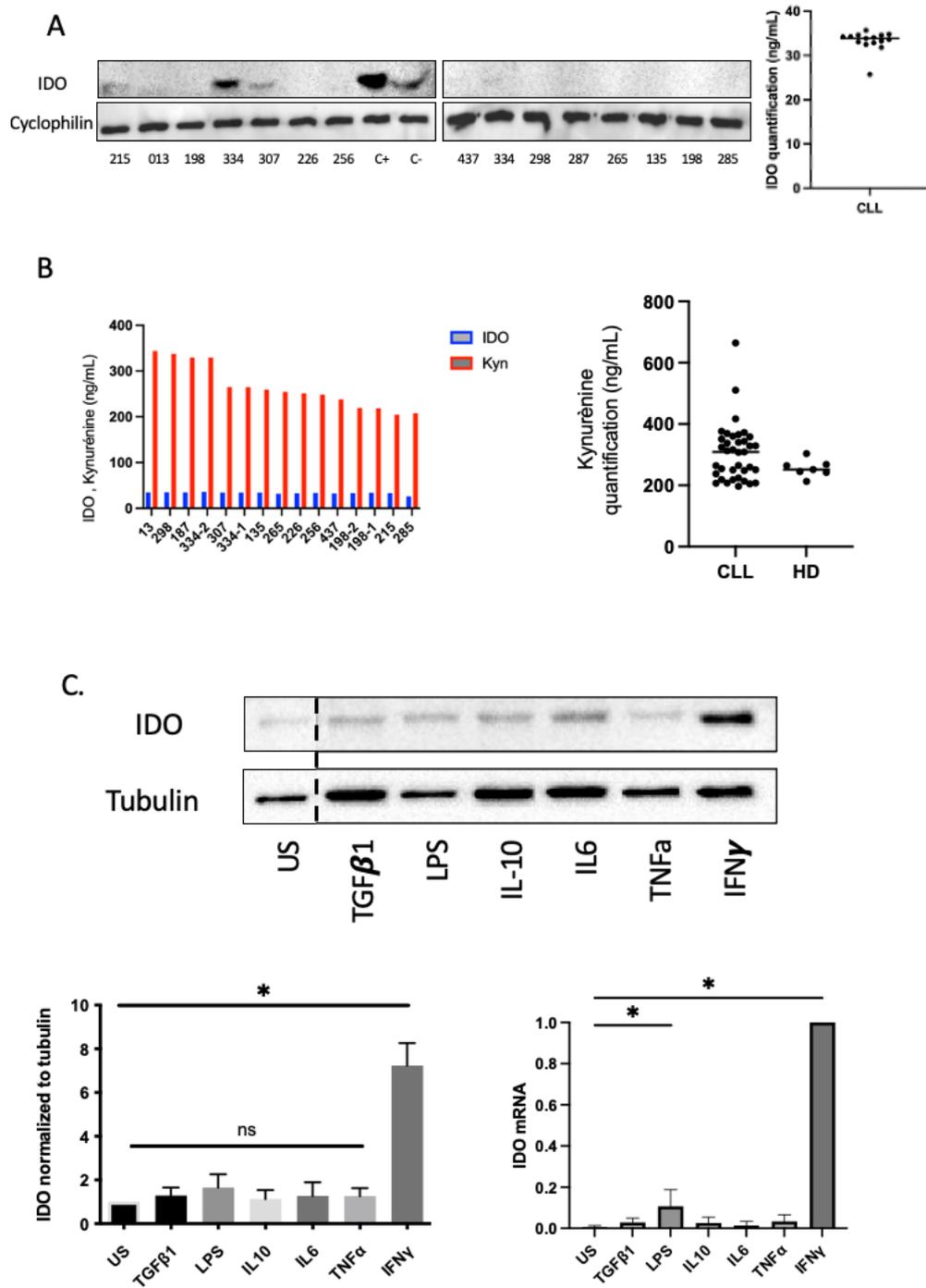


Figure 2

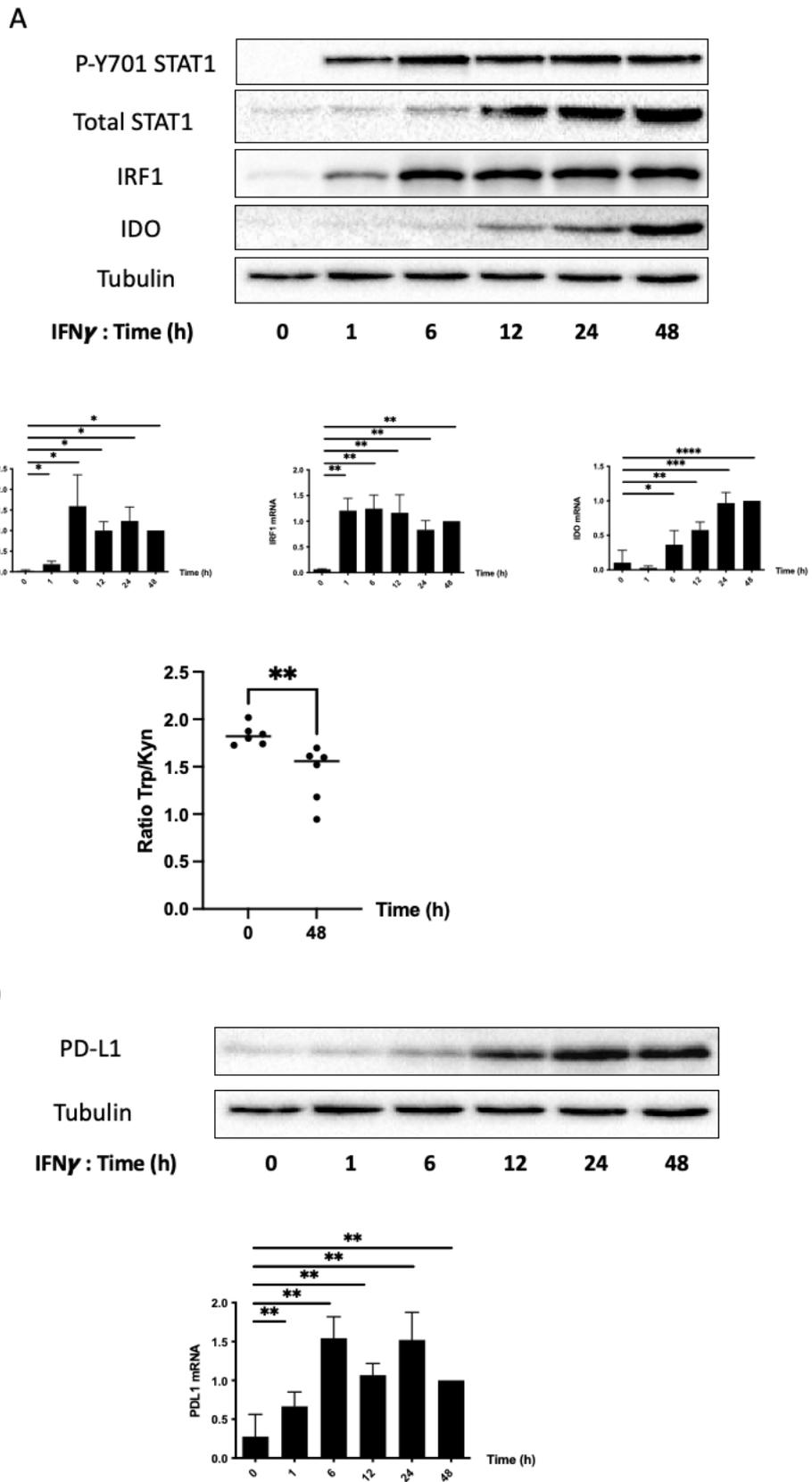


Figure 3

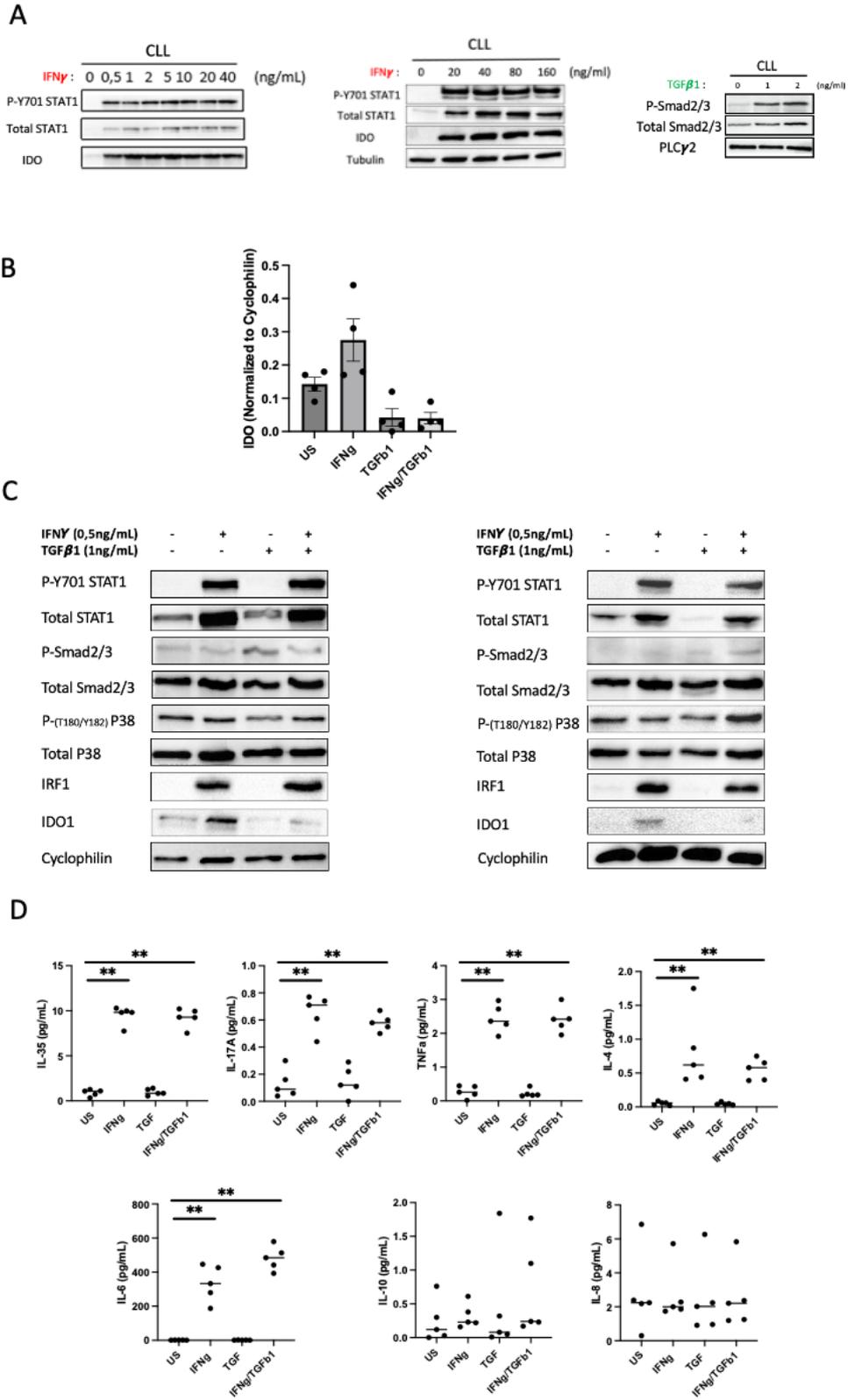


Figure 4

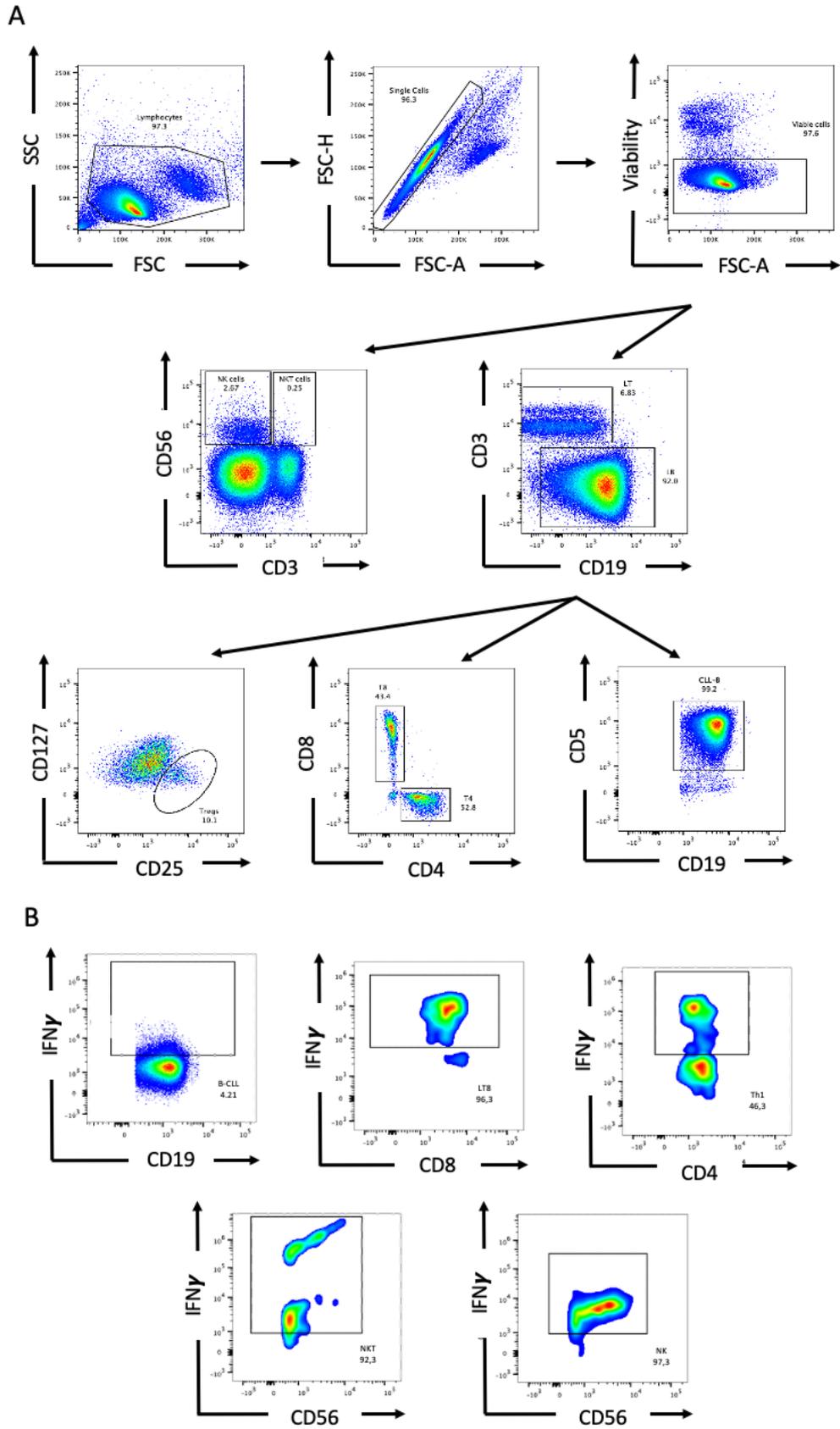


Figure S1

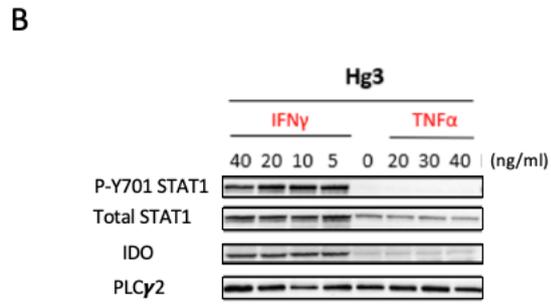
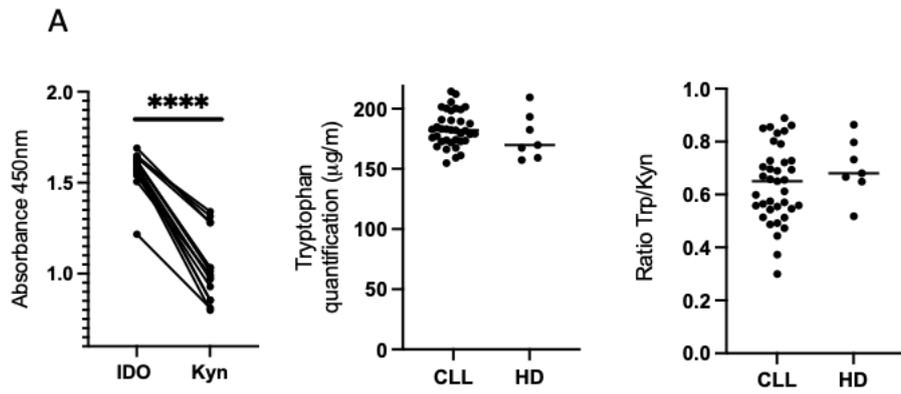


Figure S2

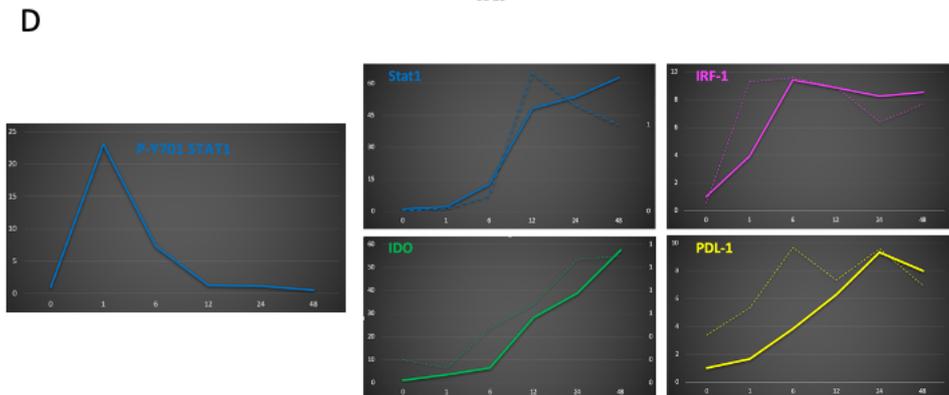
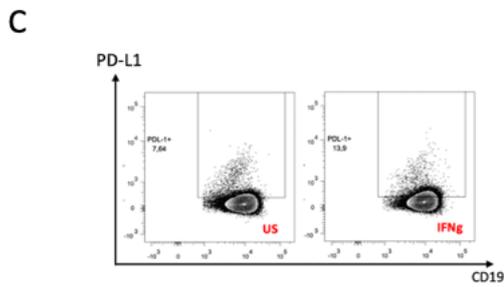
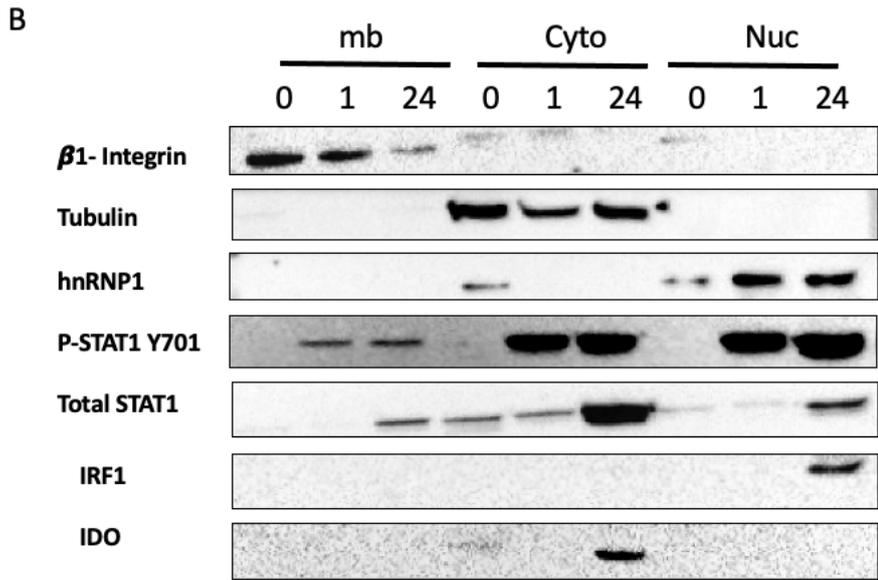
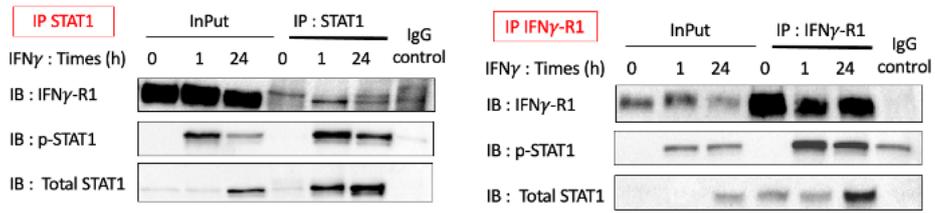
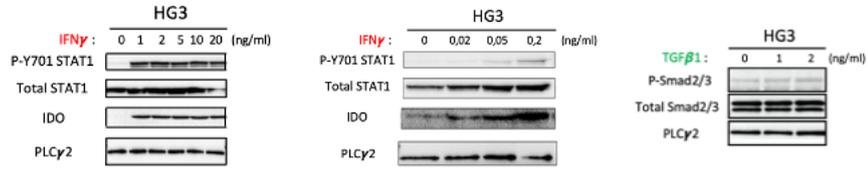


Figure S3

A



B

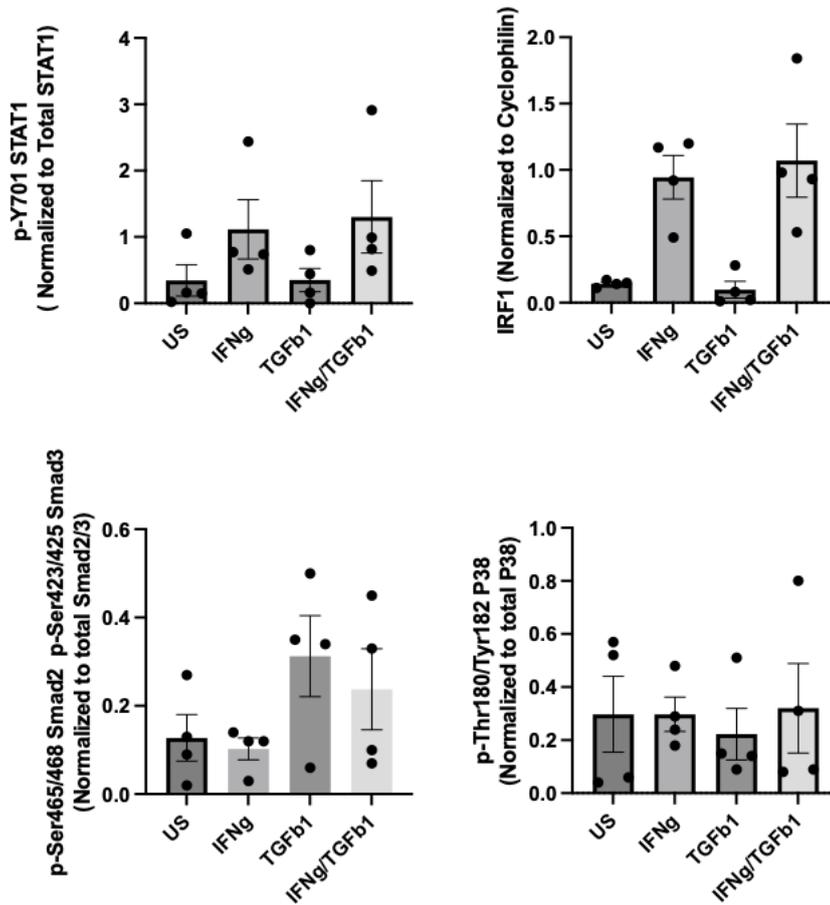


Figure 4S

DISCUSSION

I- CARACTERISATION DE B-LLC PRODUCTEURS DE FACTEURS REGULATEURS

1. Caractérisation de la capacité régulatrice des B-LLC :

La leucémie lymphoïde chronique est un syndrome lymphoprolifératif courant chez l'adulte caractérisé par l'accumulation dans la circulation sanguine et les organes lymphoïdes primaires et secondaires de lymphocytes B matures ayant une faible activité proliférative et résistants à l'apoptose. La progression de cette pathologie est la résultante d'une hétérogénéité aussi bien sur le plan clinique que moléculaire et les mécanismes sous-jacents impliqués dans son développement restent encore mal définis.

Plusieurs études décrivent l'existence d'un déficit de l'immunité anti-infectieuse et antitumorale. L'inhérente immunodéficiences de cette pathologie témoigne d'un processus d'immunosélection du clone leucémique à l'origine d'une part d'un défaut de la reconnaissance antitumorale et d'autre part de l'installation d'une tolérance immunitaire vis-à-vis des cellules B-LLC au cours de la dernière étape de l'immunoediting (l'immunosubversion) où les cellules tumorales réussissent à échapper au contrôle du système immunitaire (Forconi and Moss, 2015a). En effet, il est maintenant clairement établi qu'une population spécifique de lymphocytes B dite Breg participe au contrôle de la réponse immunitaire et est responsable des mécanismes immunosuppresseurs. Ces cellules partagent avec les B-LLC plusieurs caractéristiques retrouvées communément dans la littérature, ainsi, leurs caractérisations phénotypique et fonctionnelle sont toujours débattues. L'une des premières principales populations décrites chez la souris et chez l'homme est la population « B10 » sécrétrice d'IL-10 facilement identifiée par sa capacité à exprimer de l'IL-10 cytoplasmique suite à une stimulation *in vitro* pendant 5 heures. Ces cellules qui représentent moins de 1% des lymphocytes sanguins étaient capables de réguler la production des cytokines des autres cellules immunitaires démontrant ainsi un lien fonctionnel direct parmi les cellules Bregs (Iwata, 2010). Cette capacité à produire de l'IL-10 a aussi été caractérisée dans d'autres populations de LB matures tels que les plasmablastes ou les br1 dans un contexte de maladies auto-immunes inflammatoires (van de Veen et al., 2013) (Matsumoto et al., 2014). Malgré l'absence à ce jour de consensus qui permet de définir objectivement un lymphocyte B régulateur, plusieurs travaux rapportent que l'IL-10 n'est pas la seule cytokine immunorégulatrice et que d'autres facteurs tels que le TGF β 1, IL-35, Granzyme B ou encore une enzyme métabolique IDO1 participent à l'immunomodulation. D'un point de vue fonctionnel, l'immunorégulation dans la LLC se traduit par une inhibition de l'activité cytokinique des lymphocytes T.CD4+ et cytotoxique des T.CD8+ associées à des taux plus élevés de Tregs favorisant un terrain propice à la croissance tumorale des B-LLC (Nicholas et al., 2016)

Une des thématiques du laboratoire s'intéresse à la caractérisation des facteurs régulateurs. Un travail antérieur a mis en évidence des sous-populations de B-LLC producteurs des cytokines IL-10 et TGFb1 et du facteur de transcription FOXP3. Dans la continuité de ce projet, le premier objectif de ma thèse était d'évaluer la capacité régulatrice de ces B-LLC sur un ensemble de cellules de l'immunité, puis de caractériser *in fine* le rôle de chacun des facteurs solubles produits par une approche qui consiste à utiliser des anticorps bloquants. Le second objectif était de valider la corrélation entre la production de ces 3 facteurs régulateurs et la progression de la maladie.

Pour déterminer la capacité des cellules B-LLC à moduler les autres populations immunitaires, des cultures de 48h de PMBC ont été réalisées. De façon attendue une modification de l'évolution de certains types cellulaires a été constatée. Tout d'abord, nous avons remarqué qu'au cours de la culture cellulaire le taux de monocytes diminuait de façon significative, et qu'au sein même de ces populations il y avait une diminution homogène des 3 catégories de ces cellules à savoir les monocytes non classiques, les monocytes intermédiaires et les monocytes classiques (aussi appelés « patrouilleurs » notamment dans les modèles murins). Dans d'autres travaux, l'équipe de Tedder avait plutôt évalué la capacité des cellules B10 humaines CD24^{hi} CD27⁺ activées à réguler la production de TNF α par des monocytes mis en culture, et remarquablement cette production était significativement réduite (Iwata et al., 2011), Cet effet inhibiteur de l'IL-10 des cellules B10 sur la production du TNF α monocyttaire est perdue dans un modèle pathologique de vascularite systémique aigue (Maladie de Kawasaki) et pour la première fois l'expression réduite de l'IL-10 est expliquée par une régulation à la hausse du miR-27a pendant la phase aiguë de la maladie (Luo et al., 2020).

Dans la culture réalisée de 48h, les monocytes n'étaient pas le seul type cellulaire à être régulé, nous avons aussi constaté une modification dans le compartiment des lymphocytes T, pour davantage caractériser la capacité régulatrice des B-LLC sur les LT, on a réalisé *in vitro* des cocultures autologues après purification de cellules leucémiques et de LT.CD4⁺. En accord avec les données de la littérature relatives à la LLC, nous avons constaté une augmentation significative du pourcentage de LT.CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} régulateurs exprimant FOXP-3. Cependant le rôle régulateur des Tregs diffère en fonction des pathologies, dans le cas des cancers, alors que les CD4⁺25⁺FOXP3⁺ infiltrant les lymphomes folliculaires, le LDGCB ou encore le lymphome de Hodgkin classique contribuent à l'amélioration des résultats pour les patients en supprimant la prolifération des lymphocytes B (Grygorowicz et al., 2016), dans la LLC, l'augmentation de la proportion des Tregs est liée à la progression et à un mauvais pronostic (Beyer et al., 2005). C'est ainsi que le mécanisme immunopathogénique sous-jacent qui permet aux Tregs de maintenir un potentiel suppressif des lymphocytes T effecteurs tout en gardant une capacité de prolifération et de survie des B-LLC reste actuellement inconnu. Enfin, nous avons aussi constaté au cours de la coculture une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF α par les lymphocytes T CD4⁺, et cet effet était plus

ou moins accentué en fonction des rapports quantitatifs croissants de cellules B renforçant ainsi la notion du rôle de l'accumulation leucémique des B-LLC dans la suppression active et la progression de la maladie.

2. Phénotype et facteurs régulateurs des B-LLC

Ces observations témoignent de la capacité régulatrice des B-LLC. Après plusieurs décennies de focalisation sur l'IL-10 comme le principal immunosuppresseur, l'identification de nouveaux facteurs régulateurs a suscité plus de questions encore qu'elle ne permet d'apporter de réponses, parmi ces facteurs le TGF β est une cytokine aux effets pléiotropiques décrite précédemment dans la LLC comme un important régulateur négatif des lymphocytes par inhibition de la prolifération des clones leucémiques mais pas chez tous les patients (Romano et al., 2008). En effet, des travaux antérieurs ont montré que dans les cellules pré-cancéreuses, le TGF β agit comme suppresseur de tumeur en modulant directement les oncogènes (Romano et al., 2008). Cependant, dans des stades avancés de la tumeur, les cellules utilisent le TGF β à leur avantage pour produire des facteurs de croissance et initier un phénotype invasif disséminatoire (Douglas et al., 1997). Partant de ces constatations nous avons évalué sur une cohorte de 28 patients l'expression de l'IL-10 et du TGF β 1 par les cellules CD5⁺CD19⁺, il ressort une hétérogénéité de l'expression transcriptionnelle et protéique de ces 2 facteurs révélée par les techniques de RNA-Flow et de cytométrie en flux, nous avons mis en évidence la présence de divers sous-ensembles de cellules B exprimant soit une seule de ces cytokines ou les deux à la fois, ces découvertes renforcent la notion des fonctions hétérogènes de l'expansion clonale des B-LLC et corroborent les données de la littérature relatives à l'expression de ces facteurs par des sous-populations de B régulateurs (Kessel et al., 2012). Différents signaux extra-cellulaires permettent aux B régulateurs d'augmenter l'expression de l'IL-10 par les B-LLC, nous pouvons citer l'exemple du CpG par l'intermédiaire des TLR-9 (Drennan et al., 2017) ou BAFF par l'intermédiaire de TACI (Saulep-Easton et al., 2016), tous deux étaient capables d'induire l'augmentation de la production d'IL-10. D'un autre coté des travaux antérieurs du laboratoire avaient montré que la stimulation antigénique du BCR était corrélée avec la progression de la maladie (Le Roy et al., 2012). Ces deux constatations nous ont amené à mimer l'interaction LB-LT en utilisant un anti-IgM + CD40L pour étudier la capacité des cellules B-LLC à produire les deux cytokines IL-10 et TGF β 1. On obtient alors des mécanismes de régulation différentiels avec une expression constitutive de l'IL-10 et inductible pour le TGF β 1 après stimulation du BCR et du CD40. L'absence d'augmentation de l'IL-10 après stimulation du BCR ne remet pas en question le rôle du BCR dans la production de l'IL-10, cette production constitutive d'IL-10 a été observée dans un modèle murin de LLC (E μ -TCL1), néanmoins les mêmes travaux de ce groupe avait montré que l'inhibition spécifique d'une protéine en aval du BCR entraînait une réduction de la production de l'IL-10 mettant en exergue l'importance de la signalisation BCR dans la production constitutive de l'IL-10 (Alhakeem et al., 2015). Quant au TGF β 1 nous montrons pour la

première fois qu'une stimulation du BCR associée à un signal CD40L permet sa régulation vers la hausse dans les cellules leucémiques, cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore inconnus.

Puisque les lymphocytes B régulateurs jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire, plusieurs travaux ont cherché à les caractériser, sans jamais réussir à trouver un consensus clair à leur égard comme c'est le cas pour FOXP3 dans les Tregs. Parmi les immunophénotypes les plus décrits chez l'homme nous retrouvons les CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ ; CD19⁺24^{hi}38⁺ ; CD19⁺CD25⁺ (Blair et al., 2010)(Iwata et al., 2011). Afin de déterminer une signature phénotypique pour les sous-populations de B-LLC producteurs d'IL-10 et de TGFβ1, nous avons évalué par une approche de cytométrie en flux l'expression différentielle des marqueurs de surface décrits précédemment. Cette analyse a permis de discriminer des cellules présentant de manière significative des niveaux d'expression plus élevés en CD5⁺ CD19⁺ et CD27⁺ dans les populations IL-10⁺ et TGFβ1⁺, nos résultats se rapprochent d'une étude très récente qui a mis en évidence une population de Bregs dites tBreg (tumor evoked Breg) producteurs d'IL-10⁺ et de TGFβ avec un phénotype CD19⁺CD81⁺CD27⁺CD25⁺PD-L1^{hi} (Premkumar and Shankar, 2021). Dans des travaux parallèles aux nôtres Manna et al. ont caractérisé un phénotype plutôt CD5⁺CD19⁺CD38⁺ de Bregs producteurs d'IL-10/TGFβ (Manna et al., 2020). L'ensemble de ces données témoigne encore une fois de l'hétérogénéité de la pathologie qui dépend de plusieurs critères tel que l'état d'induction des cellules ou leur activation par les cellules du microenvironnement tumoral. Des études antérieures à la nôtre avaient montré la capacité des B-LLC à exprimer le Granzyme B après stimulation par l'IL-21, pouvant induire la mort cellulaire et l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ (Hagn et al, 2014), de même une autre équipe avait défini les iBregs comme étant des cellules productrices d'IDO et induites par des LT exprimant le CTLA-4 à leur surface (Nouël et al., 2015), ces dernières via l'enzyme IDO joueraient un rôle crucial dans le métabolisme énergétique à travers la synthèse de la coenzyme NAD⁺, en effet les cellules cancéreuses ont de grands besoins énergétiques pour assurer leur croissance et assurer pleinement leur potentiel invasif (Demarest et al., 2019). D'autres groupes ont identifié des populations de Bregs producteurs d'autres immunorégulateurs comme les Breg CD5⁺CD19⁺FOXP3 (Berthelot et al., 2012) ou encore les i35-Bregs producteurs de IL35 (Egwuagu and Yu, 2015), cependant aucun rôle fonctionnel n'a été attribué à ces populations dans la LLC. Dans ce contexte de plus en plus complexe, la question de l'appartenance ou non de ces facteurs à une seule et même sous-population de Bregs reste encore à évaluer.

II- Impact fonctionnel du TGFβ et IL-10 sur le compartiment T

Pour clarifier le rôle de l'IL-10 et du TGFβ1 sur le compartiment des LT, nous avons mis en culture pour 48h des PBMC de patients LLC en utilisant cette fois-ci des inhibiteurs spécifiques. Alors que le blocage du récepteur du TGFβ1 confirmé par une inhibition de la phosphorylation du p-Smad2 (S465/467) a montré une diminution significative de la population T régulatrice, le blocage de la cytokine IL-10 confirmé par une inhibition de la phosphorylation de p-Stat3

(Y705) a quant à lui modulé la balance Th1/Th2 en faveur des Th2 producteurs d'IL-4. Il est connu que les cellules B sont associées à un profond défaut de fonctionnement des cellules T dans la LLC, des études préliminaires avaient montré un état d'épuisement des cellules T dû à une stimulation chronique par des auto-antigènes de faible affinité. Cet état dysfonctionnel acquis se matérialise par une expression accrue de récepteurs inhibiteurs dont le PD1, CD244, Tim-3 altérant ainsi la fonctionnalité de la synapse immunologique avec les CPA (Riches et al., 2013). De plus les lymphocytes T.CD8 présentent des défauts fonctionnels de cytotoxicité ; en effet ces cellules conservent la capacité de relarguer des granules mais avec une altération du trafic vésiculaire (Görgün et al., 2005). De leur côté, les Tregs peuvent atténuer les réponses antitumorales des lymphocytes T CD4 et CD8 et favoriser la croissance des clones B néoplasiques (Facciabene et al., 2012). Une étude ultérieure avait révélé qu'en plus de l'augmentation des taux de Tregs dans la LLC, ces derniers étaient fonctionnellement actifs démontrant une activité inhibitrice similaire à celle des témoins sains avec une augmentation significative de la fréquence des protéines CTLA4, FOXP3, GITR, CD62L, TGFβ1 et IL-10 (Beyer et al., 2005) ; L'importance de ces Tregs a été soulignée dans une étude dans laquelle une corrélation significative était faite entre le taux de Tregs et la progression de la maladie, faisant alors de ces cellules un potentiel facteur pronostique (Chihara et al., 2018). Nos résultats mettent en avant le rôle critique du TGFβ dans le développement et la maintenance des population Tregs sans affecter le compartiment des T effecteurs dont le rôle est attribué à l'IL-10, mais il est important de considérer que les mécanismes immunomodulateurs sont divers et variés et ne dépendent pas seulement de ces deux cytokines secrétées par les B-LLC, c'est ce dont témoigne une étude récente qui démontre que l'augmentation significative de la Galectine-9 chez les patients LLC active la voie de Tim-3⁺ Treg pour supprimer la fonction effectrice Th1 probablement par un mécanisme IL-10 dépendant car le blocage de la voie Tim-3/Galectine-9 *in vitro* a montré une diminution significative de l'IL-10 dans le surnageant de culture avec des niveaux d'IFNγ et TNFα augmentés (Pang et al., 2021). Une toute autre étude a également montré que l'utilisation de l'ibrutinib pourrait inverser la polarisation dominante des Th2 en ciblant la Kinase inducible par l'IL-2 (ITK) associée à la signalisation TCR restaurant ainsi une surveillance immunitaire de l'hôte qui pourrait avoir un impact positif sur son pronostic vital (Puzzolo et al., 2021).

III- Caractérisation d'autres facteurs immuno-régulateurs

1. Expression de FOXP3 :

Suivant le postulat selon lequel les Tregs sont définis comme régulateurs par l'expression de FOXP3, nous avons recherché si ces caractéristiques phénotypiques et de production pouvaient être retrouvées sur les cellules Bregs :

- L'expression des marqueurs phénotypiques de surface tel que le CD5 a été identifiée sur des populations de Bregs régulant des réponses allergiques (Noh et al., 2012)

- Le CD25, chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 est un marqueur clé de plusieurs types de Tregs. En effet le CD25 ayant une chaîne cytoplasmique très courte ne participe pas à la transduction du signal intracellulaire comme ses homologues CD122 (chaîne β) et CD132 (chaîne γ), cependant, il joue un rôle crucial dans l'augmentation de l'affinité de l'IL-2 pour son récepteur, ainsi les Tregs en compétition avec les T effecteurs les empêchent de poursuivre leur processus prolifératif, mais les privent également d'une cytokine vitale (Pandiyani et al., 2007). Le CD25 a été retrouvé exprimé par des B régulateurs chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (Vadasz et al., 2015b)
- Les iTregs sont des Tregs induits en périphérie à partir des LT conventionnels naïfs par un environnement cytokinique particulier et ils expriment deux cytokines immunosuppressives l'IL-10 et le TGF β 1 (Schmitt and Williams, 2013) retrouvées également dans les populations B10 et iBregs respectivement (Iwata et al., 2011) (Nouël et al., 2015a)

Compte-tenu de la similitude des marqueurs cités entre les Tregs et les Bregs, nous avons émis l'hypothèse d'une expression de FOXP3 par les cellules B. Pour la première fois nous démontrons à la fois l'expression transcriptionnelle et protéique de FOXP3 dans les cellules B de LLC. Pour le démontrer, nous avons purifié des LB afin d'exclure toute possibilité de contamination par des Tregs ou autres populations immunitaires et avons utilisé comme contrôle positif de l'expression de FOXP3 des LT.CD4⁺. À ce stade de nos travaux, les données ont montré que l'expression de FOXP3 est constitutive et hétérogène entre patients, son potentiel rôle régulateur comme pour les Tregs ou son implication dans la progression de la maladie restent incertains à ce jour. Quelques expériences préliminaires soutiennent l'idée qu'il pourrait jouer un rôle régulateur par exemple en s'associant avec STAT3 pour la régulation de l'IL-10. Nos résultats montrent que STAT3 est constitutivement phosphorylé sur la Ser727 (Hossain et al., 2013). Une autre étude a montré que les cellules T CD5^{hi} cultivées dans des conditions de différenciation des Tregs étaient seules capables d'exprimer FOXP3 contrairement aux cellules T CD5^{low} ou CD5^{-/-} (Henderson et al., 2015), dans notre modèle pathologique les B-LLC sont en moyenne à 98% CD5⁺ ce qui ajoute un élément supplémentaire de similitude à rechercher, rapprochant les cellules de LLC des cellules B1 murines régulatrices.

L'évaluation multidimensionnelle de plusieurs facteurs produits par une seule cellule est un challenge assez complexe, c'est pour cette raison qu'une analyse des propriétés fonctionnelles combinatoires dans un indice polyfonctionnel représente une alternative très intéressante pour appréhender les résultats d'un ensemble de données sélectionnées et rendre leur lecture la plus simple possible. Dans cette perspective, nous avons intégré simultanément les facteurs régulateurs IL-10, TGF β 1 et le facteur de transcription FOXP3 exprimés de façon hétérogène par les BLLC dans un indice polyfonctionnel afin de mieux stratifier les patients en fonction de leur progression. Les résultats obtenus sur 2 cohortes de patients témoignent d'une caractérisation différentielle de 2 clusters permettant de discriminer deux profils ; les patients avec un score bas correspondants aux faibles secréteurs

ont une progression lente alors que le cluster de patients avec un score élevé présente un risque de progression plus important.

2. Profil altéré de la réponse antitumorale dans la LLC

L'analyse du profil immunitaire à partir de PBMCs de patients atteints de LLC comparé à des donneurs sains nous a permis de confirmer ce qui a déjà été rapporté précédemment dans d'autres études, à savoir une hyperlymphocytose de type B correspondant à la prolifération incontrôlée et anarchique de lymphocytes B. En parallèle, il convient de noter une forte perturbation des cellules immunitaires responsables de la reconnaissance antitumorale, en effet, d'abord au sein du compartiment des cellules tueuses nous constatons une diminution significative des cellules NK et NKT, puis au sein du compartiment des lymphocytes T de la même façon une diminution significative des LT CD4 et LT CD8 est rapportée. Des perturbations supplémentaires des sous-ensembles de cellules T.CD4+ sont par ailleurs retrouvées et concernent notamment la balance Effecteurs vs régulateurs T. Les cellules Th1 aidant à garder les cellules malignes sous contrôle par production de diverses cytokines sont significativement réduites, tandis que les Th2 qui protègent les cellules malignes en interférant avec les cellules T cytotoxiques tendent à être augmentées dans ce modèle (Dubovsky et al., 2013). Enfin, nous retrouvons en accord avec la littérature que chez la plupart des patients les proportions de cellules Tregs sont inversement proportionnelles aux autres acteurs de la réponse antitumorale ce qui montre l'impact négatif fourni par les B-LLC sur l'immunité antitumorale (D'Arena et al., 2011). Par la suite nous avons analysé le niveau des cytokines issues du sérum de la même cohorte de patients et comparé à celui de donneurs sains. Il ressort de façon intéressante une hétérogénéité des niveaux d'IFN γ et à des taux remarquablement plus élevés que les autres cytokines IL-10, IL-35, IL-17A, IL-4, IL-6, IL-8, TNF α . Au contraire dans la famille du TGF β , les taux de TGF β 1 sont significativement plus forts chez les donneurs sains comparés aux patients, alors que le TGF β 2 et TGF β 3 restent relativement bas et non significativement différents.

L'IFN γ est l'une des principales cytokines produites et secrétées par les cellules responsables de la réponse antitumorale, cette cytokine de la famille des interférons est connue pour jouer un rôle essentiel dans l'orchestration des réponses immunitaires innées et adaptatives. Via la production de l'IFN γ , les cellules contribuent au contrôle de la croissance tumorale par des mécanismes tels que la modification des répertoires d'épitopes et une régulation à la hausse du CMHI à la surface des APC et des cellules tumorales (Shankaran et al., 2001) , via la transcription médiée par l'IL-6 et STAT3 (Portier et al., 1993) , mais aussi par des mécanismes non immuns en médiant l'angiostase (Deng et al., 2014)(Coughlin et al.). Nos données montrent que l'IFN γ présente un profil plus hétérogène et plus important chez une partie des patients. Ainsi, nous avons analysé par cytométrie en flux la production d'IFN γ par ces différentes sous-populations cellulaires. Les résultats indiquent que comparée aux donneurs

sains, une proportion significativement plus faible de cellules B, T4, T8, NK et NKT sont IFN γ + néanmoins l'analyse de l'intensité de production de cette cytokine à travers l'intensité de la moyenne de fluorescence montre que les LB, T8 et les NKT sont significativement plus producteurs d'IFN γ que leurs homologues normaux.

Malgré une plus forte intensité de production d'IFN γ par les médiateurs de la réponse antitumorale, ceci ne suffit pas aux cellules pour exercer pleinement leurs fonctions, en effet un dysfonctionnement des synapses a été identifié dans les LT au contact des B-LLC induisant l'anergie des cellules T. De plus les LT PD1+ sont augmentés chez les patients progressifs et présentent un état dit de pseudo-épuisement car associés à une exposition chronique à des antigènes du soi de faible affinité. (Riches et al., 2013). De même, les cellules NK malgré des taux d'IFN γ augmentés, présentent un dysfonctionnement majeur dans la libération des molécules cytolytiques et une régulation à la baisse de leurs récepteur activateurs NKG2D dans la LLC (Parry et al., 2016).

3. Expression constitutive et inductible d'IDO

Considérer l'IFN γ comme une molécule purement pro-inflammatoire conduirait à une mauvaise interprétation, car de nombreux rapports ont indiqué que IFN γ a des rôles anti-inflammatoires et tolérogènes dans certains contextes, l'exemple typique illustrant cette propriété est l'induction de l'expression de IDO dans les cellules tumorales par l'IFN γ . À ce titre, nous avons dans un premier temps voulu savoir si les cellules B-LLC pouvait exprimer cette enzyme immunomodulatrice, pour cela nous avons analysé sur une cohorte de 15 patients les extraits protéiques des lymphocytes B par la technique de western blot et d'ELISA, les résultats indiquent une plus forte sensibilité de détection par ELISA où l'on retrouve une expression basale chez tous les patients contrairement à la technique de WB qui semble moins sensible à la fois chez les patients et sur la lignée cellulaire HG3. L'expression basale d'IDO a aussi été retrouvée dans les cellules malignes de la leucémie myéloïde aigüe (LAM) (Corm et al., 2009). Par ailleurs, IDO est une enzyme qui contribue à la tumorigénèse par un mécanisme de dégradation du tryptophane en kynurénine immunosuppressive, l'analyse de ces métabolites dans le sérum des patients et leur comparaison avec des sérums de donneurs sains nous a permis de différencier 2 groupes d'échantillons en fonction de la kynurénine produite, ce résultat a été confirmé sur un nombre plus grand d'échantillons et les niveaux les plus élevés de kynurénine sont corrélés à ceux de l'enzyme. Les taux de tryptophane quant à eux ne sont pas différentiels entre patients et donneurs sains. Il a été démontré que les cellules B-LLC avaient des effets immunosupresseurs sur les LT et LB normaux par contact direct cellule à cellule ou via des facteurs solubles dérivés des cellules qui constituent le microenvironnement tumoral (Forconi and Moss, 2015b), à ce titre pour mimer ce microenvironnement nous avons testé un certain nombre de cytokines sur l'expression d'IDO par les lymphocytes B-LLC purifiés, à la fois par la technique de RT-qPCR et par Western blot. L'exposition à l'IFN γ a montré l'effet le plus prononcé sur l'induction d'IDO, les autres

cytokines dont TGF β 1, IL-10, IL-6, TNF α ou LPS, n'ont montré qu'un léger effet sur son expression.

4. IFN γ induit la production d'IDO métaboliquement actif

Nos résultats montrent la capacité spécifique de l'IFN γ à induire l'expression d'IDO. Cette cytokine utilise un mécanisme d'action en plusieurs étapes qui a été décrit dans plusieurs types cellulaires, (Majoros et al., 2016) mais jamais dans les lymphocytes B de LLC. Ainsi, nous avons suivi les médiateurs de la cascade de signalisation de l'IFN γ . Pour ce faire nous avons stimulé des lymphocytes B-LLC purifiés avec la dose de 40ng/ml d'IFN γ couramment décrite dans la littérature. Les voies de signalisation en aval du récepteur comportent l'activation du couple de protéines JAK-STAT (Darnell et al., 1994). JAK1 et JAK2 liés respectivement de manière constitutive à IFNGR1, IFNGR2 s'activent par auto et transphosphorylation lorsque les récepteurs sont suffisamment rapprochés afin de fournir des sites d'encrage pour STAT1 (Alspach et al., 2019). Nos expériences de co-immunoprécipitation de STAT1 ou d'IFNGR1 confirment que STAT1 est bien recruté à l'IFNGR1 et ce, dès la première heure de stimulation. En effet, l'IFN γ aussitôt capté par l'extrémité N-terminale du domaine extra-cellulaire de IFNGR1, amorce la cascade signalétique, plusieurs travaux dont ceux de Fan montrent que STAT1 est phosphorylé dès les premières minutes (Fan et al.). Nous envisageons de réaliser dans le futur des expériences avec des temps plus courts pour s'assurer que dans notre modèle cellulaire, on retrouve également une phosphorylation de STAT1 dès les premières minutes. Bien que nos expériences avec le TGF β 1 indiquent plutôt un mécanisme d'inhibition plus tardif il serait intéressant d'appréhender aussi la régulation inhibitrice précoce. La phosphorylation de STAT1 sur la Tyrosine 701 est un préalable nécessaire pour sa dimérisation (Shuai et al., 1994) puis de son transfert vers le noyau. Pour une activation optimale, une phosphorylation sur Ser727 doit également avoir lieu, son importance a été démontrée sur un modèle de souris portant la mutation de la Ser727 en Alanine de STAT1 et qui a montré une mortalité accrue après une infection par *Listeria monocytogenes* (Varinou et al.). Nos résultats de fractionnement sub-cellulaire indiquent que STAT1 aussitôt phosphorylé sur le résidu tyrosine 701 transloque dans le noyau pour se fixer sur ses éléments de réponses situés dans l'ADN génomique de la cellule, nos expériences de CHIP en cours nous permettront prochainement de définir les séquences consensus spécifiques à la fixation de STAT1 dans les B-LLC. Dans la littérature on retrouve les séquences GAS et ISRE, qui, en interagissant avec le domaine N-terminal de STAT1 assurent la stabilisation du complexe et l'augmentation de l'expression des gènes cibles (Lawrence and Kornbluth, 2016). Parmi les gènes cibles de STAT1 on retrouve GBP1 (Guanylate Binding Protein 1), TAP1 (Transporter 1, ATP binding Cassette Subfamily B member), CXCL10, IRF1 (Kovarik, 2001). Ce dernier est particulièrement intéressant dans la voie de signalisation de IDO car c'est le facteur de transcription qui induit la transcription directe de cette enzyme contrairement aux autres membres de sa famille tel que IRF8 qui ne se lie pas directement à ISRE, mais nécessite de former des hétérodimères avec IRF1 (Savitsky et al., 2010). L'étude cinétique de la voie de signalisation d'IDO à la fois

transcriptionnelle (par qRT-PCR) et protéique (par WB) nous a permis de définir 2 vagues d'activation protéique, une première vague précoce qui induit des transcrits et des protéines qui sont détectables dès les premières heures de stimulation à l'IFN γ , puis une seconde vague plus tardive car nécessitant une synthèse *de novo* de facteurs de transcription issus de la première vague.

Les expériences de fractionnement nous ont permis de rapporter que IDO avait une localisation strictement cytoplasmique, cette constatation n'est pas gage de fonction de cette enzyme, en effet, certaines études ont montré une certaine divergence entre l'expression d'IDO et son activité enzymatique (Grohmann et al., 2003). Pour s'assurer des pleines fonctions d'IDO dans notre modèle tumoral, nous avons évalué son activité enzymatique en mesurant le ratio Trp/Kyn après une stimulation de 48h à l'IFN γ de B-LLC purifiés. Les résultats de cette expérience ont montré que les B-LLC produisant cette enzyme sont capables de dégrader le tryptophane et de métaboliser de la kynurénine. L'équipe de Lapointe qui a évalué l'activité métabolique de IDO sur des lymphocytes B pendant 24h n'avait pas observé de consommation de Trp ni de production de Kyn. (Godin-Ethier et al., 2011). Notre étude temporelle de l'induction d'IDO pourrait peut-être expliquer cette divergence, en effet, si on admet le fait que ces Lymphocytes B induisent IDO de la même façon que nos lymphocytes tumoraux, il faudrait attendre environ 24h pour obtenir une expression suffisante d'IDO capable d'amorcer sa fonction métabolique, or leurs expériences étaient courtes et ne duraient que 24h, ce qui peut suggérer que l'enzyme n'a pas eu assez de temps pour induire son activité métabolique soulignant ainsi l'intérêt de caractériser la signalisation IDO pour chaque type cellulaire.

L'interféron gamma en plus d'induire IDO est aussi connu pour être un puissant inducteur de PD-L1, une autre molécule membranaire immunosuppressive de la reconnaissance lymphocytaire T (Mimura et al., 2018), nos résultats indiquent que PD-L1 est induit lors de la seconde vague d'activation de la voie de l'IFN γ . Dans le mélanome, l'expression d'IDO et de PD-L1 dans les ganglions sentinelles a un impact négatif sur le pronostic, la combinaison de ces molécules représente des cibles thérapeutiques intéressantes, leur utilisation a démontré une efficacité prometteuse dans les essais de seconde phase du mélanome (Hamid et al., 2017).

IV- Régulation croisée et impact de la balance IFN γ / TGF β 1

IFN γ et TGF β 1 sont deux cytokines décrites dans la littérature comme ayant des propriétés antagonistes, alors que l'IFN γ exacerbe la réponse inflammatoire et participe fortement à la défense de l'hôte, le TGF β joue le rôle d'un puissant immunosupresseur et occupe donc une position centrale dans les mécanismes qui conduisent à la tolérance immunitaire. D'un côté, les travaux menés par le laboratoire montrent clairement que les cellules B-LLC produisent majoritairement des facteurs anti-inflammatoires et une très faible quantité de cytokines pro-

inflammatoires dont l'IFN γ qui rapellons-le est la principale cytokine inductrice d'IDO. D'un autre coté nos observations montrent des niveaux basals d'expression d'IDO différents entre les patients et des niveaux de production de TGF β variables avec deux groupes qui se distinguent, l'un avec une importante production de TGF β 1 et l'autre avec une expression significativement beaucoup plus faible. Partant de toutes ces observations nous avons émis l'hypothèse que le TGF β 1 pourrait chez les patients hautement producteurs interférer avec la voie d'activation d'IDO. Des constatations similaires mais pour d'autres voies ont été observées sur une série de travaux menés par d'autres laboratoires sur le même type cellulaire, les auteurs avaient démontré que l'IL-10, une des principales cytokines de régulation sécrétée par les Bregs était régulée positivement par l'IFN γ par un mécanisme impliquant la voie des protéines kinases p38 et JNK (Sutavani et al., 2018) et que cette même cytokine était régulée négativement par le TGF β 1 (Zheng et al., 2015). Pour répondre à notre hypothèse, nous avons analysé les conséquences d'une stimulation croisée avec de l'IFN γ et du TGF β 1 sur l'expression d'IDO en utilisant les doses de stimulations précédemment définies sur des cellules B de patients atteints de LLC. Les résultats montrent que l'activation des cellules par l'IFN γ reproduit comme vue précédemment l'activation de STAT1, l'induction d'IRF1 puis de IDO. L'activation des cellules par TGF β 1 n'induit pas la production d'IDO et ceci indépendamment de sa capacité à activer la voie canonique ou non canonique que nous avons évaluée au travers la phosphorylation des Smad2/3 et p38. Enfin, l'incubation simultanée des 2 cytokines antagonistes a entraîné une forte inhibition de l'expression d'IDO sans altérer l'activation de STAT1 ou l'induction de IRF1, par contre nous avons constaté que le TGF β 1 présente une activation préférentielle de l'une de ses 2 voies et ceci en fonction des patients. Ces résultats suggèrent que la présence de TGF β 1 dans la culture de cellules B interfère avec l'induction d'IDO IFN γ -dépendante et il semblerait que ce mécanisme d'inhibition opère en aval de la phosphorylation de STAT1 et de l'induction d'IRF1 car les niveaux de ces derniers n'ont pas été impactés par la présence du TGF β 1.

Maintenant que nous avons répondu à la question de savoir si ces deux cytokines présentaient un antagonisme fonctionnel l'une sur l'autre, nous aimerions comprendre comment opère cet antagonisme fonctionnel et quels sont les mécanismes moléculaires impliqués. Nous retrouvons dans la littérature quelques évidences démontrant l'existence d'un antagonisme réciproque pour ces molécules et soulignant l'importance pour l'une ou l'autre de ces voies à inhiber sa rivale. Déjà au niveau membranaire, des travaux avaient montré que le TGF β R1 pouvait phosphoryler IFNGR1 bloquant ainsi sa capacité à phosphoryler STAT1 (Takaki et al., 2006), dans l'autre sens la voie IFN γ /STAT1 induit le SMAD7 inhibiteur qui bloque l'activation du TGF β R et accélère sa dégradation (Ulloa et al., 1999). Ensuite, il existe aussi des preuves au niveau transcriptionnel, en effet, SMAD et STAT1 ont été décrites comme deux facteurs de transcription compétiteurs pour le co-facteur p300/CBP et l'IFN γ permet la translocation de l'inhibiteur de SMAD3 le YB-1 (Ghosh et al., 2001). A ce stade les exemples pré-cités sont très peu probables dans notre modèle car ils se produisent en amont d'IRF1, Or dans notre cas IRF1 est correctement induit et ce n'est qu'à l'étape de la transcription du gène d'IDO qu'on

retrouve l'inhibition, alors pour y répondre, l'étude d'Ogawa est particulièrement intéressante et révélatrice d'un potentiel dialogue moléculaire similaire à notre cas. Ogawa avait décrit que dans les macrophages, la cytokine IL-12 pouvait être réprimée par la voie des SMAD mais pour ce faire, elle nécessitait préalablement la fixation d'IRF-1 au niveau du promoteur de l'IL-12 (Ogawa et al., 2008) suggérant ainsi que l'induction d'IRF-1 par IFN γ est un préalable pour potentialiser l'effet répresseur des SMAD. Une autre éventualité serait que les SMAD puissent interagir et se fixer à IRF1 empêchant ce dernier de transcrire le gène d'IDO, cette hypothèse est fondée sur des données de la littérature qui rapportent que le domaine de transactivation d'IRF1 ne présente que quelques différences cependant substantielles avec celui des SMAD, et que l'activation de ces deux facteurs de transcription nécessite des mécanismes de phosphorylation C-terminale très proches, en effet IRF1 est activé par phosphorylation de plusieurs sérines en position C-terminale (Schwartz et al., 2011), les SMAD eux nécessitent une phosphorylation de deux sérines en C-terminal permettant de réorganiser les éléments auto-inhibiteurs et le démasquage des sites fonctionnels de transactivation (Chacko et al.). Compte-tenu de ces similitudes frappantes entre IRF et SMAD, nous pouvons émettre l'hypothèse que SMAD2/3 pourrait interagir avec la protéine IRF1 et retenir cette dernière de se fixer sur l'ADN pour induire ses gènes cibles, pour cela des expériences de co-immunoprécipitation et de CHIP de ces 2 protéines permettront de mieux comprendre les mécanismes de régulation moléculaire.

Enfin, la relation entre ces 2 cytokines n'est pas que antagoniste, elle peut également être perçue comme un rapport de complémentarité ou le plus souvent d'absence de lien. C'est ce qu'a révélé notre dernière expérience qui consistait à doser le taux de certaines cytokines après co-stimulation des B-LLC avec IFN γ et TGF β 1. Les résultats montrent que l'IFN γ seul permet de réguler à la hausse quasiment toutes les cytokines analysées indépendamment de leurs orientations inflammatoires ou non (seul l'IL-8 dans notre cas était réfractaire aux stimulations à l'IFN γ ou au TGF β 1), mais l'ajout de TGF β 1 exogène dans le milieu révèle 3 cas de figures :

- Une absence d'interférence avec l'induction de l'IFN γ , ceci est vrai pour les cytokines TNF α , IL-4, IL-8, et indirectement IL-35.
- Une régulation à la baisse de l'IL-17A, cette observation est en accord avec ce qu'on a observé sur l'induction d'IDO.
- Une régulation à la hausse de l'IL-6, en effet le TGF β 1 dans ce cas a potentialisé l'effet de l'IFN γ et a permis une production moyenne de plus de 100 pg/ml d'IL-6

Cette dernière constatation n'est pas totalement surprenante, on sait déjà que IFN γ et le TGF β contrôlent certaines fonctions de la même façon, comme par exemple l'inhibition de la prolifération cellulaire, mais au-delà de cela, n'oublions pas que nous travaillons avec des lymphocytes B-LLC et que parmi ces cellules des Bregs dotées de propriétés immunorégulatrices essentielles à l'équilibre immunologique opèrent constamment en recevant et intégrant tous les signaux du microenvironnement pour répondre à la demande et favoriser un terrain favorable à la transformation et à la progression tumorale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie hétérogène touchant plus de 3000 individus/an en France. Malgré les progrès dans le développement des thérapies, la maladie demeure encore incurable. Au-delà du pool prolifératif de lymphocytes B CD5+CD19+ et son accumulation dans le sang et les organes lymphoïdes primaires et secondaires, les patients souffrent de désordres immunitaires résultants d'un défaut de réponse et de reconnaissance antitumorale. Une partie du clone de lymphocytes B partageant des caractéristiques phénotypiques avec les LB de LLC possède des propriétés immunorégulatrices leur conférant un rôle pivot dans le contrôle du système immunitaire. Afin d'apporter une meilleure compréhension de la maladie pouvant contribuer à améliorer la prise en charge des patients, notre travail a pour principal objectif de caractériser l'hétérogénéité fonctionnelle régulatrice des B-LLC et leur dialogue avec les autres compartiments cellulaires du microenvironnement tumoral. Au travers de l'étude des facteurs régulateurs nos résultats corroborent l'importante littérature relative à la capacité des cellules leucémiques à exprimer les deux cytokines IL-10 et TGF β 1, nous montrons que la neutralisation de l'IL-10 sécrétée ou l'inhibition de la voie de signalisation du TGF β 1 sont impliqués dans les processus de différenciation/maintien des lymphocytes T régulateurs et effecteurs. Conformément aux sous-ensembles régulateurs, nous avons également démontré que des populations de cellules B-LLC expriment FOXP3. L'analyse des fréquences des sous-populations positives pour IL-10, TGF β 1 et FOXP3 dans les échantillons de LLC a discriminé deux groupes de patients LLC significativement différents en termes de fréquence des Tregs et de délais du traitement. Parallèlement nous avons également caractérisé dans les B-LLC une enzyme immunorégulatrice IDO1 métaboliquement active qui catabolise le tryptophane en kynurénine en présence d'IFN γ . Cette induction d'IDO1 a été par ailleurs inhibée lors de stimulations croisées IFN γ /TGF β 1 suggérant des mécanismes sous-jacents non encore élucidés. (figure 12)

Ce travail a permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation des deux facteurs solubles IL-10 et TGF β 1, par ailleurs, de plus amples investigations devront être réalisées afin de caractériser l'impact de ces deux cytokines sur le compartiment des monocytes, des NK et des NKT en utilisant des approches de cocultures autologues et des inhibiteurs des cytokines IL-10 et TGF β 1. D'une part il est important de se focaliser sur la caractérisation de FOXP3 dans les cellules B-LLC. En effet, l'objectif serait de déterminer la localisation de ce facteur par des techniques d'immunofluorescence et de fractionnement sub-cellulaire, les modalités de son expression par des approches génomiques de RNAseq puis enfin de lui attribuer un rôle fonctionnel comme potentiel régulateur dans les cellules leucémiques. Enfin, après avoir caractérisé la première partie de la cascade de signalisation de IDO1 il conviendrait de poursuivre cette caractérisation en étudiant en aval l'activation de la voie AhR et de son implication dans la régulation des gènes favorisant l'échappement tumoral. D'un autre côté l'utilisation de l'inhibiteur spécifique de IDO : le 1-méthyl-tryptophane serait également une

expérience intéressante qui permettrait d'étudier l'immunomodulation de cette enzyme sur les balances lymphocytaires et les compartiments des monocytes et des natural killers.

Enfin, le but final serait d'étudier si IDO1 pourrait être intégré dans un indice polyfonctionnel afin d'affiner le profilage de la progression de la maladie et d'apporter une meilleure stratification des patients LLC. Ce travail, avec toute la modestie requise, contribuera à faire naître un nouvel élan vers de telles perspectives

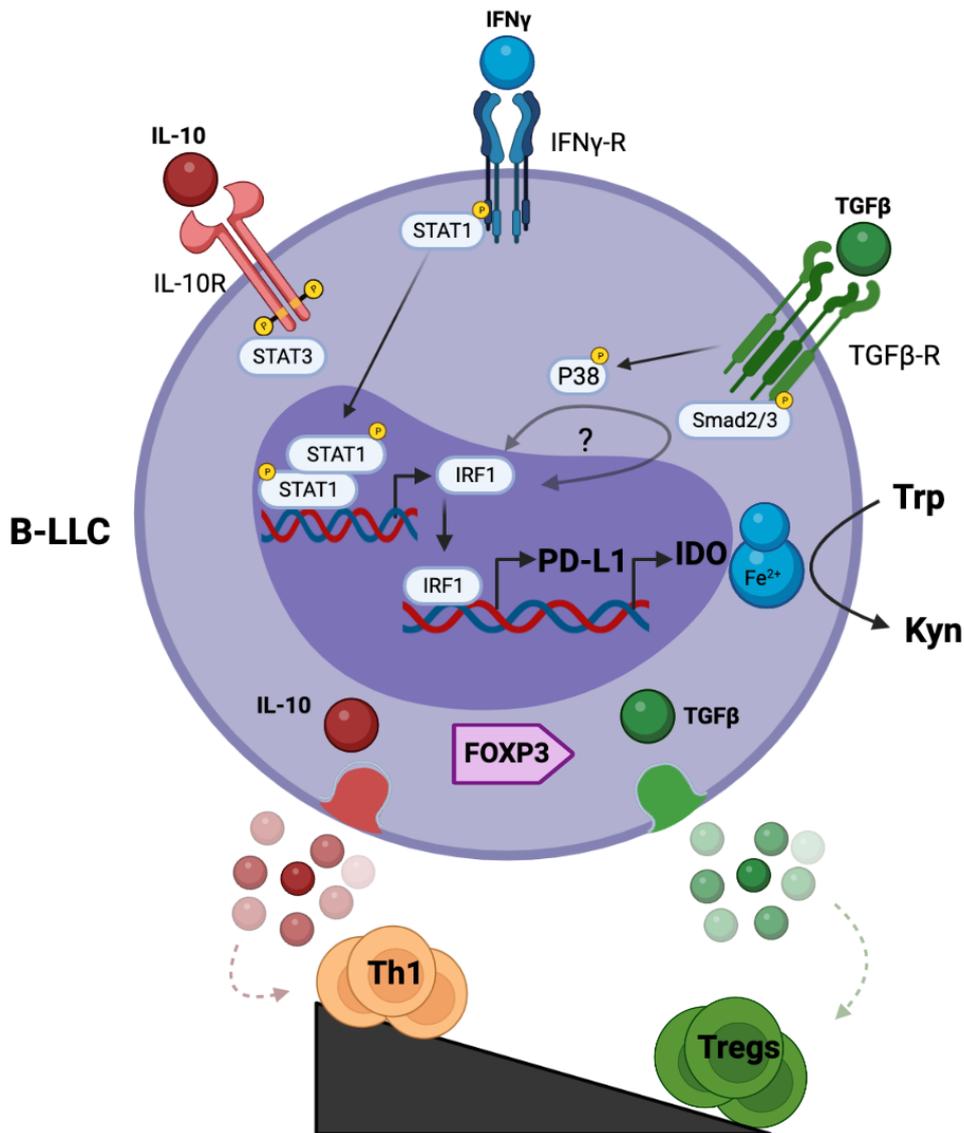


Figure 12 : Facteurs régulateurs produits par les cellules B-LLC et mécanismes d'action des ligands extracellulaires. La cellule leucémique produit les facteurs de régulation IL-10, TGFβ1, Foxp3 et IDO. L'IL-10 entraîne une diminution du taux de Th1 alors que le TGFβ1 augmente le taux de Tregs. Par ailleurs, l'IL-10 active la voie des STAT3 dans les B-LLC, Le TGFβ la voie canonique via smad2/3 ou non canonique via p38 et enfin l'IFNγ passe par la voie STAT1, IRF1 pour induire PD-L1 et IDO, ce dernier métabolise le tryptophane en kynurénine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Acebes-Huerta, A., Huergo-Zapico, L., Gonzalez-Rodriguez, A.P., Fernandez-Guizan, A., Payer, A.R., López-Soto, A., and Gonzalez, S. (2014). Lenalidomide Induces Immunomodulation in Chronic Lymphocytic Leukemia and Enhances Antitumor Immune Responses Mediated by NK and CD4 T Cells. *BioMed Research International* 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/265840>.
2. Albin, E., Rosini, V., Gargaro, M., Mondanelli, G., Belladonna, M.L., Pallotta, M.T., Volpi, C., Fallarino, F., Macchiarulo, A., Antognelli, C., et al. (2017). Distinct roles of immunoreceptor tyrosine-based motifs in immunosuppressive indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 165–176. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12954>.
3. Alhakeem, S.S., Sindhava, V.J., McKenna, M.K., Gachuki, B.W., Byrd, J.C., Muthusamy, N., and Bondada, S. (2015). Role of B cell receptor signaling in IL-10 production by normal and malignant B-1 cells: Role of B cell receptor signaling in IL-10 production. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1362, 239–249. <https://doi.org/10.1111/nyas.12802>.
4. Alspach, E., Lussier, D.M., and Schreiber, R.D. (2019). Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11, a028480. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028480>.
5. Anand, N., Lutshumba, J., Whitlow, M., Abdelaziz, M.H., Mani, R., and Suzuki, Y. (2022). Deficiency in indoleamine-2, 3-dioxygenase induces upregulation of guanylate binding protein 1 and inducible nitric oxide synthase expression in the brain during cerebral infection with *Toxoplasma gondii* in genetically resistant BALB/c mice but not in genetically susceptible C57BL/6 mice. *Microbes and Infection* 24, 104908. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104908>.
6. de Andrés, C., Tejera-Alhambra, M., Alonso, B., Valor, L., Teijeiro, R., Ramos-Medina, R., Mateos, D., Faure, F., and Sánchez-Ramón, S. (2014). New regulatory CD19+CD25+ B-cell subset in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis relapse. Changes after glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology* 270, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.02.003>.
7. Angioni, R., Sánchez-Rodríguez, R., Viola, A., and Molon, B. (2021). TGF- β in Cancer: Metabolic Driver of the Tolerogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 13, 401. <https://doi.org/10.3390/cancers13030401>.
8. Apollonio, B., Scielzo, C., Bertilaccio, M.T.S., Ranghetti, P., Stevenson, F., Packham, G., Ghia, P., Muzio, M., and Caligaris-Cappio, F. (2013). Targeting B-cell anergy in chronic lymphocytic leukemia. *121*, 10. .
9. Ball, H.J. Tryptophan-catabolizing enzymes – party of three. *Frontiers in Immunology* 10. .
10. Berthelot, J.-M., Jamin, C., Amrouche, K., Le Goff, B., Maugars, Y., and Youinou, P. (2012). Les lymphocytes B régulateurs : des acteurs majeurs de l'équilibre immunitaire. *Revue du Rhumatisme* 79, 382–386. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2012.04.008>.
11. Bessede, A., Gargaro, M., Pallotta, M.T., Matino, D., Servillo, G., Brunacci, C., Bicciato, S.,

- Mazza, E.M.C., Macchiarulo, A., Vacca, C., et al. (2014a). Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* *511*, 184–190. <https://doi.org/10.1038/nature13323>.
12. Bessede, A., Gargaro, M., Pallotta, M.T., Matino, D., Servillo, G., Brunacci, C., Bicciato, S., Mazza, E.M.C., Macchiarulo, A., Vacca, C., et al. (2014b). Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* *511*, 184–190. <https://doi.org/10.1038/nature13323>.
 13. Beyer, M., Kochanek, M., Darabi, K., Popov, A., Jensen, M., Endl, E., Knolle, P.A., Thomas, R.K., von Bergwelt-Baildon, M., Debey, S., et al. (2005). Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* *106*, 2018–2025. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0642>.
 14. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206.
 15. Biswas, P., Dai, Y., and Stuehr, D.J. (2022). Indoleamine dioxygenase and tryptophan dioxygenase activities are regulated through GAPDH- and Hsp90-dependent control of their heme levels. *Free Radical Biology and Medicine* *180*, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.01.008>.
 16. Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* *32*, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>.
 17. Bödder, J., Zahan, T., van Slooten, R., Schreiber, G., de Vries, I.J.M., and Flórez-Grau, G. (2021). Harnessing the cDC1-NK Cross-Talk in the Tumor Microenvironment to Battle Cancer. *Front. Immunol.* *11*, 631713. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.631713>.
 18. Borge, M., Remes Lenicov, F., Nannini, P.R., de los Ríos Alicandú, M.M., Podaza, E., Ceballos, A., Fernández Grecco, H., Cabrejo, M., Bezares, R.F., Morande, P.E., et al. (2014). The Expression of Sphingosine-1 Phosphate Receptor-1 in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Impaired by Tumor Microenvironmental Signals and Enhanced by Piceatannol and R406. *J. Immunol.* *193*, 3165–3174. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400547>.
 19. Bouaziz, J.-D., de Masson, A., Le Buanec, H., Bagot, M., and Bensussan, A. (2014). Lymphocytes B régulateurs : état des connaissances. *Med Sci (Paris)* *30*, 721–724. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143008002>.
 20. Brown, J.R., Byrd, J.C., Coutre, S.E., Benson, D.M., Flinn, I.W., Wagner-Johnston, N.D., Spurgeon, S.E., Kahl, B.S., Bello, C., Webb, H.K., et al. (2014). Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110δ, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. *123*, 8. .
 21. Burnet, F. M. (1967). "Immunological aspects of malignant disease." *Lancet* *1*(7501): 1171-4.

22. Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* *11*, 119–130. <https://doi.org/10.1038/nri2916>.
23. Campbell, B.M., Charych, E., Lee, A.W., and Möller, T. (2014). Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front. Neurosci.* *8*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00012>.
24. Campoli, M., and Ferrone, S. (2008). HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene* *27*, 5869–5885. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.273>.
25. Carlin, J.M., Ozaki, Y., Byrne, G.I., Brown, R.R., and Borden, E.C. (1989). Interferons and indoleamine 2,3-dioxygenase: Role in antimicrobial and antitumor effects. *Experientia* *45*, 535–541. <https://doi.org/10.1007/BF01990503>.
26. Carosella, E.D. (2014). HLA-G : de la tolérance foëto-maternelle à l'acceptation d'organe. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* *198*, 801–812. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)31288-9](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)31288-9).
27. Chacko, B.M., Qin, B.Y., Tiwari, A., Shi, G., Lam, S., Hayward, L.J., de Caestecker, M., and Lin, K. Structural Basis of Heteromeric Smad Protein Assembly in TGF- β Signaling. *Molecular Cell* *11*. .
28. Chavez, J.C., Piris-Villaespesa, M., Dalia, S., Powers, J., Turba, E., Nodzon, L., Komrokji, R., Sokol, L., Locke, F.L., Lancet, J., et al. (2016). Results of a phase II study of lenalidomide and rituximab for refractory/relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* *47*, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.05.012>.
29. Chen, W. (2011). IDO: more than an enzyme. *Nat Immunol* *12*, 809–811. <https://doi.org/10.1038/ni.2088>.
30. Chen, S., Zhang, Z., Zheng, X., Tao, H., Zhang, S., Ma, J., Liu, Z., Wang, J., Qian, Y., Cui, P., et al. (2021). Response Efficacy of PD-1 and PD-L1 Inhibitors in Clinical Trials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol.* *11*, 562315. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.562315>.
31. Cheng, P., Liao, H.-Y., and Zhang, H.-H. (2022). The role of Wnt/mTOR signaling in spinal cord injury. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma* *25*, 101760. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2022.101760>.
32. Chihara, N., Madi, A., Kondo, T., Zhang, H., Acharya, N., Singer, M., Nyman, J., Marjanovic, N.D., Kowalczyk, M.S., Wang, C., et al. (2018). Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature* *558*, 454–459. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0206-z>.
33. Choi, J.K., and Egwuagu, C.E. (2021). Interleukin 35 Regulatory B Cells. *Journal of Molecular Biology* *433*, 166607. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.019>.
34. Chon, S.Y., Hassanain, H.H., and Gupta, S.L. (1996). Cooperative Role of Interferon Regulatory Factor 1 and p91 (STAT1) Response Elements in Interferon- γ -inducible Expression of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 17247–17252. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17247>.
35. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related

- inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>.
36. Corm, S., Berthon, C., Imbenotte, M., Biggio, V., Lhermitte, M., Dupont, C., Briche, I., and Quesnel, B. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase activity of acute myeloid leukemia cells can be measured from patients' sera by HPLC and is inducible by IFN- γ . *Leukemia Research* 33, 490–494. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.06.014>.
 37. Cosson, A., Chapiro, E., Belhouachi, N., Cung, H.-A., Keren, B., Damm, F., Algrin, C., Lefebvre, C., Fert-Ferrer, S., Luquet, I., et al. (2014). 14q deletions are associated with trisomy 12, *NOTCH1* mutations and unmutated *IGHV* genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: 14q Deletions in Chronic Lymphocytic Leukemia and Small Lymphocytic Lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 53, 657–666. <https://doi.org/10.1002/gcc.22176>.
 38. Coughlin, C.M., Salhany, K.E., Gee, M.S., LaTemple, D.C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J.E., Liu, L., et al. Tumor Cell Responses to IFN β Affect Tumorigenicity and Response to IL-12 Therapy and Antiangiogenesis. 10. .
 39. Cramer, P., Langerbeins, P., Eichhorst, B., and Hallek, M. (2016). Advances in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia: current recommendations on management and first-line treatment by the German CLL Study Group (GCLLSG). *Eur J Haematol* 96, 9–18. <https://doi.org/10.1111/ejh.12678>.
 40. Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marcé, S., López-Guillermo, A., Campo, E., andMontserrat, E. (2003). ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 348, 1764–1775. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa023143>.
 41. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., et al. (1999). Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 94, 1840–1847. <https://doi.org/10.1182/blood.V94.6.1840>.
 42. D'Arena, G., Laurenti, L., Minervini, M.M., Deaglio, S., Bonello, L., De Martino, L., De Padua, L., Savino, L., Tarnani, M., De Feo, V., et al. (2011). Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leukemia Research* 35, 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.08.010>.
 43. Darnell, J.E., Kerr, Ian M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* 264, 1415–1421. <https://doi.org/10.1126/science.8197455>.
 44. Del Gaizo Moore, V., Brown, J.R., Certo, M., Love, T.M., Novina, C.D., and Letai, A. (2007). Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest.* 117, 112–121. <https://doi.org/10.1172/JCI28281>.
 45. Demarest, T.G., Babbar, M., Okur, M.N., Dan, X., Croteau, D.L., Fakouri, N.B., Mattson, M.P., and Bohr, V.A. (2019). NAD⁺ Metabolism in Aging and Cancer. 28. .
 46. Deng, J., Liu, X., Rong, L., Ni, C., Li, X., Yang, W., Lu, Y., Yan, X., Qin, C., Zhang, L., et al. (2014).

- IFN γ -responsiveness of endothelial cells leads to efficient angiostasis in tumours involving down-regulation of Dll4: IFN γ suppresses the Dll4/Notch pathway in ECs. *J. Pathol.* *233*, 170–182. <https://doi.org/10.1002/path.4340>.
47. Desvignes, L., and Ernst, J.D. (2009). Interferon- γ -Responsive Nonhematopoietic Cells Regulate the Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. *Immunity* *31*, 974–985. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.007>.
48. Dighiero, G., and Hamblin, T.J. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *371*, 13. .
49. DiLillo, D.J., Weinberg, J.B., Yoshizaki, A., Horikawa, M., Bryant, J.M., Iwata, Y., Matsushita, T., Matta, K.M., Chen, Y., Venturi, G.M., et al. (2013). Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia* *27*, 170–182. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.165>.
50. Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M.H., Najafian, N., and Rothstein, D.M. (2011). Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 3645–3656. <https://doi.org/10.1172/JCI46274>.
51. Ding, W., Knox, T.R., Tschumper, R.C., Wu, W., Schwager, S.M., Boysen, J.C., Jelinek, D.F., and Kay, N.E. (2010). Platelet-derived growth factor (PDGF)–PDGF receptor interaction activates bone marrow–derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood* *116*, 2984–2993. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-269894>.
52. Dong, J.-T., Boyd, J.C., and Frierson, H.F. (2001). Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate* *49*, 166–171. <https://doi.org/10.1002/pros.1131>.
53. Dong, P., Xiong, Y., Yu, J., Chen, L., Tao, T., Yi, S., Hanley, S.J.B., Yue, J., Watari, H., and Sakuragi, N. (2018). Control of PD-L1 expression by miR-140/142/340/383 and oncogenic activation of the OCT4–miR-18a pathway in cervical cancer. *Oncogene* *37*, 5257–5268. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0347-4>.
54. Douglas, R.S., Capocasale, R.J., Lamb, R.J., Nowell, P.C., and Moore, J.S. (1997). Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Are Resistant to the Apoptotic Effects of Transforming Growth Factor- β . *Blood* *89*, 941–947. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.3.941>.
55. Drennan, S., D’Avola, A., Gao, Y., Weigel, C., Chrysostomou, E., Steele, A.J., Zenz, T., Plass, C., Johnson, P.W., Williams, A.P., et al. (2017). 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* *31*, 1686–1694. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.356>.
56. Du, M.X., Sotero-Esteva, W.D., and Taylor, M.W. (2000). Analysis of Transcription Factors Regulating Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase by IFN- *gamma*. *Journal of Interferon & Cytokine Research* *20*, 133–142. <https://doi.org/10.1089/107999000312531>.
57. Dubovsky, J.A., Beckwith, K.A., Natarajan, G., Woyach, J.A., Jaglowski, S., Zhong, Y., Hessler, J.D., Liu, T.-M., Chang, B.Y., Larkin, K.M., et al. (2013). Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. *Blood* *122*, 2539–2549. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-507947>.

58. Egwuagu, C.E., and Yu, C.-R. (2015). Interleukin 35-Producing B Cells (i35-Breg): A New Mediator of Regulatory B-Cell Functions in CNS Autoimmune Diseases. *Crit Rev Immunol* 35, 49–57. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2015012558>.
59. Eichhorst, B., Dreyling, M., Robak, T., Montserrat, E., and Hallek, M. (2011). Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 22, vi50–vi54. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr377>.
60. Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M., and Buske, C. (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 26, v78–v84. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv303>.
61. Ekkens, M.J., Shedlock, D.J., Jung, E., Troy, A., Pearce, E.L., Shen, H., and Pearce, E.J. (2007). Th1 and Th2 Cells Help CD8 T-Cell Responses. *Infect Immun* 75, 2291–2296. <https://doi.org/10.1128/IAI.01328-06>.
62. Elnenaï, M.O., Hamoudi, R.A., Swansbury, J., Gruszka-Westwood, A.M., Brito-Babapulle, V., Matutes, E., and Catovsky, D. (2003). Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma. *Genes Chromosom. Cancer* 36, 99–106. <https://doi.org/10.1002/gcc.10140>.
63. Esatoğlu, S.N., Keskin, D., Eşkazan, A.E., Elverdi, T., SaliHoğlu, A., Ar, M.C., Öngören, Ş., Başlar, Z., Aydın, Y., Uzun, H., et al. The prognostic value of serum levels of a proliferation-inducing ligand (APRIL) in treatment-naïve patients with chronic lymphocytic leukemia. *Turk J Med Sci* 7. .
64. Facciabene, A., Motz, G.T., and Coukos, G. (2012). T-Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. *Cancer Research* 72, 2162–2171. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3687>.
65. Falisi, E., Novella, E., Visco, C., Guercini, N., Maura, F., Giaretta, I., Pomponi, F., Nichele, I., Finotto, S., Montaldi, A., et al. (2014). B-cell receptor configuration and mutational analysis of patients with chronic lymphocytic leukaemia and trisomy 12 reveal recurrent molecular abnormalities: Recurrent molecular abnormalities in +12 CLL patients. *Hematol Oncol* 32, 22–30. <https://doi.org/10.1002/hon.2086>.
66. Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 1206–1212. <https://doi.org/10.1038/ni1003>.
67. Fan, G., Martinowich, K., Chin, M.H., He, F., Fouse, S.D., Hutnick, L., Hattori, D., Ge, W.H., Shen, Y., and Hao, W. DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. 13. .
68. Forconi, F., and Moss, P. (2015a). Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood* 126, 573–581. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-567388>.
69. Forconi, F., and Moss, P. (2015b). Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood* 126, 573–581. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-567388>.
70. Fornecker, L.-M., Aurran-Schleinitz, T., Michallet, A.-S., Cazin, B., Guieze, R., Dilhuydy, M.-S., Zini, J.-M., Tomowiak, C., Lepretre, S., Cymbalista, F., et al. (2015). Salvage outcomes in

- patients with first relapse after fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for chronic lymphocytic leukemia: The French intergroup experience: Salvage Treatments in CLL After FCR Frontline. *Am. J. Hematol.* *90*, 511–514. <https://doi.org/10.1002/ajh.23999>.
71. Forouzandeh, F., Jalili, R.B., Germain, M., Duronio, V., and Ghahary, A. (2008). Skin cells, but not T cells, are resistant to indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) expressed by allogeneic fibroblasts. *Wound Repair Regen* *16*, 379–387. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00377.x>.
 72. Fujigaki, H., Saito, K., Lin, F., Fujigaki, S., Takahashi, K., Martin, B.M., Chen, C.Y., Masuda, J., Kowalak, J., Takikawa, O., et al. (2006). Nitration and Inactivation of IDO by Peroxynitrite. *J Immunol* *176*, 372–379. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.372>.
 73. Fujita, Y., Yagishita, S., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Kosaka, N., Takeshita, F., Fujiwara, T., Tsuta, K., Nokihara, H., Tamura, T., et al. (2015). The Clinical Relevance of the miR-197/CKS1B/STAT3-mediated PD-L1 Network in Chemoresistant Non-small-cell Lung Cancer. *Molecular Therapy* *23*, 717–727. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.10>.
 74. Gheybi, M.K., Farrokhi, S., Ravanbod, M.R., Ostovar, A., Mehrzad, V., and Nematollahi, P. (2017). The correlation of CD19 + CD24 + CD38 + B cells and other clinicopathological variables with the proportion of circulating Tregs in breast cancer patients. *Breast Cancer* *24*, 756–764. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0775-y>.
 75. Ghia, P., Ferreri, A.J.M., and Caligaris-Cappio, F. (2007). Chronic lymphocytic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* *64*, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.04.008>.
 76. Ghosh, A.K., Yuan, W., Mori, Y., Chen, S., and Varga, J. (2001). Antagonistic Regulation of Type I Collagen Gene Expression by Interferon- γ and Transforming Growth Factor- β . *Journal of Biological Chemistry* *276*, 11041–11048. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004709200>.
 77. Giannoni, P., Pietra, G., Travaini, G., Quarto, R., Shyti, G., Benelli, R., Ottaggio, L., Mingari, M.C., Zupo, S., Cutrona, G., et al. (2014). Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* *99*, 1078–1087. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.091405>.
 78. Giannopoulos (1994). Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep* https://doi.org/10.3892/or_00000059.
 79. Gieseck, R.L., Wilson, M.S., and Wynn, T.A. (2018). Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Immunol* *18*, 62–76. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.90>.
 80. Glass, M.C., Glass, D.R., Oliveria, J.-P., Mbiribindi, B., Esquivel, C.O., Krams, S.M., Bendall, S.C., and Martinez, O.M. (2022). Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets. *Cell Reports* *39*, 110728. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110728>.
 81. Godin-Ethier, J., Hanafi, L.-A., Duvignaud, J.-B., Leclerc, D., and Lapointe, R. (2011). IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive. *Molecular Immunology* *49*, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.08.017>.

82. Goenka, R., Parent, M.A., Elzer, P.H., and Baldwin, C.L. (2011). B Cell-deficient Mice Display Markedly Enhanced Resistance to the Intracellular Bacterium *Brucella abortus*. *The Journal of Infectious Diseases* *203*, 1136–1146. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq171>.
83. Görgün, G., Holderried, T.A.W., Zahrieh, D., Neuberg, D., and Gribben, J.G. (2005). Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J. Clin. Invest.* *115*, 1797–1805. <https://doi.org/10.1172/JCI24176>.
84. Greco, F.A., Albin, E., Coletti, A., Dolciami, D., Carotti, A., Orabona, C., Grohmann, U., and Macchiarulo, A. (2019). Tracking Hidden Binding Pockets Along the Molecular Recognition Path of L-Trp to Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1. *ChemMedChem* *14*, 2084–2092. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900529>.
85. Grohmann, U., Bianchi, R., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Micheletti, A., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2003). Functional Plasticity of Dendritic Cell Subsets as Mediated by CD40 Versus B7 Activation. *J Immunol* *171*, 2581–2587. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2581>.
86. Grohmann, U., Volpi, C., Fallarino, F., Bozza, S., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M.L., Ayroldi, E., Nocentini, G., et al. (2007). Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat Med* *13*, 579–586. <https://doi.org/10.1038/nm1563>.
87. Grygorowicz, M.A., Biernacka, M., Bujko, M., Nowak, E., Rymkiewicz, G., Paszkiewicz-Kozik, E., Borycka, I.S., Bystydziński, Z., Walewski, J., and Markowicz, S. (2016). Human regulatory T cells suppress proliferation of B lymphoma cells. *Leukemia & Lymphoma* *57*, 1903–1920. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1121260>.
88. Guillemin, G.J., Kerr, S.J., Smythe, G.A., Smith, D.G., Kapoor, V., Armati, P.J., Croitoru, J., and Brew, B.J. (2001). Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection: Kynurenine pathway in astrocytes. *Journal of Neurochemistry* *78*, 842–853. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00498.x>.
89. Guo, Y., Zhang, X., Qin, M., and Wang, X. (2015). Changes in peripheral CD19+Foxp3+ and CD19+TGFβ+ regulatory B cell populations in rheumatoid arthritis patients with interstitial lung disease. *Journal of Thoracic Disease* *7*, 7. .
90. Gutiérrez-Vázquez, C., and Quintana, F.J. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* *48*, 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.012>.
91. Hallek, M. (2015). Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment: Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am. J. Hematol.* *90*, 446–460. <https://doi.org/10.1002/ajh.23979>.
92. Hallek, M. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment: HALLEK. *Am J Hematol* *92*, 946–965. <https://doi.org/10.1002/ajh.24826>.
93. Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., et al. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*

- 131, 2745–2760. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806398>.
94. Hamblin, T.J., Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Thomas, P.W., Stevenson, F.K., and Oscier, D.G. (2002). CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* *99*, 1023–1029. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.3.1023>.
95. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *7*. .
96. Hamid, O., Gajewski, T.F., Frankel, A.E., Bauer, T.M., Olszanski, A.J., Luke, J.J., Balmanoukian, A.S., Schmidt, E.V., Sharkey, B., Maleski, J., et al. (2017). Epcadostat plus pembrolizumab in patients with advanced melanoma: Phase 1 and 2 efficacy and safety results from ECHO-202/KEYNOTE-037. *Annals of Oncology* *28*, v428–v429. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx377.001>.
97. Hayashi, T., Hideshima, T., Akiyama, M., Raje, N., Richardson, P., Chauhan, D., and Anderson, K.C. (2003). Ex vivo induction of multiple myeloma–specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* *102*, 1435–1442. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2828>.
98. He, R. PD-1 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia and Large B-Cell Richter Transformation (DLBCL-RT): A Distinguishing Feature for DLBCL-RT and Promising Surrogate Marker for Clonal Relatedness. *2*. .
99. Henderson, J.G., Opejin, A., Jones, A., Gross, C., and Hawiger, D. (2015). CD5 Instructs Extrathymic Regulatory T Cell Development in Response to Self and Tolerizing Antigens. *Immunity* *42*, 471–483. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.010>.
100. Hennequart, M., Pilotte, L., Cane, S., Hoffmann, D., Stroobant, V., Plaen, E.D., and Eynde, B.J.V. den (2017). Constitutive IDO1 Expression in Human Tumors Is Driven by Cyclooxygenase-2 and Mediates Intrinsic Immune Resistance. *Cancer Immunology Research* *5*, 695–709. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0400>.
101. Hisada, M. (2001). Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *98*, 1979–1981. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.6.1979>.
102. Ho, J., Kurtz, C.C., Naganuma, M., Ernst, P.B., Cominelli, F., and Rivera-Nieves, J. (2008). A CD8⁺/CD103^{high} T Cell Subset Regulates TNF-Mediated Chronic Murine Ileitis. *J Immunol* *180*, 2573–2580. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2573>.
103. Hoffmann, D., Dvorakova, T., Stroobant, V., Bouzin, C., Daumerie, A., Solvay, M., Klaessens, S., Letellier, M.-C., Renauld, J.-C., van Baren, N., et al. (2020). Tryptophan 2,3-Dioxygenase Expression Identified in Human Hepatocellular Carcinoma Cells and in Intratumoral Pericytes of Most Cancers. *Cancer Immunology Research* *8*, 19–31. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0040>.
104. Höglund, E., Øverli, Ø., and Winberg, S. (2019). Tryptophan Metabolic Pathways and Brain Serotonergic Activity: A Comparative Review. *Front. Endocrinol.* *10*, 158. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00158>.
105. Hossain, D.M.S., Panda, A.K., Manna, A., Mohanty, S., Bhattacharjee, P., Bhattacharyya, S., Saha, T., Chakraborty, S., Kar, R.K., Das, T., et al. (2013). RETRACTED: FoxP3

- Acts as a Cotranscription Factor with STAT3 in Tumor-Induced Regulatory T Cells. *Immunity* 39, 1057–1069. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.005>.
106. Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., DiLillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., et al. (2011). Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117, 530–541. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-294249>.
107. Jenabian, M.-A., Patel, M., Kema, I., Kanagaratham, C., Radzioch, D., Thébault, P., Lapointe, R., Tremblay, C., Gilmore, N., Ancuta, P., et al. (2013). Distinct Tryptophan Catabolism and Th17/Treg Balance in HIV Progressors and Elite Controllers. *PLoS ONE* 8, e78146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078146>.
108. Jia, L., Tian, P., and Ding, C. (2009). Immunoregulatory effects of indoleamine 2, 3-dioxygenase in transplantation. *Transplant Immunology* 21, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2009.01.004>.
109. Jin, G., Hamaguchi, Y., Matsushita, T., Hasegawa, M., Le Huu, D., Ishiura, N., Naka, K., Hirao, A., Takehara, K., and Fujimoto, M. (2013). B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131, 1674-1682.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.044>.
110. Kessel, A., Haj, T., Peri, R., Snir, A., Melamed, D., Sabo, E., and Toubi, E. (2012). Human CD19+CD25high B regulatory cells suppress proliferation of CD4+ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmunity Reviews* 11, 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.018>.
111. Khan, A.R., Hams, E., Floudas, A., Sparwasser, T., Weaver, C.T., and Fallon, P.G. (2015). PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun* 6, 5997. <https://doi.org/10.1038/ncomms6997>.
112. Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., Wierda, W.G., O'Brien, S., Gribben, J., and Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* 3, 16096. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.96>.
113. Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., et al. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* 17, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.019>.
114. Knittel, G., Rehkämper, T., Korovkina, D., Liedgens, P., Fritz, C., Torgovnick, A., Al-Baldawi, Y., Al-Maarri, M., Cun, Y., Fedorchenko, O., et al. (2017). Two mouse models reveal an actionable PARP1 dependence in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun* 8, 153. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00210-6>.
115. Kovarik, P. (2001). Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *The EMBO Journal* 20, 91–100. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.91>.
116. Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology* 30, 16–34.

<https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>.

117. Lawrence, D.W., and Kornbluth, J. (2016). E3 ubiquitin ligase NKLAM ubiquitinates STAT1 and positively regulates STAT1-mediated transcriptional activity. *Cellular Signalling* 28, 1833–1841. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.08.014>.
118. Lazarian, G., Guièze, R., and Wu, C.J. (2017). Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* 35, 984–993. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.0822>.
119. Le Floc’h, N., Otten, W., and Merlot, E. (2011). Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids* 41, 1195–1205. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0752-7>.
120. Le Roy, C., Deglesne, P.-A., Chevallier, N., Beitar, T., Eclache, V., Quettier, M., Boubaya, M., Letestu, R., Lévy, V., Ajchenbaum-Cymbalista, F., et al. (2012). The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 120, 356–365. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-397158>.
121. Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2011). Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *Journal of Autoimmunity* 36, 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.01.005>.
122. Lepretre, S., Aurran, T., Mahé, B., Cazin, B., Tournilhac, O., Maisonneuve, H., Casasnovas, O., Delmer, A., Leblond, V., Royer, B., et al. (2012). Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood* 119, 5104–5110. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365437>.
123. Lewis-Ballester, A., Pham, K.N., Batabyal, D., Karkashon, S., Bonanno, J.B., Poulos, T.L., and Yeh, S.-R. (2017). Structural insights into substrate and inhibitor binding sites in human indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Nat Commun* 8, 1693. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01725-8>.
124. Li, J., Meinhardt, A., Roehrich, M.-E., Golshayan, D., Dudler, J., Pagnotta, M., Trucco, M., and Vassalli, G. (2007). Indoleamine 2,3-dioxygenase gene transfer prolongs cardiac allograft survival. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 293, H3415–H3423. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00532.2007>.
125. Li, Y.-M., Yu, J.-M., Liu, Z.-Y., Yang, H.-J., Tang, J., and Chen, Z.-N. (2019). Programmed Death Ligand 1 Indicates Pre-Existing Adaptive Immune Response by Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. *IJMS* 20, 5138. <https://doi.org/10.3390/ijms20205138>.
126. Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. *Journal of Experimental Medicine* 193, 727–740. <https://doi.org/10.1084/jem.193.6.727>.
127. Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T.F.E., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., et al. (2013). Interleukin 21-Induced Granzyme B-Expressing B Cells Infiltrate Tumors and Regulate T Cells. *Cancer Res* 73, 2468–2479. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3450>.
128. Linet, M.S., Schubauer-Berigan, M.K., Weisenburger, D.D., Richardson, D.B., Landgren,

- O., Blair, A., Silver, S., Field, R.W., Caldwell, G., Hatch, M., et al. (2007). Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol* 139, 672–686. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06847.x>.
129. Litztenburger, U.M., Opitz, C.A., Sahm, F., Rauschenbach, K.J., Trump, S., Winter, M., Ott, M., Ochs, K., Lutz, C., Liu, X., et al. (2014). Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget* 5, 1038–1051. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1637>.
130. Liu, H., Liu, L., Fletcher, B.S., and Visner, G.A. (2006a). Novel Action of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Attenuating Acute Lung Allograft Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 566–572. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1413OC>.
131. Liu, H.-P., Cao, A.T., Feng, T., Li, Q., Zhang, W., Yao, S., Dann, S.M., Elson, C.O., and Cong, Y. (2015). TGF- β converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression: Cellular immune response. *Eur. J. Immunol.* 45, 1010–1018. <https://doi.org/10.1002/eji.201444726>.
132. Liu, J., Chen, Z., Li, Y., Zhao, W., Wu, J., and Zhang, Z. (2021). PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Front. Pharmacol.* 12, 731798. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.731798>.
133. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017a). NF- κ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
134. Liu, W., Putnam, A.L., Xu-yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., de St. Groth, B.F., et al. (2006b). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine* 203, 1701–1711. <https://doi.org/10.1084/jem.20060772>.
135. Liu, Z., Hu, Y., Yu, P., Lin, M., Huang, G., Kawai, T., Taubman, M., Wang, Z., Xiaozhe, H., The Forsyth Institute, United States, et al. (2017b). Toll-like receptor agonists *Porphyromonas gingivalis* LPS and CpG differentially regulate IL-10 competency and frequencies of mouse B10 cells. *J. Appl. Oral Sci.* 25, 90–100. <https://doi.org/10.1590/1678-77572016-0277>.
136. Loeb, L.A., Loeb, K.R., and Anderson, J.P. (2003). Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 776–781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0334858100>.
137. Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology* 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>.
138. Luo, Y., Yang, J., Zhang, C., Jin, Y., Pan, H., Liu, L., Gong, Y., Xia, Y., Wang, G., Zhang, J., et al. (2020). Up-regulation of miR-27a promotes monocyte-mediated inflammatory responses in Kawasaki disease by inhibiting function of B10 cells. *J Leukoc Biol* 107, 133–144. <https://doi.org/10.1002/JLB.5A0919-075RR>.
139. Majoros, A., Platanitis, E., Szappanos, D., Cheon, H., Vogl, C., Shukla, P., Stark, G.R., Sexl, V., Schreiber, R., Schindler, C., et al. (2016). Response to interferons and antibacterial innate immunity in the absence of tyrosine-phosphorylated STAT. *EMBO Reports* 16. .

140. Mandarano, M., Bellezza, G., Belladonna, M.L., Vannucci, J., Gili, A., Ferri, I., Lupi, C., Ludovini, V., Falabella, G., Metro, G., et al. (2020). Indoleamine 2,3-Dioxygenase 2 Immunohistochemical Expression in Resected Human Non-small Cell Lung Cancer: A Potential New Prognostic Tool. *Front. Immunol.* *11*, 839. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00839>.
141. Manna, A., Kellett, T., Aulakh, S., Lewis-Tuffin, L.J., Dutta, N., Knutson, K., Chini, E., Pinilla-Ibarz, J., Lamanna, N., Manochakian, R., et al. (2020). Targeting CD38 is lethal to Breg-like chronic lymphocytic leukemia cells and Tregs, but restores CD8+ T-cell responses. *Blood Advances* *4*, 2143–2157. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001091>.
142. Marinelli, O., Annibali, D., Morelli, M.B., Zeppa, L., Tuyaeerts, S., Aguzzi, C., Amantini, C., Maggi, F., Ferretti, B., Santoni, G., et al. (2020). Biological Function of PD-L2 and Correlation With Overall Survival in Type II Endometrial Cancer. *Front. Oncol.* *10*, 538064. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.538064>.
143. Mato, A.R., Barrientos, J.C., Ghosh, N., Pagel, J.M., Brander, D.M., Gutierrez, M., Kadish, K., Tomlinson, B., Iyengar, R., Ipe, D., et al. (2020). Prognostic Testing and Treatment Patterns in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Novel Targeted Therapies: Results From the informCLL Registry. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* *20*, 174-183.e3. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.10.009>.
144. Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S.L., Sakaguchi, S., Takeda, K., et al. (2014). Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity* *41*, 1040–1051. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.016>.
145. Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* JCI36030. <https://doi.org/10.1172/JCI36030>.
146. Matutes, E., Morilla, R., Owusu-Ankomah, K., Houlihan, A., and Catovsky, D. The Immunophenotype of Splenic Lymphoma With Villous Lymphocytes and its Relevance to the Differential Diagnosis With Other B-Cell Disorders. *5*.
147. Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., and Londei, M. (2003). Prevention of Arthritis by Interleukin 10–producing B Cells. *Journal of Experimental Medicine* *197*, 489–501. <https://doi.org/10.1084/jem.20021293>.
148. McClanahan, F., Hanna, B., Miller, S., Clear, A.J., Lichter, P., Gribben, J.G., and Seiffert, M. (2015). PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *126*, 203–211. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-622936>.
149. McGaha, T.L., Huang, L., Lemos, H., Metz, R., Mautino, M., Prendergast, G.C., and Mellor, A.L. (2012). Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* *249*, 135–157. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01149.x>.
150. Meireson, A., Devos, M., and Brochez, L. (2020). IDO Expression in Cancer: Different Compartment, Different Functionality? *Front. Immunol.* *11*, 531491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.531491>.

151. Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., and Bradfield, C.A. (2010). An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells. *J.I.* *185*, 3190–3198. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903670>.
152. Miki, T., Sun, H., Lee, Y.-H., Tandin, A., Kovscek, A.M., Subbotin, V., Fung, J.J., and Valdivia, L.A. (2001). Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplantation Proceedings* *33*, 129–130. [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(00\)02792-5](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(00)02792-5).
153. Mimura, K., Teh, J.L., Okayama, H., Shiraishi, K., Kua, L.-F., Koh, V., Smoot, D.T., Ashktorab, H., Oike, T., Suzuki, Y., et al. (2018). PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Sci* *109*, 43–53. <https://doi.org/10.1111/cas.13424>.
154. Mion, F., D'Incà, F., Danelli, L., Toffoletto, B., Guarnotta, C., Frossi, B., Burocchi, A., Rigoni, A., Gerdes, N., Lutgens, E., et al. (2014). Mast Cells Control the Expansion and Differentiation of IL-10-Competent B Cells. *J.I.* *193*, 4568–4579. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302593>.
155. Mira, E., Carmona-Rodríguez, L., Tardáguila, M., Azcoitia, I., González-Martín, A., Almonacid, L., Casas, J., Fabriás, G., and Mañes, S. (2013). A lovastatin-elicited genetic program inhibits M2 macrophage polarization and enhances T cell infiltration into spontaneous mouse mammary tumors. *Oncotarget* *4*, 2288–2301. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1376>.
156. Mirlekar, B. (2022). Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *SAGE Open Medicine* *10*, 205031212110690. <https://doi.org/10.1177/20503121211069012>.
157. Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology* *27*, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>.
158. Mohinta, S., Kannan, A.K., Gowda, K., Amin, S.G., Perdew, G.H., and August, A. (2015). Differential Regulation of Th17 and T Regulatory Cell Differentiation by Aryl Hydrocarbon Receptor Dependent Xenobiotic Response Element Dependent and Independent Pathways. *Toxicol. Sci.* *145*, 233–243. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv046>.
159. Mohr, A., Renaudineau, Y., Bagacean, C., Pers, J.-O., Jamin, C., and Bordron, A. (2016). Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia. *Oncolmmunology* *5*, e1132977. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1132977>.
160. Morabito, F., Cutrona, G., Gentile, M., Fabris, S., Matis, S., Vigna, E., Todoerti, K., Colombo, M., Recchia, A.G., Bossio, S., et al. (2015). Is ZAP70 still a key prognostic factor in early stage chronic lymphocytic leukaemia? Results of the analysis from a prospective multicentre observational study. *Br J Haematol* *168*, 455–459. <https://doi.org/10.1111/bjh.13117>.
161. Morton, L.M., Curtis, R.E., Linet, M.S., Bluhm, E.C., Tucker, M.A., Caporaso, N., Ries,

- L.A.G., and Fraumeni, J.F. (2010). Second Malignancy Risks After Non-Hodgkin's Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Differences by Lymphoma Subtype. *JCO* 28, 4935–4944. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.1112>.
162. Munk Pedersen, I., and Reed, J. (2004). Microenvironmental Interactions and Survival of CLL B-cells. *Leukemia & Lymphoma* 45, 2365–2372. <https://doi.org/10.1080/10428190412331272703>.
163. Munn, D.H. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *Journal of Clinical Investigation* 114, 280–290. <https://doi.org/10.1172/JCI200421583>.
164. Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in Immunology* 34, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>.
165. Munn, D.H., Sharma, M.D., Baban, B., Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., and Mellor, A.L. (2005). GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity* 22, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.013>.
166. Muta, T., Kurosaki, T., Misulovint, Z., Sanched, M., Nussenzweig, M.C., and Ravetch, J.V. (1994). A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of FcγRIIB modulates B-cell receptor signalling. *368*, 4. .
167. Myint, A.M., and Kim, Y.K. (2003). Cytokine–serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. *Medical Hypotheses* 61, 519–525. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(03\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(03)00207-X).
168. Myint, A.-M., and Kim, Y.-K. (2014). Network beyond IDO in psychiatric disorders: Revisiting neurodegeneration hypothesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 48, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.08.008>.
169. Neta, R., and Salvin, S.B. Specific Suppression of Delayed Hypersensitivity: The Possible Presence of a Suppressor B Cell in the Regulation of Delayed Hypersensitivity. 11. .
170. Nicholas, N.S., Apollonio, B., and Ramsay, A.G. (2016). Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.003>.
171. Niir, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2, 945–956. <https://doi.org/10.1038/nri955>.
172. Nishio, M., Endo, T., Tsukada, N., Ohata, J., Kitada, S., Reed, J.C., Zvaifler, N.J., and Kipps, T.J. (2005). Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1α. *Blood* 106, 1012–1020. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0889>.
173. Nobre, A.R., Risson, E., Singh, D.K., Di Martino, J.S., Cheung, J.F., Wang, J., Johnson, J., Russnes, H.G., Bravo-Cordero, J.J., Birbrair, A., et al. (2021). Bone marrow NG2+/Nestin+ mesenchymal stem cells drive DTC dormancy via TGF-β2. *Nat Cancer* 2, 327–339. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00179-8>.
174. Noh, J., Noh, G., Kim, H.S., Kim, A.-R., and Choi, W.S. (2012). Allergen-specific responses

- of CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cells (Bregs) and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell (Tregs) in immune tolerance of cow milk allergy of late eczematous reactions. *Cellular Immunology* 274, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.01.005>.
175. Noman, M.Z., and Chouaib, S. Targeting hypoxia at the forefront of anticancer immune responses. 3. .
 176. Nouël, A., Pochard, P., Simon, Q., Ségalen, I., Le Meur, Y., Pers, J.O., and Hillion, S. (2015a). B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *Journal of Autoimmunity* 59, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.02.004>.
 177. Nouël, A., Pochard, P., Simon, Q., Ségalen, I., Le Meur, Y., Pers, J.O., and Hillion, S. (2015b). B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *Journal of Autoimmunity* 59, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.02.004>.
 178. Ogawa, K., Funaba, M., and Tsujimoto, M. (2008). Suppression of NF- κ B and IRF-1-induced transcription of the murine IL-12 p40 by transforming growth factor- β Smad pathway in macrophages. *Mol Cell Biochem* 308, 9–15. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9605-4>.
 179. Olive, D., Chrétien, A.-S., Devillier, R., Rochigneux, P., Gorvel, L., and Nunès, J. (2020). Les glycosylations de PD-L1 sous les feux de la rampe. *Med Sci (Paris)* 36, 552–555. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020099>.
 180. Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., et al. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203. <https://doi.org/10.1038/nature10491>.
 181. Orabona, C., Pallotta, M.T., Volpi, C., Fallarino, F., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2008). SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20828–20833. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810278105>.
 182. Paggetti, J., Haderk, F., Seiffert, M., Janji, B., Distler, U., Ammerlaan, W., Kim, Y.J., Adam, J., Lichter, P., Solary, E., et al. (2015). Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood* 126, 1106–1117. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-618025>.
 183. Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Biccato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 12, 870–878. <https://doi.org/10.1038/ni.2077>.
 184. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 8, 1353–1362. <https://doi.org/10.1038/ni1536>.
 185. Pang, N., Alimu, X., Chen, R., Muhashi, M., Ma, J., Chen, G., Zhao, F., Wang, L., Qu, J.,

- and Ding, J. (2021). Activated Galectin-9/Tim3 promotes Treg and suppresses Th1 effector function in chronic lymphocytic leukemia. *The FASEB Journal* 35. <https://doi.org/10.1096/fj.202100013R>.
186. Parry, H.M., Stevens, T., Oldreive, C., Zadran, B., McSkeane, T., Rudzki, Z., Paneesha, S., Chadwick, C., Stankovic, T., Pratt, G., et al. (2016). NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma. *Oncotarget* 7, 68513–68526. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12097>.
 187. Pereira, L., Igea, A., Canovas, B., Dolado, I., and Nebreda, A.R. (2013). Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. *EMBO Mol Med* 5, 1759–1774. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302732>.
 188. Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells. *Journal of Experimental Medicine* 195, 335–341. <https://doi.org/10.1084/jem.20010934>.
 189. Pletnev, S., Magracheva, E., Wlodawer, A., and Zdanov, A. (2005). A model of the ternary complex of interleukin-10 with its soluble receptors. *BMC Struct Biol* 5, 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-5-10>.
 190. Popov, A., Abdullah, Z., Wickenhauser, C., Saric, T., Driesen, J., Hanisch, F.-G., Domann, E., Raven, E.L., Dehus, O., Hermann, C., et al. (2006). Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J. Clin. Invest.* 116, 3160–3170. <https://doi.org/10.1172/JCI28996>.
 191. Portier, M., Zhang, X., Caron, E., Lu, Z., Bataille, R., and Klein, B. (1993). gamma-Interferon in multiple myeloma: inhibition of interleukin-6 (IL-6)-dependent myeloma cell growth and downregulation of IL-6-receptor expression in vitro. *Blood* 81, 3076–3082. <https://doi.org/10.1182/blood.V81.11.3076.3076>.
 192. Premkumar, K., and Shankar, B.S. (2021). TGF- β R inhibitor SB431542 restores immune suppression induced by regulatory B-T cell axis and decreases tumour burden in murine fibrosarcoma. *Cancer Immunol Immunother* 70, 153–168. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02666-w>.
 193. Puccetti, P. (2007). On watching the watchers: IDO and type I/II IFN. *Eur. J. Immunol.* 37, 876–879. <https://doi.org/10.1002/eji.200737184>.
 194. Puiggros, A., Delgado, J., Rodriguez-Vicente, A., Collado, R., Aventín, A., Luño, E., Grau, J., Hernandez, J.Á., Marugán, I., Ardanaz, M., et al. (2013). Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *Br J Haematol* 163, 47–54. <https://doi.org/10.1111/bjh.12479>.
 195. Puzzolo, M.C., Del Giudice, I., Peragine, N., Mariglia, P., De Propriis, M.S., Cappelli, L.V., Trentin, L., Reda, G., Cuneo, A., Molica, S., et al. (2021). TH2/TH1 Shift Under Ibrutinib Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front. Oncol.* 11, 637186. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.637186>.
 196. Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor

- progression and metastasis. *Nat Med* 19, 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
197. Ricciuti, B., Leonardi, G.C., Puccetti, P., Fallarino, F., Bianconi, V., Sahebkar, A., Baglivo, S., Chiari, R., and Pirro, M. (2019). Targeting indoleamine-2,3-dioxygenase in cancer: Scientific rationale and clinical evidence. *Pharmacology & Therapeutics* 196, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.12.004>.
 198. Richard, D.M., Dawes, M.A., Mathias, C.W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N., and Dougherty, D.M. (2009). L -Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res* 2, IJTR.S2129. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S2129>.
 199. Riches, J.C., Davies, J.K., McClanahan, F., Fatah, R., Iqbal, S., Agrawal, S., Ramsay, A.G., and Gribben, J.G. (2013). T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 121, 1612–1621. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457531>.
 200. Robinson, C.M., Shirey, K.A., and Carlin, J.M. (2003). Synergistic Transcriptional Activation of Indoleamine Dioxygenase by IFN- γ and Tumor Necrosis Factor- α . *Journal of Interferon & Cytokine Research* 23, 413–421. <https://doi.org/10.1089/107999003322277829>.
 201. Robinson, C.M., Hale, P.T., and Carlin, J.M. (2005). The Role of IFN- γ and TNF- α -Responsive Regulatory Elements in the Synergistic Induction of Indoleamine Dioxygenase. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 25, 20–30. <https://doi.org/10.1089/jir.2005.25.20>.
 202. Robinson, M., Turnbull, S., Lee, B.Y., and Leonenko, Z. (2020). The effects of melatonin, serotonin, tryptophan and NAS on the biophysical properties of DPPC monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862, 183363. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183363>.
 203. Romano, S., Mallardo, M., Chiurazzi, F., Bisogni, R., D'Angelillo, A., Liuzzi, R., Compare, G., and Romano, M.F. (2008). The effect of FK506 on transforming growth factor signaling and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica* 93, 1039–1048. <https://doi.org/10.3324/haematol.12402>.
 204. Rosenquist, R., Cortese, D., Bhoi, S., Mansouri, L., and Gunnarsson, R. (2013). Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leukemia & Lymphoma* 54, 2351–2364. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.783913>.
 205. Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Brusca, A., Monti, S., Ciardullo, C., Deambrogi, C., Khiabani, H., Serra, R., Bertoni, F., et al. (2013). Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121, 1403–1412. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-458265>.
 206. Rossi, D., Spina, V., and Gaidano, G. (2018). Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood* 131, 2761–2772. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-791376>.
 207. Salazar, F., Awuah, D., Negm, O.H., Shakib, F., and Ghaemmaghami, A.M. (2017). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase-aryl hydrocarbon receptor pathway in the TLR4-

- induced tolerogenic phenotype in human DCs. *Sci Rep* 7, 43337. <https://doi.org/10.1038/srep43337>.
208. Saulep-Easton, D., Vincent, F.B., Quah, P.S., Wei, A., Ting, S.B., Croce, C.M., Tam, C., and Mackay, F. (2016). The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. *Leukemia* 30, 163–172. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.174>.
209. Sauvaget, A., Guitteny, M., Bukowski, N., Duffieux, V., Mezouari, A., Brisson, A., Raveneau, C., Gohier, B., and Bulteau, S. (2021). Les traitements de la dépression en psychiatrie de liaison : de la théorie à la pratique. *La Revue de Médecine Interne* 42, 694–706. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2021.06.012>.
210. Savitsky, D., Tamura, T., Yanai, H., and Taniguchi, T. (2010). Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol Immunother* 59, 489–510. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0804-6>.
211. Schmidl, C., Delacher, M., Huehn, J., and Feuerer, M. (2018). Epigenetic mechanisms regulating T-cell responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 142, 728–743. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.014>.
212. Schmitt, E.G., and Williams, C.B. (2013). Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00152>.
213. Schomer-Miller, B., Higashimoto, T., Lee, Y.-K., and Zandi, E. (2006). Regulation of I κ B Kinase (IKK) Complex by IKK γ -dependent Phosphorylation of the T-loop and C Terminus of IKK β . *Journal of Biological Chemistry* 281, 15268–15276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513793200>.
214. Schoppmann, S.F., Birner, P., Stöckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., and Kerjaschki, D. (2002). Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. *The American Journal of Pathology* 161, 947–956. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64255-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64255-1).
215. Schramme, F., Crosignani, S., Frederix, K., Hoffmann, D., Pilotte, L., Stroobant, V., Preillon, J., Driessens, G., and Van den Eynde, B.J. (2020). Inhibition of Tryptophan-Dioxygenase Activity Increases the Antitumor Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Immunology Research* 8, 32–45. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0041>.
216. Schwarcz, R., and Stone, T.W. (2017). The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology* 112, 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.003>.
217. Schwartz, J.L., Shajahan, A.N., and Clarke, R. (2011). The Role of Interferon Regulatory Factor-1 (IRF1) in Overcoming Antiestrogen Resistance in the Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Breast Cancer* 2011, 1–9. <https://doi.org/10.4061/2011/912102>.
218. Seliger, B., Ritz, U., and Abele, R. Immune Escape of Melanoma : First Evidence of Structural Alterations in Two Distinct Components of the MHC Class I Antigen Processing Pathway. 6. .
219. Seymour, R.L., Ganapathy, V., Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2006). A high-affinity, tryptophan-selective amino acid transport system in human macrophages. *Journal of*

- Leukocyte Biology 80, 1320–1327. <https://doi.org/10.1189/jlb.1205727>.
220. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *410*, 5. .
221. Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R., and Freeman, G.J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8, 239–245. <https://doi.org/10.1038/ni1443>.
222. Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 507, 366–370. <https://doi.org/10.1038/nature12979>.
223. Shirey, K.A., Jung, J.-Y., Maeder, G.S., and Carlin, J.M. (2006). Upregulation of IFN- γ Receptor Expression by Proinflammatory Cytokines Influences IDO Activation in Epithelial Cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 26, 53–62. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.26.53>.
224. Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H.T., Qureshi, S.A., Cowburn, D., and Darnell, J.E. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821–828. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90357-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90357-3).
225. Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015: Cancer Statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65, 5–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>.
226. Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2, 293–299. <https://doi.org/10.1038/86297>.
227. Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. In *Advances in Immunology*, (Elsevier), pp. 1–50.
228. Soilleux, E.J., Wotherspoon, A., Eyre, T.A., Clifford, R., Cabes, M., and Schuh, A.H. (2016). Diagnostic dilemmas of high-grade transformation (Richter's syndrome) of chronic lymphocytic leukaemia: results of the phase II National Cancer Research Institute CHOP-OR clinical trial specialist haemato-pathology central review. *Histopathology* 69, 1066–1076. <https://doi.org/10.1111/his.13024>.
229. Stilgenbauer, S., Eichhorst, B., Schetelig, J., Coutre, S., Seymour, J.F., Munir, T., Puvvada, S.D., Wendtner, C.-M., Roberts, A.W., Jurczak, W., et al. (2016). Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology* 17, 768–778. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30019-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30019-5).
230. Street, S.E.A., Trapani, J.A., MacGregor, D., and Smyth, M.J. (2002). Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon γ . *Journal of Experimental Medicine* 196, 129–134. <https://doi.org/10.1084/jem.20020063>.
231. Stutman, O. (1974). Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in

- Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice. *Science* **183**, 534–536. <https://doi.org/10.1126/science.183.4124.534>.
232. Sugimoto, H., Oda, S., Otsuki, T., Hino, T., Yoshida, T., and Shiro, Y. (2006). Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2611–2616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508996103>.
233. Sundrud, M.S., Koralov, S.B., Feuerer, M., Calado, D.P., Kozhaya, A.E., Rhule-Smith, A., Lefebvre, R.E., Unutmaz, D., Mazitschek, R., Waldner, H., et al. (2009). Halofuginone Inhibits T_H 17 Cell Differentiation by Activating the Amino Acid Starvation Response. *Science* **324**, 1334–1338. <https://doi.org/10.1126/science.1172638>.
234. Sutavani, R.V., Phair, I.R., Barker, R., McFarlane, A., Shpiro, N., Lang, S., Woodland, A., and Arthur, J.S.C. (2018). Differential control of Toll-like receptor 4–induced interleukin-10 induction in macrophages and B cells reveals a role for p90 ribosomal S6 kinases. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 2302–2317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805424>.
235. Suzuki, T., Yokouchi, K., Kawamichi, H., Yamamoto, Y., Uda, K., and Yuasa, H.J. (2003). Comparison of the sequences of Turboand Sulculus indoleamine dioxygenase-like myoglobin genes. *Gene* **308**, 89–94. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00467-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00467-0).
236. Suzuki, Y., Suda, T., Asada, K., Miwa, S., Suzuki, M., Fujie, M., Furuhashi, K., Nakamura, Y., Inui, N., Shirai, T., et al. (2012). Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 436–442. <https://doi.org/10.1128/CVI.05402-11>.
237. Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>.
238. Takaki, H., Minoda, Y., Koga, K., Takaesu, G., Yoshimura, A., and Kobayashi, T. (2006). TGF-β1 suppresses IFN-γ-induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation. *Genes Cells* **11**, 871–882. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00988.x>.
239. Tandler, C., Schmidt, M., Heitmann, J.S., Hierold, J., Schmidt, J., Schneider, P., Dörfel, D., Walz, J., and Salih, H.R. (2020). Neutralization of B-Cell Activating Factor (BAFF) by Belimumab Reinforces Small Molecule Inhibitor Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers* **12**, 2725. <https://doi.org/10.3390/cancers12102725>.
240. Taylor, B.C., and Balko, J.M. (2022). Mechanisms of MHC-I Downregulation and Role in Immunotherapy Response. *Front. Immunol.* **13**, 844866. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.844866>.
241. Teft, W.A., Kirchhof, M.G., and Madrenas, J. (2006). A MOLECULAR PERSPECTIVE OF CTLA-4 FUNCTION. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 65–97. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090535>.
242. Terness, P., Bauer, T.M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase–

- expressing Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine* 196, 447–457. <https://doi.org/10.1084/jem.20020052>.
243. Théate, I., van Baren, N., Pilotte, L., Moulin, P., Larrieu, P., Renaud, J.-C., Hervé, C., Gutierrez-Roelens, I., Marbaix, E., Sempoux, C., et al. (2015). Extensive Profiling of the Expression of the Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Protein in Normal and Tumoral Human Tissues. *Cancer Immunology Research* 3, 161–172. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0137>.
244. Thomas, L. On Immunosurveillance in Human Cancer. 5. .
245. Tomé, D. (2021). Amino acid metabolism and signalling pathways: potential targets in the control of infection and immunity. *Eur J Clin Nutr* 75, 1319–1327. <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00943-0>.
246. Troussard, X., Mounier, M., Cornet, É., and Maynadié, M. (2021). Épidémiologie des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B. *Revue Francophone des Laboratoires* 2021, 26–31. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(21\)00139-8](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(21)00139-8).
247. Tsang, M., and Parikh, S.A. (2017). A Concise Review of Autoimmune Cytopenias in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 12, 29–38. <https://doi.org/10.1007/s11899-017-0366-1>.
248. Ueno, A., Cho, S., Cheng, L., Wang, J., Hou, S., Nakano, H., Santamaria, P., and Yang, Y. (2007). Transient Upregulation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Dendritic Cells by Human Chorionic Gonadotropin Downregulates Autoimmune Diabetes. *Diabetes* 56, 1686–1693. <https://doi.org/10.2337/db06-1727>.
249. Ulloa, L., Doody, J., and Massague, J. (1999). Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signalling by the interferon- γ /STAT pathway. 397, 4. .
250. Vadasz, Z., and Toubi, E. (2017). FoxP3 Expression in Macrophages, Cancer, and B Cells—Is It Real? *Clinic Rev Allerg Immunol* 52, 364–372. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8572-5>.
251. Vadasz, Z., Peri, R., Eiza, N., Slobodin, G., Balbir-Gurman, A., and Toubi, E. (2015a). The Expansion of CD25^{high} IL-10^{high} FoxP3^{high} B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *Journal of Immunology Research* 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/254245>.
252. Vadasz, Z., Peri, R., Eiza, N., Slobodin, G., Balbir-Gurman, A., and Toubi, E. (2015b). The Expansion of CD25^{high} IL-10^{high} FoxP3^{high} B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *Journal of Immunology Research* 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/254245>.
253. Vandewoestyne, M.L., Pede, V.C., Lambein, K.Y., Dhaenens, M.F., Offner, F.C., Praet, M.M., Philippé, J.J., Kipps, T.J., and Deforce, D.L. (2011). Laser microdissection for the assessment of the clonal relationship between chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma and proliferating B cells within lymph node pseudofollicles. *Leukemia* 25, 883–888. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.14>.
254. Varinou, L., Ramsauer, K., Karaghiosoff, M., Kolbe, T., Pfeffer, K., and Decker, T. Phosphorylation of the Stat1 Transactivation Domain Is Required for Full-Fledged IFN- γ -Dependent Innate Immunity. 10. .
255. van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Söllner, S., Akdis, D.G.,

- Rückert, B., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10–producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* *131*, 1204–1212. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.014>.
256. Vega, F., and Medeiros, L.J. (2003). Chromosomal Translocations Involved in Non-Hodgkin Lymphomas. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* *127*, 1148–1160. <https://doi.org/10.5858/2003-127-1148-CTIINL>.
257. Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., and Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* *453*, 106–109. <https://doi.org/10.1038/nature06881>.
258. Vérollet, C., Charrière, G.M., Labrousse, A., Cougoule, C., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (2011). Extracellular proteolysis in macrophage migration: Losing grip for a breakthrough. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2805–2813. <https://doi.org/10.1002/eji.201141538>.
259. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* *9*, 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>.
260. Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* *331*, 44–49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>.
261. Wang, Y., and Ding, W. Richter Transformation of Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Novel Agents. *10*. .
262. Wang, R.-X., Yu, C.-R., Dambuzza, I.M., Mahdi, R.M., Dolinska, M.B., Sergeev, Y.V., Wingfield, P.T., Kim, S.-H., and Egwuagu, C.E. (2014). Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* *20*, 633–641. <https://doi.org/10.1038/nm.3554>.
263. Wehinger, J., Gouilleux, F., Groner, B., Finke, J., Mertelsmann, R., and Maria Weber-Nordt, R. (1996). IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Letters* *394*, 365–370. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00990-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00990-8).
264. Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol* *12*, 492–499. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>.
265. Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* *15*, 486–499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>.
266. Xiao, W., Chen, W.W., Sorbara, L., Davies-Hill, T., Pittaluga, S., Raffeld, M., and Jaffe, E.S. (2016). Hodgkin lymphoma variant of Richter transformation: morphology, Epstein-Barr virus status, clonality, and survival analysis—with comparison to Hodgkin-like lesion. *Human Pathology* *55*, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.04.019>.
267. Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* *28*, 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.017>.
268. Yoshida, R., Imanishi, J., Oku, T., Kishida, T., and Hayaishi, O. (1981). Induction of

- pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *78*, 129–132. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.129>.
269. Ysebaert, L., and Fournié, J.-J. (2011). Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* *52*, 1404–1406. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.568078>.
270. Yu, G., Dai, H., Chen, J., Duan, L., Gong, M., Liu, L., Xiong, P., Wang, C., Fang, M., and Gong, F. (2008). Gene delivery of indoleamine 2,3-dioxygenase prolongs cardiac allograft survival by shaping the types of T-cell responses. *J. Gene Med.* *10*, 754–761. <https://doi.org/10.1002/jgm.1201>.
271. Zenz, T., Häbe, S., Denzel, T., Mohr, J., Winkler, D., Bühler, A., Sarno, A., Groner, S., Mertens, D., Busch, R., et al. (2009). Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* *114*, 2589–2597. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-224071>.
272. Zhang, Y., Kang, S.A., Mukherjee, T., Bale, S., Crane, B.R., Begley, T.P., and Ealick, S.E. (2007). Crystal Structure and Mechanism of Tryptophan 2,3-Dioxygenase, a Heme Enzyme Involved in Tryptophan Catabolism and in Quinolate Biosynthesis. *Biochemistry* *46*, 145–155. <https://doi.org/10.1021/bi0620095>.
273. Zheng, Z., Liu, T., Li, X., Ding, J., Feng, Y., Miao, J., Luo, X., Wu, Z., and Zhu, P. (2015). Kinetic changes of regulatory B10 cells in collagen-induced arthritis could be regulated by cytokines IFN- γ and TGF- β 1. *Inflamm. Res.* *64*, 637–645. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0846-5>.
274. Zhu, W.-H., Lu, C.-Z., Huang, Y.-M., Link, H., and Xiao, B.-G. (2007). A putative mechanism on remission of multiple sclerosis during pregnancy: estrogen-induced indoleamine 2,3-dioxygenase by dendritic cells. *Mult Scler* *13*, 33–40. <https://doi.org/10.1177/1352458506071171>.
275. Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* *6*, 715–727. <https://doi.org/10.1038/nri1936>.
276. ZAABOUB, R. et al. Nurse-like cells sequester B cells in chronic lymphocytic leukemia disorganized lymph nodes via an alternative production of CCL21. *Blood Advances*, [s. l.], 2022. DOI 10.1182/bloodadvances.2021006169.

Résumé :

La leucémie lymphoïde chronique est une expansion clonale de lymphocytes B matures. Son évolution clinique hétérogène dépend de sous-populations leucémiques échappant à la surveillance antitumorale. Ces cellules dotées de propriétés régulatrices ont fait l'objet de travaux antérieurs du laboratoire mettant en évidence l'existence de sous-populations lymphocytaires produisant de l'IL-10, du TGFβ1 et Foxp3. Mon projet de thèse a consisté à poursuivre cette caractérisation et attribuer un rôle fonctionnel à ces sous-populations. Par une approche de blocage des cytokines, les résultats indiquent le rôle critique du TGFβ1 dans le développement et la maintenance des populations Tregs sans affecter le compartiment des lymphocytes Th1 effecteurs dont le rôle est attribué à l'IL-10. Outre ces facteurs régulateurs, mon second objectif a été de caractériser dans les lymphocytes B une enzyme immunorégulatrice "IDO" exprimée de façon constitutive ou inductible par un mécanisme inflammatoire dépendant de l'IFNγ. Cette enzyme métaboliquement active est capable de métaboliser le tryptophane en kynurénine en présence de l'IFNγ mais son induction est inhibée par le TGFβ1 ce qui suggère des mécanismes régulateurs compétitifs. L'ensemble de ces données souligne l'importance des sous-populations régulatrices dans la progression de la LLC et apporte de nouveaux éléments sur les mécanismes d'action des facteurs régulateurs.

Mots clés : Leucémie lymphoïde chronique, microenvironnement tumoral, hétérogénéité fonctionnelle, facteurs immunorégulateurs, surveillance anti-tumorale

Abstract :

Chronic lymphocytic leukemia is a clonal expansion of mature B lymphocytes. Its heterogeneous clinical course depends on leukemia subpopulations escaping antitumor survey. These cells endowed with regulatory properties have been the subject of previous laboratory work highlighting the existence of lymphocyte subpopulations producing IL-10, TGFβ1 and Foxp3. My thesis project consisted in pursuing this characterization and assigning a functional role to these subpopulations. Using a cytokine blockade approach, the results indicate the critical role of TGFβ1 in the development and maintenance of Treg populations without affecting the effector Th1 cell compartment whose role is attributed to IL-10. In addition to these regulatory factors, my second objective was to characterize in B lymphocytes an immunoregulatory enzyme "IDO" expressed constitutively and inducibly by an IFNγ-dependent inflammatory mechanism. This metabolically active enzyme was able to metabolize tryptophan to kynurenine in the presence of IFNγ but its induction was inhibited by TGFβ1 suggesting underlying regulatory mechanisms. All of these data highlight the importance of regulatory subpopulations in the progression of CLL and provide new insights on the mechanisms of action of regulatory factors.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia, tumor microenvironment, functional heterogeneity, immunoregulatory factors, anti-tumor survey