



UFR de SANTE, MEDECINE et BIOLOGIE HUMAINE

École doctorale Sciences, Technologies, Santé – Galilée

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

***Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle
des sous-populations immuno-régulatrices impliquées
dans la progression de la leucémie lymphoïde Chronique***

Laboratoire INSERM U978 – Université Sorbonne Paris Nord
« Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B »
Présentée et soutenue publiquement le 24 octobre 2024

Par Feriel Anissa Kanoun

Devant le jury d'examen constitué de :

Pr. Natacha BESSIS	Présidente du jury
Pr. Mary Callanan	Rapporteur
Dr. Romain Roncagalli	Rapporteur
Dr. Santos A. Susin	Examineur
Dr. Denis Lesage	Co-Directeur de thèse
Dr. Christine Le Roy	Directrice de thèse

Résumé : La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne incurable. Elle se caractérise par une hétérogénéité clinique et biologique qui complique son pronostic chez les patients. Les outils prédictifs commencent à intégrer la diversité fonctionnelle des cellules B leucémiques, en explorant le dialogue qu'elles établissent avec les cellules environnantes. En effet, les cellules B malignes subvertissent les fonctions intrinsèques physiologiques des cellules du microenvironnement pour favoriser leur propre survie et échapper à la surveillance antitumorale. Dans ce contexte, nos travaux publiés ont identifié des sous-populations de cellules B leucémiques régulatrices qui expriment des facteurs immunorégulateurs clés tels que l'IL-10, le TGFβ1 et FOXP3. Une combinaison des taux d'expression de ces trois facteurs est liée à la proportion de cellules T régulatrices et est corrélée à la progression de la maladie. En plus de préciser la signature des cellules B régulatrices dans la LLC, nos travaux indiquent que les niveaux d'expression du CD5 seraient liés à leurs propriétés régulatrices. Mon travail de thèse montre également que la distinction en deux sous-populations CD5^{High} et CD5^{low} des cellules B leucémiques est associée à des programmes transcriptomiques spécifiques, à l'expression différentielle de marqueurs d'activation et de migration, et à des réponses cellulaires différentielles suite à une stimulation du BCR en termes de survie et de profils cytokiniques. De plus, l'hétérogénéité d'expression du CD5 membranaire des cellules B de LLC semble être liée à la progression de la maladie. L'ensemble de mes résultats contribue à mieux comprendre la physiopathologie de la LLC et à affiner les approches de stratification des patients.

Mots clés : Lymphocytes B de LLC, Échappement tumoral, Facteurs immunorégulateurs, Hétérogénéité du CD5, Survie cellulaire.

Abstract : Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a hematological malignancy that remains incurable. It is characterized by clinical and biological heterogeneity, which presents a challenge in prognosticating the outcome for patients. The advent of predictive tools has enabled the consideration of the functional diversity of leukemic B cells through their interactions with surrounding cells. Indeed, malignant B cells subvert the intrinsic physiological functions of cells in the microenvironment, thereby promoting their survival and evading antitumor surveillance. In this context, our published work has identified subpopulations of regulatory leukemic B cells expressing key immunoregulatory factors such as IL-10, TGFβ1, and FOXP3. A combination of the expression levels of these three factors is associated with the proportion of regulatory T cells and correlates with disease progression. Furthermore, our findings indicate that CD5 expression levels may be linked to the regulatory properties of the CLL B cells. To test this hypothesis, my thesis work demonstrates that the distinction into two CD5^{High} and CD5^{low} subpopulations of leukemic B cells is associated with specific transcriptomic programs, differential expression of activation and migration markers, and different cellular responses upon BCR stimulation in terms of survival and cytokine profiles. Moreover, the heterogeneity of CD5 expression in CLL B cells appears to be associated with disease progression. Collectively, my findings contribute to a more comprehensive understanding of the pathophysiology of CLL and refine approaches for patient stratification.

Keywords: CLL B lymphocytes, Tumor escape, Immunoregulatory factors, CD5 heterogeneity, Cell survival.

Remerciements :

A Madame la Professeure **Natacha BESSIS**, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de présider cette thèse de science. Soyez assurée de toute ma reconnaissance et mon respect.

A Madame la Professeure **Mary Callanan**, recevez mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur et d'y apporter un nouveau regard critique. Je vous adresse tout mon respect.

A Monsieur le Docteur **Romain Roncagalli**, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Soyez assuré de toute ma considération et mon respect.

A Monsieur le Docteur **Santos A. Susin**, merci d'avoir m'avoir accepté de siéger au sein de mon jury de thèse pour examiner ce travail et l'enrichir par vos suggestions. Vous avez toute ma gratitude et mon respect.

La réalisation de ce mémoire de thèse a été possible grâce au concours de plusieurs personnes que je voudrais remercier chaleureusement. Qu'elles trouvent dans ce travail, le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Au **Dr. Nadine Varin-Blank**, Directrice de l'UMR-U978, merci pour ton accueil bienveillant en 2020, malgré des conditions « exceptionnelles ». Tu as depuis, toujours répondu présente, en dépit de tes nombreuses obligations. Chaque discussion avec toi a été une source précieuse d'enrichissement scientifique, et aucune n'a manqué de déboucher sur de nouvelles idées ou des questionnements stimulants. La confiance que tu m'as accordée, la liberté que tu m'as offerte, ton ouverture d'esprit aux échanges et tes suggestions innovantes ont rendu cette expérience de thèse particulièrement agréable. Pour tout cela, un immense merci.

Au **Dr. Denis Lesage**, Co-Directeur de thèse, merci pour ton accompagnement, ton soutien et ta gentillesse. Ta confiance m'a permis d'exercer en toute autonomie et de progresser avec assurance. Merci également de m'avoir fait découvrir l'enrichissante expérience de l'enseignement, dont je garde d'excellents souvenirs.

Au **Dr. Christine Le Roy**, Directrice de thèse, merci pour ton encadrement attentif, ta confiance en moi, ta disponibilité et ton soutien déterminant. Tu m'as appris qu'une démarche expérimentale rigoureuse ne pouvait s'envisager sans encombre, tu m'as aussi appris à faire face à ces « aléas » et à agir en circonstance. Tu m'as prodigué de précieux conseils scientifiques et pratiques et alimenté ma réflexion en partageant généreusement, avec moi, ton expérience. Ton enseignement — « Aller jusqu'au bout du raisonnement, jusqu'au bout de l'expérience, jusqu'au bout de l'analyse » a cultivé en moi une persévérance, une volonté et une ténacité que je ne soupçonnais pas. Un grand merci pour cet encadrement des plus formateurs.

Je tiens particulièrement à exprimer mes remerciements les plus sincères au Dr. Mélanie Lambert et au Dr. Claudine Irlès pour leur bienveillance exemplaire et leur soutien constant tout au long de ce parcours :

Mélanie Lambert, ton aide, tant scientifique que pratique, a été déterminante. J'ai énormément appris à tes côtés, et ta confiance en moi, ainsi que tes conseils avisés et tes suggestions, m'ont permis de progresser avec assurance et sérénité. Ton regard neuf sur mon travail a véritablement apporté un second souffle à mes recherches. Merci pour la bienveillance, l'encouragement et la positivité dont tu as fait preuve. Sois assurée de ma profonde gratitude.

Claudine Irles, ton engagement sans faille, ainsi que ton aide scientifique et analytique, ont été essentiels dans l'aboutissement de cette thèse. Tes conseils et tes suggestions ont grandement enrichi ce travail. Je te remercie également pour ta gentillesse, tes encouragements et ton optimisme, qui ont rendu cette expérience plus positive. Je t'exprime ici toute ma reconnaissance.

J'étends mes remerciements à toute l'équipe U978 qui m'a immédiatement intégrée. Chacun de ses membres a contribué à sa manière, à mon épanouissement en partageant avec générosité et pédagogie son expérience et son savoir. Merci pour votre investissement, votre esprit d'entraide, votre patience et votre bonne humeur, qui ont incontestablement égayé cette expérience.

La réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention consciente des cliniciens Prs. **F. Cymbalista** et **V. Lévy**. Merci d'avoir contribué à mettre en place l'interface entre recherche fondamentale et appliquée. Merci aux patients prélevés pour leur participation galvanisante. Nous leur souhaitons courage et résilience dans leur parcours.

À mes parents. Aucun mot ne saurait fidèlement exprimer toute ma gratitude pour leur soutien inébranlable. Je salue ici, leur détermination et leur sens de l'abnégation. Maman, Papa, j'espère que l'aboutissement de ce travail pourra, ne serait-ce qu'en partie, témoigner de vos efforts, bien qu'il ne puisse jamais en rendre toute la mesure.

À **Yasmina Zenati** et **Mokrane Boussaïd**, pour leur accueil chaleureux et réconfortant en 2019, leur appui constant et leur soutien indéfectible tout au long de cette expérience. J'espère que l'aboutissement de ce travail reflétera pleinement la générosité et l'engagement bienveillant que vous avez toujours manifestés.

Enfin, mes vifs remerciements vont,

À ma sœur **Lydia Kanoun** et mon beau-frère **Moncef Barbari**, pour leur appui déterminant et indéfectible, leur accueil bienveillant et réconfortant. Merci d'avoir insufflé sérénité et équilibre dans mon quotidien. La portée de votre soutien échappe aux mots, mais sachez que je vous resterai à jamais reconnaissante.

J'étends mes remerciements à chacun des membres de ma famille et amis pour leurs soutiens, leurs aides, leurs encouragements et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Qu'ils y trouvent l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

Table des matières :

INTRODUCTION	1
1 L'INFLAMMATION	1
1.1 GENERALITES	1
1.2 LES ACTEURS CELLULAIRES	2
1.2.1 LES LYMPHOCYTES T	2
1.2.2 LES LYMPHOCYTES B	7
1.2.2.1 Les lymphocytes B2 producteurs d'immunoglobulines	12
1.2.2.2 Les Lymphocytes B1 et le CD5	14
1.2.2.3 Les lymphocytes B régulateurs	24
1.2.2.3.1 Phénotypes des lymphocytes B régulateurs	26
1.2.2.3.1.1 Les cellules B productrices d'IL-10	27
1.2.2.3.1.2 Les cellules B productrices de TGF- β	28
1.2.2.3.1.3 Les cellules B exprimant le facteur de transcription FOXP3	28
2 INFLAMMATION ET TUMORIGENESE	35
2.1 LES ACTEURS CELLULAIRES DE L'INFLAMMATION SOUS-TENDANT LA TUMORIGENESE	35
2.1.1 LA PHYSIOPATHOLOGIE DES CELLULES B CD5+	37
2.1.1.1 Dans les maladies auto-immunes	37
2.1.1.2 Dans les cancers	39
2.1.2 LA PHYSIOPATHOLOGIE DES LYMPHOCYTES B REGULATEURS	41
2.1.2.1 Dans les maladies auto-immunes	41
2.1.2.2 Dans les cancers	45
3 APPLICATION AU MODELE PATHOLOGIQUE DE LA LLC	48
3.1 GENERALITES	48
3.2 LA SIGNALISATION DU BCR	51
3.3 ORIGINE CELLULAIRE DE LA LLC	54
3.3.1 ORIGINE A PARTIR DE CELLULES B MATURES	54
3.3.2 ORIGINE A PARTIR DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES	55
3.4 ACTIVATION ET TRAFIC DES CELLULES B MALIGNES	56
3.4.1 CHOIX ENTRE LA PROLIFERATION ET L'APOPTOSE SUITE A LA STIMULATION DU BCR	59
3.4.2 TOLERANCE DES CELLULES B LEUCEMIQUES	60
3.5 L'IMMUNO-REGULATION DANS LA LLC	61
OBJECTIFS	66
RESULTATS	67

DISCUSSION GENERALE	131
LES CELLULES B MALIGNES IMMUNO-REGULATRICES CONTRIBUENT A LA PROGRESSION DE LA LLC	131
LES CELLULES B LLC ET LES AUTRES CELLULES IMMUNITAIRES	131
LES FACTEURS IMMUNOREGULATEURS	132
L'IL-10	132
FOXP3	133
Les facteurs immunomodulateurs et la progression de la LLC	134
LE PHENOTYPE DES CELLULES REGULATRICES DE LLC	134
LES PROFILS D'EXPRESSION DU CD5 MODULENT LA REPONSE CELLULAIRE	134
LES NIVEAUX D'EXPRESSION DU CD5 REGULENT LA SIGNALISATION DU BCR	135
LES NIVEAUX D'EXPRESSION DU CD5 AU CŒUR DES MODELES DE CINETIQUE DES CELLULES LEUCEMIQUES	137
LES NIVEAUX D'EXPRESSION DU CD5 INFLUENCENT LA SURVIE DES CELLULES B MALIGNES	139
LES NIVEAUX D'EXPRESSION DU CD5 MODULENT LE SECRETOME DES CELLULES B LEUCEMIQUES	140
LA DYNAMIQUE D'EXPRESSION DU CD5 DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA LLC	141
CONCLUSIONS	143
BIBLIOGRAPHIE	144
ANNEXE	167

Table des Illustrations :

Figure 1 : Les acteurs cellulaires et moléculaires de l'inflammation

Figure 2 : Aperçu du développement des thymocytes

Figure 3 : Les signaux extracellulaires régulant la différenciation des cellules Th CD4+

Figure 4 : Modèle du développement des lymphocytes B et des changements dynamiques des réseaux de gènes qui sont impliqués

Figure 5 : Vue d'ensemble des mécanismes de mutations hypersomatiques

Figure 6 : Représentation schématique du BCR montrant l'emplacement génomique de la région IGH

Figure 7 : Modèle du développement classique versus alternatif des cellules B

Figure 8 : Distribution des cellules B1 dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes de la souris

Figure 9 : Identification des cellules B1 présumées dans les tissus humains prénataux par séquençage RNA/BCR à cellule unique

Figure 10 : Structure génique et protéique du récepteur humain CD5

Figure 11 : Diagramme de Venn montrant le chevauchement des gènes différentiellement exprimés (DEGs) à la hausse en comparant les cellules Breg avec les cellules non-Breg dans différents organes

Figure 12 : Organisation structurale des sous-familles FOXO, FOXM, FOXA, FOXC et FOXP

Figure 13 : Motifs et domaines présents dans la séquence d'acides aminés de la protéine Foxp3

Figure 14 : Représentation schématique de FOXP3 avec ses exons et ses domaines protéiques

Figure 15 : Les voies de signalisation inflammatoire impliquées dans le développement du cancer

Figure 16 : Rôle des Bregs dans la pathogenèse des affections auto-immunes cutanées

Figure 17 : Rôle des Bregs dans la suppression des réponses anti-tumorales

Figure 18 : Signaux actifs et toniques transmis par les BCRs dans les cellules B de LLC

Figure 19 : La signalisation autonome dans les cellules de LLC

Figure 20 : Modèle hypothétique de la cinétique des cellules leucémiques dans la LLC

Figure 21 : Les cellules du microenvironnement accélèrent l'évasion immunitaire

Table 1 : Caractéristiques des propriétés de la protéine Foxp3 et de ses isoformes

Table 2 : Le degré d'identité de la séquence d'acides aminés de la protéine Foxp3 et de ses isoformes

Table 3 : Critères généraux d'appartenance au même sous-ensemble stéréotypé des BCR dans la LLC

Liste des abréviations :

ADN REV : ADN Reverse transcriptase

Aicda : Activation-induced cytidine deaminase

APE2 : AP Endonuclease 2

ARCH : Age-Related Clonal Hematopoiesis

ASC : Antibody-Secreting Cell

Bach2 : BTB and CNC homology 2

BAFF : B-cell Activating factor of the TNF Family

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BCR : B Cell Receptor

BER : Base Excision Repair

BLIMP1 : B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1

BST2 : Bone marrow Stromal Antigen 1

BTK : Bruton's Tyrosine Kinase

CAF : Cancer-Associated Fibroblasts

CCL5 : C-C Motif Chemokine Ligand 5

CCR : Cancer colorectal

CCR7 : C-C Chemokine Receptor type 7

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CIA : Collagen-Induced Arthritis

CL1 : T-cell Leukemia/Lymphoma 1

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSR : Class Switch Recombination

cTEC : Cortical Thymic Epithelial Cells

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

CXCL12 : C-X-C motif chemokine ligand 12

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

DAS28 : Disease Activity Score 28

DC : Dendritic Cells

dCMP : 2'-Désoxycytidine Monophosphate

DLBCL : Diffuse Large B-Cell Lymphoma

DT1 : Diabète de Type 1

DZ : Dark Zone

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

EBF1 : Early B-cell Factor 1

ELP : Early Lymphoid Progenitor cell

ERK2 : Extracellular Signal-Regulated Kinase 2

EVs : Extracellular Vesicles

FALC : Fat-Associated Lymphoid Clusters

FcγR : Récepteur Fc gamma

FDC : Follicular Dendritic Cells

FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

Flt-3 : Fms-related tyrosine kinase 3

FOB : Follicular B cells

Foxp3 : Forkhead box P3

FR : Framework Region

FT : Facteur de Transcription

GC : Germinal Center

Gfi1 : Growth factor independence 1

GLUT1 : Glucose Transporter Type 1

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HAT : Histone AcetylTransferases

HCDR : Heavy Chain Determining Region

HEVs : High Endothelial Venules

HIF-1α : Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha

ICI : Immune Checkpoint Inhibitors

IDO : Indoleamine 2,3-Dioxygenase

Ig : Immunoglobuline

IgH : Immunoglobulin Heavy chain

IgL : Immunoglobulin Light chain

Igll1 : Immunoglobulin Lambda-Like 1

ILC2 : Innate Lymphoid Cell Type 2

IRAK-1 : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1

IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4

IRF8 : Interferon Regulatory Factor 8

LCDR : Light Chain Determining Region

LEC : Lupus Erythémateux Cutané

Les HSPC : Hematopoietic Stem and Progenitor Cells

LES : Lupus Erythémateux Systémique

LFA-1 : Lymphocyte Function-Associated Antigen 1

LH : Lymphome Hodgkinien

LL : Lèpre Lépromateuse

LMPP : Lymphoid-Primed Multipotential Progenitors

LNH-B : Lymphome Non-Hodgkinien B

LTC : Lymphocytes T Cytotoxiques

LZ : Light Zone

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MBL : Monoclonal B Cell Lymphocytosis

MC : Mixed Cryoglobulinemia

M-CLL : Mutated Chronic Lymphocytic Leukemia

MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cell

MEL : Microenvironnement Leucémique

MMP : Multipotent Progenitor cells

MMR : Molecular Match Repair

mTEC : Medullary Thymic Epithelial Cells

mTOR : Mechanistic Target of Rapamycin

mTORC1 : Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1

mTORC2 : Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2

MyD88 : Myeloid Differentiation Primary Response 88

MZB : Marginal Zone B cells

NF- κ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NGS : Next-Generation Sequencing

NLC : Nurse-Like Cells

NOS2 : Nitric Oxide Synthase 2

OL-II : Organes Lymphoïdes Secondaires

PAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma

PASI : Psoriasis Area and Severity Index

Pax5 : Paired box gene 5

PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PDCs : Plasmacytoid Dendritic Cells

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1

PFS : Progression-Free Survival

PHOSOX : Phosphorylation Oxydative

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PIB : PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), Ionomycin, Brefeldin A

PLC : Précurseurs Lymphoïdes Communs

PMNs : Polynucléaires Neutrophiles

Pol η : DNA Polymerase eta

PPAR α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

PS : Phosphatidylsérines

pSS : Primary Sjögren's Syndrome

PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog

PU.1 : Purine box factor 1

RAG1/2 : Recombination Activating Genes 1 and 2

ROS : Reactive Oxygen Species

RUNX : Runt-related transcription factor

RyR2 : Ryanodine Receptor 2

SCF : Stem Cell Factor

SEP : Sclérose En Plaques

SEP-RR : Sclérose En Plaques Récurrente-Rémittente

SHM : Somatic Hypermutation

SHP-1 : Src Homology 2 Domain-containing Phosphatase-1

slgM : Secreted Immunoglobulin M

SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

STAT5 : Signal Transducer and Activator of Transcription 5

T2-MZP : T2-Marginal Zone Precursor

TABs : Tumor-Associated B cells

TACI : Transmembrane Activator and CAML Interactor

TAM : Tumor-Associated Macrophages

TCR : T-cell Receptor

TdT : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

Tfh : T follicular Helper cells

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TLR : Toll-Like Receptor

TME : Tumor Microenvironment

TRPC1 : Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 1

TSP : Thymic Seeding Progenitors

TTT : Time To Therapy

U-CLL : Unmutated Chronic Lymphocytic Leukemia

VHC : Virus de l'Hépatite C

Vpreb1 : V-pre-B cell leukemia 1

INTRODUCTION

1 L'Inflammation

1.1 Généralités

“Inflammation in itself is not to be considered as a disease but as a salutary operation consequent to some violence or some disease.” - John Hunter (1794). Cette observation souligne que la résultante normale d'un programme inflammatoire aigu consiste en la résolution et la réparation « réussies » des lésions tissulaires plutôt qu'en la persistance de la réponse inflammatoire.

Cette réponse inflammatoire est traditionnellement caractérisée par ces quatre termes latins : *Calor* (chaleur), *Dolor* (douleur), *Rubor* (rougeur) et *Tumor* (gonflement). Chacune de ces manifestations résulte de l'impact des cellules effectrices et de leurs médiateurs inflammatoires sur les vaisseaux sanguins locaux.

Lors de l'inflammation aiguë survient ce que l'on appelle « l'activation endothéliale », au cours de laquelle l'endothélium modifie son phénotype en régulant son tonus vasomoteur, son hémostasie, sa perméabilité ainsi que ses propriétés adhésives ce qui entraîne une augmentation du flux sanguin local et de l'afflux des leucocytes vers le site inflammatoire expliquant ainsi la chaleur, la rougeur et le gonflement (Figure 1).

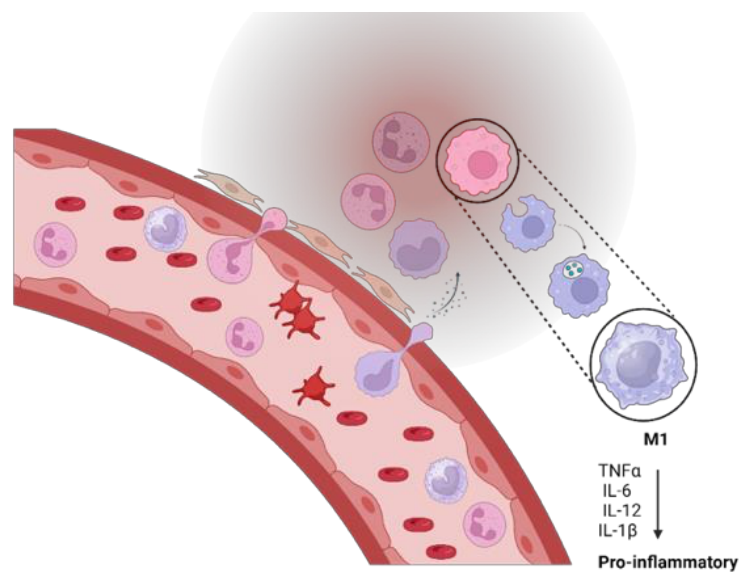


Figure 1 : Les acteurs cellulaires et moléculaires de l'inflammation. Les cytokines pro-inflammatoires activent le facteur nucléaire kappa B (NF-κB), qui à son tour augmente l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs). Les changements hémodynamiques et l'expression des molécules d'adhésion de la matrice extracellulaire (E-CAMs) facilitent le recrutement des leucocytes vers les tissus extravasculaires. Les monocytes se différencient en macrophages de type M1, qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires. (Figure réalisée avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)) et adaptée de (Alfaro et al. 2022).

S'en suit, la sensation de douleur provoquée par l'adhérence des leucocytes circulants, aux cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux sanguins et à leur migration extravasculaire dépendante des chimiokines. Les premiers leucocytes à être recrutés sur le site inflammatoire sont les polynucléaires neutrophiles (PMNs). Ces derniers éliminent par phagocytose une grande partie des agents pathogènes présents sur le site avant de subir un processus d'apoptose et d'être ingérés par les macrophages (Figure 1).

Les macrophages, ainsi que les cellules dendritiques, ayant ingéré le pathogène migrent par l'intermédiaire de la lymphe vers les ganglions lymphatiques locaux. Ils y présentent les antigènes et activent les lymphocytes naïfs circulants du sang vers le tissu ganglionnaire. Ce phénomène est médié par les lymphocytes qui expriment à leur surface le CCR7, un récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21, et qui adhèrent aux HEVs (High Endothelial Venules) des vaisseaux sanguins postcapillaires qui elles expriment le ligand du CCR7. Cette liaison permet la transmigration des lymphocytes depuis le sang vers les ganglions lymphatiques, drainant ainsi le site inflammatoire. Une réponse immunitaire adaptative est alors enclenchée.

1.2 Les acteurs cellulaires

1.2.1 Les lymphocytes T

Le développement des lymphocytes T commence dans le thymus avec les progéniteurs hématopoïétiques qui migrent depuis la moelle osseuse vers le thymus, où ils prolifèrent, se différencient et subissent des processus de sélection qui leur permettent de devenir des cellules T matures (Palmer 2003).

Le thymus est composé de deux lobes subdivisés en deux lobules. La partie externe est le cortex et contient les thymocytes immatures, alors que la partie interne représente la médulla et est enrichie en thymocytes plus matures. Les thymocytes « immatures » pénètrent le thymus par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins situés au niveau de la jonction cortico-médullaire. À ce stade, ils n'expriment ni le CD4, ni le CD8, qui sont des marqueurs associés aux cellules T matures, et sont également négatifs pour l'expression du TCR. Ils sont appelés les cellules doublement négatives (DN). Cette phase DN peut être divisée en quatre sous-ensembles de thymocytes différenciés de DN1 à DN4, en fonction de l'expression des CD44 et CD25 (Bystrom et al. 2022; DeMaio et al. 2022) : DN1 (CD44⁺ CD25⁻), DN2 (CD44⁺ CD25⁺), DN3 (CD44⁻ CD25⁺), et DN4 (CD44⁻ CD25⁻) (Godfrey et al. 1993). (Figure 2)

Les thymocytes DN1 sont les premiers à entrer dans le thymus. A ce stade, ils expriment c-kit et CD44 (c-kit⁺CD44⁺CD25⁻), prolifèrent ensuite en acquérant l'expression du CD25 et progressent vers le stade DN2 (c-kit⁺CD44⁺CD25⁺). Au cours de cette étape cruciale du développement, les réarrangements des segments géniques codant les chaînes du TCR γ , δ et β sont initiés (Judith A.Owen, Jenni Punt and Sharon A. Stranford. 2013). Les

cellules en transition du stade DN2 au stade DN3 (c-kit⁺CD44⁺CD25⁺) poursuivent le réarrangement des chaînes TCR γ , TCR δ et TCR β et s'engagent dans la lignée des cellules T TCR $\alpha\beta$ ou TCR $\gamma\delta$. Elles se différencient en deux lignées majeures de lymphocytes T ayant des fonctions immunitaires différentes. Une petite fraction appartient à la lignée $\gamma\delta$ (entre 0,5-5% des cellules T) et migre du thymus vers l'épiderme, les muqueuses et l'intestin, où elle agit dans la surveillance innée. Cependant, la plupart des lymphocytes T appartiennent à la lignée $\alpha\beta$ en exprimant à ce stade un pré-TCR fonctionnel (Vantourout et Hayday 2013), constitué d'une chaîne pré-Ta invariante et d'une chaîne β clonotypique (Fehling et al. 1995). (Figure 2)

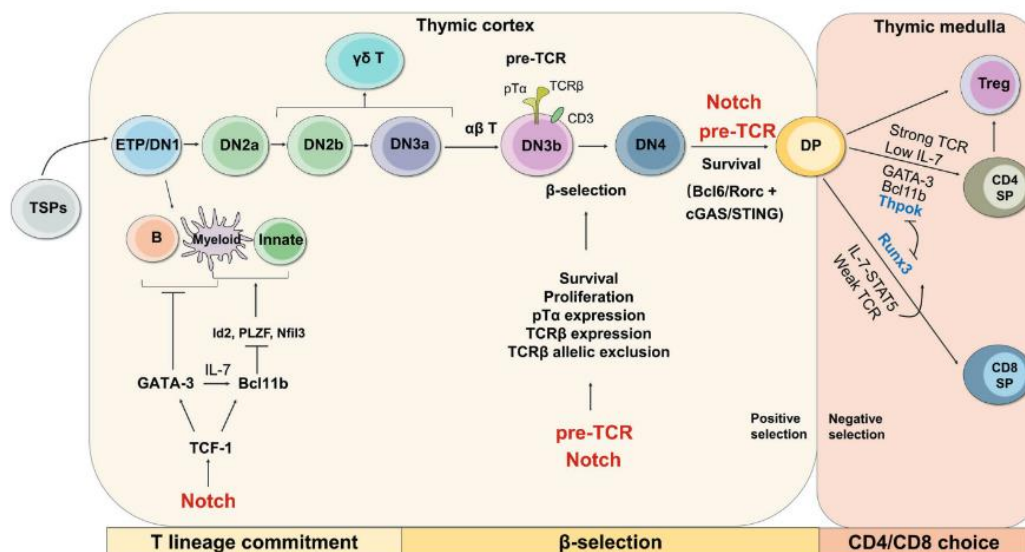


Figure 2 : Aperçu du développement des thymocytes. Le développement des cellules T se déroule en trois étapes clés : l'engagement de la lignée des cellules T, la β -sélection et le choix de la lignée CD4/CD8, où les cellules T passent par des stades de développement séquentiels, de TSPs à DN, DP et SP. *Figure adaptée de* (Sun et al. 2023).

La coopération entre la signalisation Notch et la signalisation du Pré-TCR va émettre des signaux de survie pour assurer l'expansion clonale des thymocytes DN et assurer leur transition des stades DN à DP (double positif) par le processus de β -sélection (Maillard et al. 2006) (Figure 2). Le réarrangement réussi de la chaîne β du TCR marque la fin du réarrangement du locus TCR β sur l'autre chromosome, entraînant ainsi l'exclusion allélique.

Les thymocytes DN « β -sélectionnés » poursuivent leur maturation et réarrangent le locus TCR- α qui code la chaîne α du TCR et permet d'exprimer un TCR $\alpha\beta$ mature à la surface des thymocytes DP qui expriment les molécules CD4 et CD8 (Judith A.Owen, Jenni Punt and Sharon A. Stranford. 2013).

Ces thymocytes (DP) subissent ensuite une sélection positive orchestrée par la reconnaissance des complexes peptides/CMH de type I ou II qui sont exprimés à la surface des cellules épithéliales corticales (cTEC) (Pircher et al. 1989). Les thymocytes

sélectionnés sur la base d'une affinité intermédiaire de leur TCR pour les complexes peptides/CMH de classe I ou II s'orientent alors vers les voies de différenciation CD8 ou CD4, respectivement, pour devenir des thymocytes simples positifs (SP) après la perte de l'expression de l'un des deux corécepteurs (décision de la lignée CD4/CD8). En revanche, les cellules DP dont le TCR $\alpha\beta$ n'interagit pas, ou doté d'une affinité trop faible pour le complexe peptide-CMH ne reçoivent pas de signaux suffisants pour leur survie et meurent « par négligence » (Palmer 2003).

Après s'être engagés dans la voie de différenciation CD4 ou CD8, les thymocytes SP subissent une autre étape de sélection, cruciale pour l'établissement de la tolérance centrale : la sélection négative, qui vise à éliminer les clones exprimant des TCR trop affins pour les complexes peptide-CMH (Ashton-Rickardt et al. 1994; Hogquist, Jameson, et Bevan 1995), et susceptibles d'induire une auto-réactivité. Ces cellules meurent par apoptose, permettant ainsi la génération d'un répertoire de cellules T périphériques majoritairement tolérantes au soi.

Ces cellules sont des LT CD4+ matures conventionnels (Tconv) ou des LT CD8+, naïfs (Tn) qui rejoindront la circulation sanguine et migreront au sein des organes lymphoïdes secondaires (OL-II). Ils exprimeront ainsi le CCR7 qui facilitera leur transmigration au sein des OL-II par les structures endothéliales spécialisées appelées « high endothelial venules » (HEV) qui expriment le ligand de CCR7 (Cf. 1-L'Inflammation).

Les cellules dendritiques immatures (DC), qui résident dans les tissus infectés et capturent le pathogène et ses antigènes par micropinocytose et phagocytose sont ensuite activées. Ces DC migrent par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques vers les ganglions lymphatiques régionaux. Dans ces derniers, elles arrivent en tant que cellules dendritiques matures et non phagocytaires où elles rencontrent et activent les lymphocytes T naïfs spécifiques de l'antigène.

Lors de la stimulation antigénique, les lymphocytes T CD8+ naïfs subissent une robuste expansion pour donner naissance à des lymphocytes T effecteurs et mémoires. Les lymphocytes T CD8+ effecteurs, aussi appelés lymphocytes T cytotoxiques (LTC), peuvent directement induire la mort des cellules cibles par l'interaction entre le ligand Fas/Fas et la sécrétion de perforine, un médiateur cytolytique qui crée des pores dans les cellules cibles permettant l'administration de protéases à sérine granulaires (granzymes) et induisant ainsi l'apoptose. De plus, les lymphocytes T CD8+ libèrent des cytokines dont l'IFN- γ , le TNF- α et le TNF- β . Ces cytokines inhiberont davantage la réplication virale, activeront les macrophages et réguleront positivement l'expression du CMH de classe I qui augmentera la détection d'une cellule infectée (DeMaio et al. 2022).

Au cours du processus de développement de l'immunité, les lymphocytes T CD4+ sont activés par le complexe peptide-CMH de classe II des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), conjointement aux signaux de costimulation et des cytokines. Selon le type d'antigènes, de CPA et de facteurs solubles produits, les lymphocytes T CD4+ se

différencient en plusieurs sous-ensembles fonctionnels dotés d'une expression distincte de molécules de surface, de cytokines et de facteurs de transcription (FT) clés pour réguler et affiner l'immunité (DiMolfetto et al. 1998; Tao et al. 1997). Parmi ces sous-ensembles, sont retrouvés les Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, CTL, les T auxiliaires folliculaires (Tfh), les Treg et les Treg folliculaires (Tfr) (Figure 3).

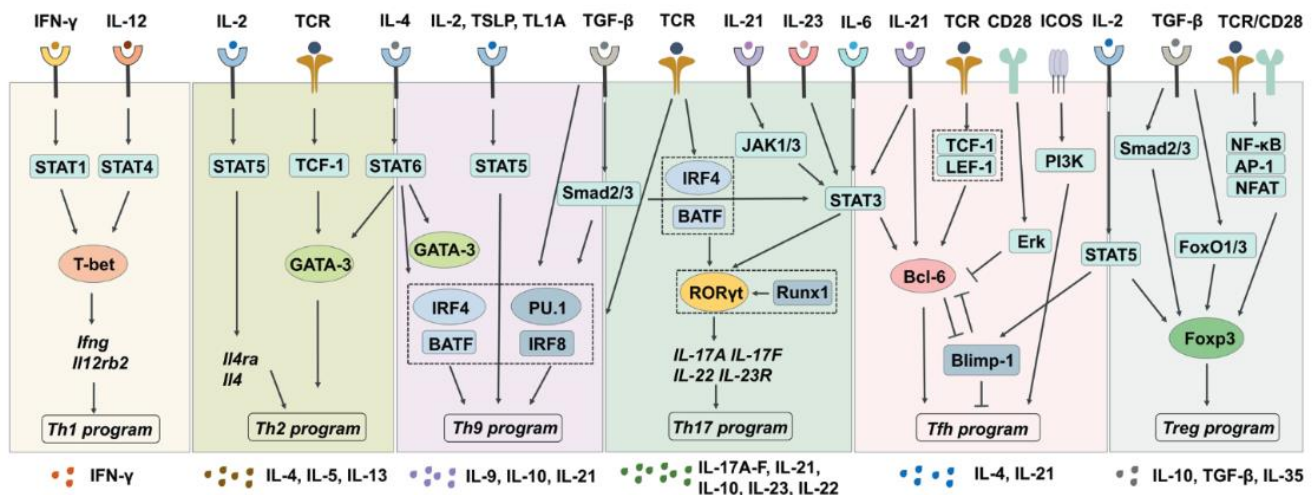


Figure 3 : Les signaux extracellulaires régulant la différenciation des cellules Th CD4+. Après stimulation du TCR, les cellules T CD4+ naïves peuvent être différenciées en sous-ensembles Th effecteurs distincts sous l'influence de différentes cytokines et signaux de co-stimulation. *Figure adaptée de (Sun et al. 2023).*

Les cellules Th1 jouent un rôle majeur dans la protection des hôtes contre les bactéries et les virus intracellulaires par la production de la cytokine pro-inflammatoire IFN-γ qui est, avec l'IL-12, essentielle à la différenciation et au maintien des Th1. En effet, l'IL-12, sécrétée par la majorité des CPAs, y compris les CDs, permet d'activer les cellules NK qui sont responsables de la production d'IFN-γ (Hsieh et al. 1993; Iwasaki et Medzhitov 2004). La stimulation du TCR et cette production d'IFN-γ vont, via STAT1, induire l'expression de T-bet (Afkarian et al. 2002) qui est le principal FT caractéristique de cette lignée, en excluant les lignées Th2 qu'il antagonise. Il inhibe en effet l'expression de l'IL-4 et altère la fonction du facteur de transcription GATA3, pour maintenir l'équilibre dans des conditions physiologiques (Djuretic et al. 2007).

La différenciation Th2 est quant à elle, orchestrée par la signalisation de l'IL-4. Cette dernière entraîne l'activation de STAT6 et la régulation positive de GATA3, un facteur de transcription régulateur clé de cette lignée (Kaplan et al. 1996; J. Zhu et al. 2001). Ce FT inhibe non seulement la différenciation des cellules Th1, mais favorise également la production de cytokines spécifiques des cellules Th2, telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Jinfang Zhu et al. 2006). Ces cytokines jouent un rôle central dans la protection de l'hôte contre les infections à helminthes et participent à la réparation des tissus.

Les cellules Th9 constituent un sous-ensemble plus récemment identifié de lymphocytes T CD4+, jouant un rôle essentiel dans les maladies infectieuses et les allergies. Elles peuvent être induites *in vitro* par la stimulation du TCR en présence de TGF- β et d'IL-4 qui vont, respectivement, activer PU.1 et induire l'expression d'IRF4 (capable de se lier directement au promoteur de l'IL-9) (Staudt et al. 2010). Ce sous-ensemble se caractérise par l'expression de niveaux élevés d'IL-9 (Luckheeram et al. 2012).

Les cellules Th17 sont caractérisées par l'expression du FT ROR γ t. Elles contribuent, par leur sécrétions d'IL17A-F, IL-21, IL-10, IL-23 et IL-22, à la protection contre les infections bactériennes et fongiques extracellulaires, principalement au niveau des membranes muqueuses (Bystrom et al. 2022). L'IL-6 et le TGF- β (Volpe et al. 2008) pilotent la différenciation des cellules Th17 tandis que l'IL-21 et l'IL-23 stabilisent la lignée Th17 (Nurieva et al. 2007).

Les cellules Tfh expriment le récepteur CXCR5 et le CD40L (Breitfeld et al. 2000; Vinuesa et al. 2005). Elles se situent dans les zones folliculaires des tissus lymphoïdes, où elles participent au développement de l'immunité humorale en favorisant la prolifération et la maturation des cellules B et la réponse du centre germinatif (GC). Elles expriment les FT STAT3 et Bcl-6. Ce dernier contraint la différenciation des cellules Th1, Th2 et Th17 en réprimant l'expression des facteurs de transcription définissant leurs lignées, à savoir Tbet, GATA-3 et ROR γ t respectivement (Yu et al. 2009; Kusam et al. 2003).

Bien que la capacité des lymphocytes T à déclencher une réaction inflammatoire puisse être nécessaire au bon fonctionnement immunitaire, il est également crucial d'avoir un mécanisme régulateur pour modérer cette réponse. Cette fonction est assurée par les cellules T régulatrices (Treg). Comme leur nom l'indique, ces cellules T régulent et suppriment les effets potentiellement dangereux des cellules T et favorisent la tolérance. Les Treg sont caractérisées par une expression élevée de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (IL-2R α , CD25) et des cytokines inhibitrices IL-10, TGF- β et IL-35, ainsi que de l'expression du FT clé, Foxp3 (Luckheeram et al. 2012; Hori 2021). Les Tregs naturels (nTregs) sont générés et formés dans le thymus et exercent plusieurs fonctions essentielles, comme la tolérance aux antigènes alimentaires, la protection des bactéries commensales contre l'élimination par le système immunitaire ou encore la promotion de la tolérance fœto-maternelle. De plus, la stimulation chronique des antigènes en périphérie, en présence de TGF- β et d'IL-2, conduit à une régulation positive de FOXP3 dans les cellules T et favorise leur conversion en Tregs induits (iTregs) (W. Chen et al. 2003).

Quant aux cellules T régulatrices folliculaires (Tfr), elles empêchent l'activité des cellules Tfh et suppriment l'auto-réactivité. Elles jouent ainsi un rôle spécialisé dans la modulation de l'activation des cellules Tfh sur les cellules B (Bystrom et al. 2022).

1.2.2 Les lymphocytes B

Le développement des Lymphocytes B

Le développement des cellules B se fait à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dont la destinée est de suivre le lignage B et au cours duquel, les facteurs de transcription Ikaros, Purine box factor 1 (PU.1) et E2A jouent des rôles centraux (Judith A.Owen, Jenni Punt and Sharon A. Stranford. 2013). Dans ce contexte, Ikaros recrute des complexes de remodelage de la chromatine dans des régions particulières de l'ADN et permet d'assurer l'accessibilité des gènes nécessaires au développement des cellules B. PU.1 permet, quant à lui, un maintien de l'équilibre leucocytaire. En effet, de faibles niveaux d'expression de PU.1 favorisent la différenciation lymphoïde alors que des niveaux plus élevés de ce FT font pencher la balance vers un destin myéloïde. Le répresseur transcriptionnel Gfi1 est responsable de la régulation de l'expression de PU.1 à des niveaux requis à une progression cellulaire vers la voie des lymphocytes B alors que l'expression de E2A contribue au maintien du pool de CSH (Judith A.Owen, Jenni Punt and Sharon A. Stranford. 2013).

Ces CSH expriment la molécule de surface c-Kit (CD117), qui est le récepteur du facteur des cellules souches (SCF). L'interaction SCF-c-Kit est essentielle au développement des cellules progéniteurs multipotentes (MPP, multipotent progenitor cells.) Les MPP générées conservent l'expression de c-Kit et expriment de manière transitoire la molécule CD34. Les MPP expriment également le CXCR4, qui liera la chimiokine CXCL12 des cellules stromales de la moelle osseuse (Gomes et al. 2016). Ces dernières, par leurs sécrétions cytokiniques, créent des microenvironnements distincts, appelés niches, qui fournissent un support adéquat au bon développement des cellules.

Au cours de son développement, la cellule progénitrice exprime le fms-related tyrosine kinase 3 receptor (flt-3) qui, en se liant à son ligand exprimé par les cellules stromales, entraîne l'expression du récepteur de L'IL-7 par les cellules progénitrices (Sitnicka et al. 2007). Ces dernières, désormais c-Kit+, flt-3+, sont appelées lymphoid-primed multipotential progenitors (LMPP). À mesure que ces derniers s'engagent davantage dans la lignée lymphoïde, le niveau de c-Kit chute et les cellules destinées à devenir des lymphocytes commencent à exprimer les protéines RAG1/2 et le terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). À la fin de cette étape, elles exprimeront également le facteur de transcription EBF1 (Early B-Cell Factor 1). Cette nouvelle expression de RAG1/2 définit la cellule comme un early lymphoid progenitor cell (ELP) (Igarashi et al. 2002). Un sous-ensemble d'ELP émigre de la moelle osseuse pourensemencer le thymus et servir de progéniteurs des lymphocytes T. Le reste des ELP reste dans la moelle osseuse en tant que progéniteurs des cellules B qui verront leur expression de c-Kit diminuer et les niveaux d'IL-7R augmenter à mesure que ces ELP se développent en

précurseurs lymphoïdes communs (PLC Common Lymphoid precursors) (Judith A.Owen, Jenni Punt and Sharon A. Stranford. 2013).

Le développement des cellules B commence dans la moelle osseuse, où les progéniteurs lymphoïdes communs s'engagent dans la lignée des cellules B par l'expression de facteurs de transcription, tels que Pax5 (Morgan et Tergaonkar 2022).

L'intégration des signaux externes et des activités des facteurs de transcription lymphoïdes B organisent l'engagement des cellules de la lignée B par des cycles alternés de prolifération et de différenciation, produisant un répertoire diversifié de cellules B matures (R. D. Lee et al. 2021).

Par leur expression du marqueur spécifique de la lignée B, B220 (chez la souris ou CD45R chez l'homme) et l'augmentation de l'expression du facteur de transcription EBF1 (essentiel pour l'expression de nombreuses protéines associées aux cellules B comme Cd79a et CD79b et les gènes codant pour le pré-BCR), la cellule en développement entre dans le stade de cellule pré-pro-B. A ce stade, EBF1, avec E2A, se lie au locus IgH pour favoriser la recombinaison Dh Jh. Après la recombinaison réussie Dh→Jh, les cellules pré-pro-B, qui répondaient initialement au CXCL12 sécrété par les cellules stromales de la moelle osseuse, entrent dans le stade précoce des cellules pro-B et se déplacent à présent dans la moelle osseuse à la recherche de cellules stromales sécrétant de l'IL-7 (J.-Y. Wang 2020). Les cellules pré-pro-B B220⁺CD43⁺CD19⁻ expriment des gènes associés à la lignée B précoce, tels que Flt3, IL7R et CD79a, mais aussi des facteurs de transcription associés aux lignées myéloïdes (RUNX2, IRF8, BST2 et TCF4) qui seront réprimés lorsque les cellules passent au stade pro-B (Hystad et al. 2007).

Ainsi, les cellules pro-B vont exprimer le gène de la famille Bcl-2, Bok, ainsi que des gènes stimulés par l'interféron, tels que Ifitm2 et Ifitm3 (R. D. Lee et al. 2021). Elles expriment également PAX5, qui est l'une des cibles transcriptionnelles de EBF1, qui inhibe l'expression des gènes des autres lignées et, à l'inverse qui active de nombreux gènes fondamentaux des cellules B, dont le CD19. De plus, PAX5 favorise la recombinaison VH-DH en contractant le locus Igh, rapprochant ainsi les segments des gènes VH et la région DHJH (Fuxa et al. 2004; J.-Y. Wang 2020). Quant à EBF1, il régule positivement l'expression des gènes des chaînes légères de substitution du pré-BCR, Vpreb1 et Igll1 (λk5) (Sigvardsson, O'Riordan, et Grosschedl 1997).

La cellule B en développement entre alors dans le stade tardif de pro-B où la plupart des cellules ont initié la recombinaison des segments de gènes Ig VH-DHJH, qui est achevée dès le début du stade précoce de pré-B où l'expression de c-Kit est définitivement désactivée.

Après une recombinaison réussie des segments VH→DHJH, la cellule exprime un pré-BCR, composé de la chaîne lourde μ recombinée, complexée avec VpreB et λk5, et associée à Iga (CD79a) et Igb (CD79b). Cette expression marque la fin du réarrangement

du gène de la chaîne lourde et garantit qu'aucune recombinaison supplémentaire de ce gène ne soit possible, grâce au phénomène d'exclusion allélique. En effet, après un réarrangement réussi sur un allèle, le locus de la chaîne lourde sur l'autre chromosome est méthylé et recruté dans l'hétérochromatine, assurant ainsi la spécificité de reconnaissance antigénique (Vettermann et Schlissel 2010).

A ce stade, les cellules B en développement sont au stade de cellules larges pré-B en prolifération B220⁺CD19⁺ CD43⁺CD25⁻, ou encore de cellules dépendantes du pré-BCR (R. D. Lee et al. 2021). Celles-ci augmentent leur expression de Myc via le pré-BCR, tout en régulant négativement EBF1 et ses gènes cibles les CD79a et CD79b ainsi que l'IL-7R. La réduction du signal de l'IL-7, qui s'ensuit, inverse la contraction initiale du locus Igh, aboutissant à la séparation physique des segments géniques VH, D, et JH dans le locus de la chaîne lourde non réarrangé y empêchant ainsi toute recombinaison supplémentaire. (Figure 4)

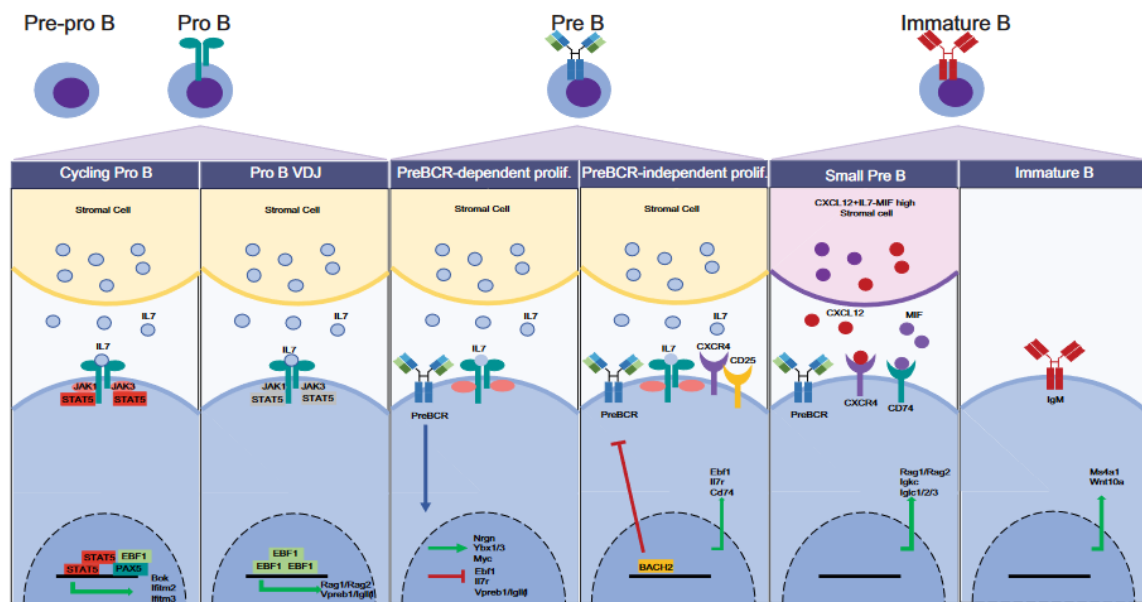


Figure 4: Modèle du développement des lymphocytes B et des changements dynamiques des réseaux de gènes qui sont impliqués. Figure adaptée de (R. D. Lee et al. 2021).

Ces cellules perdent progressivement l'expression de leur pré-BCR à la surface jusqu'à leur entrée au stade de cellules pré-BCR indépendantes qui présentent une expression intermédiaire du CD43 et commencent à exprimer le CD25, marquant leur transition vers le stade de petites cellules pré-B CD43^{lo/-}. Ces cellules expriment fortement *Bach2*, un facteur qui réprime le signal du BCR diminuant ainsi leur expression de *Myc* (Roychoudhuri et al. 2016; Sidwell et al. 2020). Ces cellules indépendantes du pré-BCR réexpriment de forts taux de EBF1 et d'IL-7R. A ce stade, l'expression de *Cxcr4* est davantage induite et le réarrangement de la chaîne (VL → JL) est initié par la réexpression des gènes *Rag1/2* (J.-Y. Wang 2020; R. D. Lee et al. 2021).

À l'issue du réarrangement et de l'expression réussis des gènes des chaînes légères, Le BCR, ou récepteur mature à l'Ag est exprimé à la membrane avec une région constante μ (IGM) et un remplacement des chaînes alternes par une chaîne légère réarrangée, ce qui marque l'entrée de la cellule B en développement dans le stade de cellules B immatures (J.-Y. Wang 2020).

Si la cellule B immature reconnaît un auto-antigène présent à forte concentration dans la moelle osseuse, ses BCR s'agrègent transmettant un signal fort à la cellule qui subit, de ce fait, l'apoptose, un processus appelé la délétion clonale. Alternativement, une telle cellule B peut également réactiver l'expression de RAG1 et RAG2 et initier un nouveau cycle de recombinaison VL→JL pour créer un BCR avec une nouvelle spécificité potentiellement non-auto-réactive. Ce processus est appelé l'édition de récepteur (Tiegs, Russell, et Nemazee 1993). Enfin, si les récepteurs sur la cellule B en développement reconnaissent des auto-antigènes avec une faible affinité, les cellules peuvent devenir fonctionnellement non réactives ou anergiques, en raison de la régulation à la baisse de l'expression du BCR et de la signalisation BCR en aval (Wang 2020). Au final le répertoire des cellules B est établi et la tolérance centrale est installée.

Une fois ces processus terminés, les cellules B immatures sont prêtes à être exportées vers les organes lymphoïdes périphériques, généralement la rate, où elles achèvent leur programme de développement. Ces cellules B immatures nouvellement générées, qui n'ont pas encore acquis la capacité de circuler dans l'organisme sont appelées des cellules B transitionnelles T1 ($CD93^+ IgM^{high} IgD^- CD21^- CD23^-$). Après être entrées dans les follicules spléniques, elles se différencient en cellules B transitionnelles T2 par l'acquisition de l'expression à leur surface de l'IgD, du CD21 et du CD23, ainsi que la capacité à circuler. Les cellules B transitionnelles T3, quant à elles, ressemblent aux cellules B T2 mais présentent des niveaux d'expression plus bas d'IgM de surface (J.-Y. Wang 2020). Ces cellules B transitionnelles agissent séquentiellement en tant que précurseurs des cellules B totalement matures pour devenir soit des cellules B folliculaires (FOB), soit des cellules B de la zone marginale (Morgan et Tergaonkar 2022). La nature et la combinaison des signaux provenant du BCR, du récepteur de BAFF (BAFFR) et de la signalisation de Notch2, ainsi que les mécanismes régulant leur migration et leur rétention, déterminent l'engagement des cellules B, depuis leur stade transitionnel jusqu'à leur destinée cellulaire en tant que cellule B folliculaire mature ou cellule B de la zone marginale.

Un signal faible du BCR, associé à des signaux NF- κ B et de Notch2, orientent les cellules B transitionnelles vers leur développement en cellules B de la zone marginale (MZB) (Descatoire et al. 2014). Ces dernières expriment constitutivement des niveaux élevés de molécules de CMH de classe II, ainsi que des molécules CD80 et CD86, ce qui leur confèrent une activité robuste de présentation d'antigènes, nécessaire à l'activation des cellules T auxiliaires folliculaires (TFH). De plus, ces MZB peuvent également répondre rapidement aux antigènes circulants dans le sang et se différencier en plasmablastes de courte durée de vie produisant de grandes quantités d'IgM (Morgan et Tergaonkar 2022).

Un signal tonique du BCR, accompagné d'un signal de survie BAFF et d'une signalisation NF- κ B, favorisent le développement des cellules B transitionnelles en cellules B folliculaires qui se trouvent dans les follicules primaires. A ce stade, elles recirculent par le sang et les vaisseaux lymphatiques dans les organes lymphoïdes secondaires pour retourner dans la moelle osseuse. Il est aussi admis que la quiescence métabolique, qui est caractérisée par la régulation négative des gènes impliqués dans la voie PI3K-mTOR, peut servir de commutateur transformant les cellules B transitionnelles en cellules FOB (Farmer et al. 2019). Ces FOB ont tendance à avoir une plus grande diversité des gènes Ig V(D)J que les cellules B de la zone marginale. Elles interagissent avec les cellules T auxiliaires pour former des centres germinatifs où elles subissent une commutation de classe (CSR) et les hypermutations somatiques (SHM) et finissent par produire des anticorps à haute affinité pour éliminer les agents pathogènes ou donner naissance à des cellules B mémoire.

Les lymphocytes B naïfs, qui ne participent pas à la réponse des centres germinatifs, sont migrent vers la zone corticale (mantle zone) des lymphocytes B. Dans cette zone, ils se divisent et forment des plasmablastes à courte durée de vie qui finissent par produire des plasmocytes à IgM de faible affinité et à demi-vie courte. Les centres germinatifs, qui sont identifiés par l'expression de GL7 et de Fas (CD95), sont des zones hautement prolifératives, divisées en zones claire (LZ) et sombre (DZ) (Stewart et al. 2018) ; cette dernière devant son nom à la prolifération intense des lymphocytes B étroitement agencés. La LZ, qui contient des cellules dendritiques folliculaires (FDC), permet la sélection des BCR exprimés. En effet, les lymphocytes B reçoivent l'antigène présenté par les FDCs, le présentent aux cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh) et, si la mutation somatique confère une plus forte interaction, la cellule sera spécifiquement sélectionnée (Stewart et al. 2018; Kerfoot et al. 2011). La DZ est la zone où les hypermutations somatiques (SHM) se produisent (Victora et Nussenzweig 2022) et où Aicda, un gène qui code la déaminase induite par l'activation (AID), est fortement exprimé. AID déamine les résidus de cytidine dans les régions VDJ et entraîne les hypermutations somatiques (SHM). Pendant le processus de SHM, AID catalyse la déamination de la cytidine (C) en uracile (U), déclenchant ainsi l'activation de voies de réparation associées aux mécanismes d'erreur, ce qui favorise l'induction de mutations (Jones et al. 2020). Le but de ces altérations, principalement dans le centre germinatif, est d'augmenter l'affinité et de modifier les propriétés biologiques de l'immunoglobuline, dotée d'une spécificité plus grande pour l'antigène (Chi, Li, et Qiu 2020) (Figure 5).

La réaction de déamination, qui est catalysée par AID, provoque la perte du groupement amine des résidus de cytidine situés dans les sites de mutations fréquentes et conduit à la formation d'uridine. Cela crée un mésappariement U-G déclenchant ainsi plusieurs mécanismes alternatifs qui participent à la résolution du mésappariement initial, entraînant la création de tronçons d'ADN muté. Le premier mécanisme, et le plus simple, consiste en l'interprétation de la désoxyuridine comme une désoxythymidine, entraînant lors de la réplication, une mutation de transition C-T. Alternativement les voies non-

canoniques de réparation des mésappariements (MMR) et de réparation par excision de base (BER) peuvent intervenir dans cette réparation d'ADN associée aux mécanismes d'erreurs. Dans le cas de la MMR, l'U appariée à G est détectée par l'hétérodimère MutSa, composé de MSH2 et MSH6 (Jiricny 2013), qui recrute ensuite l'exonucléase 1 et APE2 pour cliver le mésappariement. Cela fournit une entrée pour l'Exo1, qui initie la résection à partir de la coupure, traversant le site de mésappariement et crée une région étendue d'ADN monocaténaire. Ensuite, la polymérase à faible fidélité Pol η est recrutée pour synthétiser la région excisée d'ADN et introduire des mutations. En revanche dans la BER, l'U est reconnue par l'uracil-DNA glycosylase, qui excise l'U de l'ADN, laissant un site abasique (Krokan et Bjørås 2013). La polymérase d'ADN REV va ensuite être recrutée pour insérer une dCMP dans la nouvelle chaîne d'ADN en face du site abasique. Après un autre cycle de réplication de l'ADN, cela peut entraîner une mutation de transversion stable au site de la paire de bases C:G d'origine (Figure 5).

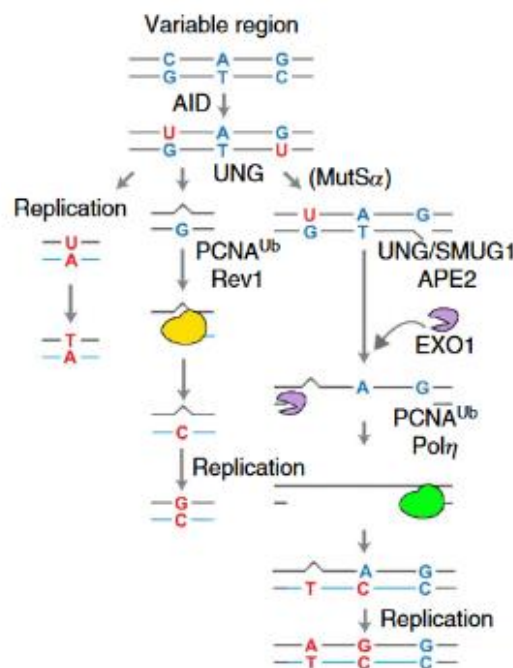


Figure 5 : Vue d'ensemble des mécanismes de mutations hypersomatiques.

Figure adaptée de (Chi, Li, et Qiu 2020).

1.2.2.1 Les lymphocytes B2 producteurs d'immunoglobulines

Les lymphocytes B (LB) jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire adaptative. Lorsqu'ils sont activés par la rencontre avec un antigène, les lymphocytes B peuvent se différencier finalement en plasmocytes et produire des anticorps qui neutralisent ou inactivent les agents pathogènes. De plus, les LB recrutent le système du complément et déclenchent l'opsonisation, un processus qui rend les agents pathogènes susceptibles à la phagocytose. Les lymphocytes B activés génèrent également des lymphocytes B

mémoires, assurant ainsi une efficacité de la réponse immunitaire lors d'une exposition ultérieure au même antigène.

Le rôle essentiel de cette population immunitaire est lié aux immunoglobulines (Ig) qu'elle produit. Ces Ig sont capables de reconnaître de nombreux types d'antigènes en raison de la grande diversité de leurs régions variables de liaison à l'antigène. Ces régions variables (V) jouent un rôle crucial dans les réponses immunitaires.

Les Ig sont composées de deux chaînes lourdes (IgH) codées par le locus de la chaîne lourde IgH (chromosome 14 chez l'homme et 12 chez la souris) et de deux chaînes légères (IgL) codées soit par le locus de la chaîne légère Igk (chromosome 2 chez l'homme et 6 chez la souris) soit par le locus de la chaîne légère Igλ (chromosome 22 chez l'homme et 16 chez la souris).

Les gènes des chaînes IgH codent les régions variables (V) et les régions constantes spécifiques d'isotype (C). La combinaison des régions variables génère une diversité de séquences qui est nécessaire à une reconnaissance efficace d'une grande variété d'antigènes. La chaîne lourde de l'immunoglobuline est codée par plusieurs locus : variables (V), de diversité (D) et de jonction (J). La combinaison aléatoire de ces segments géniques, organisés de manière séquentielle sur le chromosome 14 est effectuée par le réarrangeant d'un des 27 segments géniques de diversité IGH (IGHD) avec l'un des 6 segments géniques de jonction IGH (IGHJ). Cette combinaison DJ est ensuite associée à un des environ 50 segments géniques variables IGH (IGHV). De manière similaire, des gènes fonctionnels de la chaîne IgL, soit de type kappa (IGκ) soit de type lambda (IGλ), sont générés par la combinaison d'un des environ 40 segments géniques variables IGκ (IGκV) avec un des environ 5 segments géniques de jonction IGκ (IGκJ), ou d'un des environ 30 segments géniques variables IGλ (IGλV) avec un des environ 4 segments géniques de jonction IGλ (IGλJ), respectivement.

Une diversité jonctionnelle supplémentaire des gènes IG réarrangés est générée par l'insertion et la délétion aléatoires de nucléotides « non-templated » (N) aux jonctions IGHD-IGHJ, IGHV-IGHD, et IGLV/IGKV-IGLJ/IGKJ (Figure 6).

Trois motifs dans la séquence d'acides aminés de la région variable de chaque chaîne lourde (HC) et chaîne légère (LC) déterminent la spécificité de liaison à l'antigène. Ces motifs sont appelés régions déterminantes de la complémentarité (HCDR pour les chaînes lourdes et LCDR pour les chaînes légères) et sont encadrées par des régions charpentes (FR), qui assurent l'intégrité structurale de la molécule.

Alors que les régions HCDR1 et HCDR2 sont entièrement codées par les segments variables IGHV, la HCDR3 s'étend sur les jonctions IGHV-IGHD et IGHD-IGHJ et inclut les nucléotides non-templated (N) ajoutés par la TdT. L'incorporation de ces N-nucléotides introduit une variabilité considérablement accrue dans la région HCDR3. De manière similaire, la région LCDR3 englobe la jonction entre les segments variables IGKV/IGLV et

les segments de jonction IGKJ/IGLJ. Par conséquent, les régions HCDR3 et LCDR3 sont les épitopes les plus diversifiés du récepteur des cellules B (BCR) et jouent un rôle majeur dans la détermination de la spécificité de liaison à l'antigène (Gupta, Viswanatha, et Patel 2020; Hengeveld et al. 2021). (Figure 5)

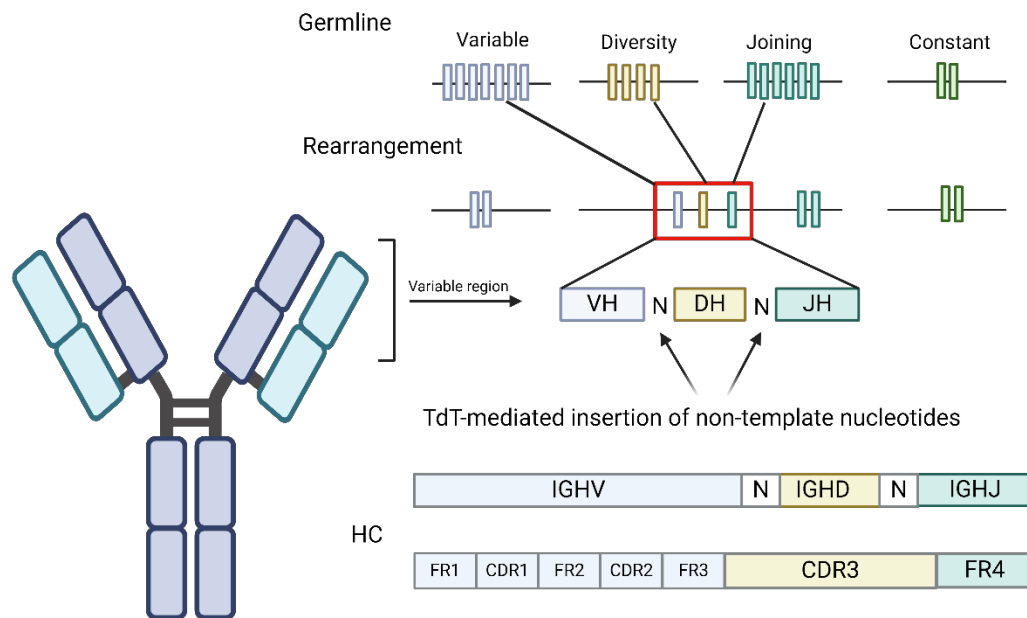


Figure 6 : Représentation schématique du BCR montrant l'emplacement génomique de la région IGH. Le diagramme de droite illustre schématiquement la configuration germinale des gènes V, D et J IGH (en haut) ainsi que le gène IGH réarrangé dans un lymphocyte B donné. Une remarquable diversité du répertoire IGH est générée par le potentiel de réarrangement de nombreux gènes V, D et J, ainsi que par les effets des altérations nucléotidiques de jonction (excision et ajout de bases nucléotidiques aléatoires par l'enzyme terminale déoxynucleotidyl transférase, TdT). (Figure réalisée avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)) et adaptée selon (Gupta, Viswanatha, et Patel 2020).

1.2.2.2 Les Lymphocytes B1 et le CD5

Les cellules B1 sont un sous-ensemble unique de cellules B dotées de propriétés cellulaires de l'immunité innée. Elles se distinguent des cellules B2 conventionnelles en termes d'ontogenèse, de phénotype et de fonction (Montecino-Rodriguez et Dorshkind 2012). Leur appellation « B1 » indique que leur développement commence tôt dans l'ontogenèse, précédant les cellules B2.

Les cellules B1 murines ont été identifiées pour la première fois au début des années 1980 en tant que cellules B exprimant Ly-1 (désormais CD5⁺) par Kyoko Hayakawa (K

Hayakawa et al. 1983). Cette découverte a été motivée par la recherche d'un équivalent physiologique aux cellules B humaines de leucémie lymphoïde chronique exprimant le CD5 (B-LLC).

Elles ont été identifiées chez la souris, comme des cellules B220^{low} IgM^{hi} CD23⁻ CD43⁺ IgD^{low} puis ont été subdivisées en B1-a (CD5⁺), un sous-ensemble majeur des lymphocytes B1 et, en B1-b un sous-ensemble mineur (CD5⁻). Contrairement au dogme soutenant l'existence de ces deux-sous ensembles B1-a (CD5⁺) et B1-b (CD5⁻), les résultats controversés de Savage et al. ont montré qu'une stimulation du récepteur de type Toll (TLR) régulait négativement l'expression du CD5 des cellules B1-a (Savage et al. 2019), suggérant que les cellules B1-b étaient simplement une forme activée des cellules B1-a, plutôt qu'un sous-ensemble distinct (Suchanek et Clatworthy 2023).

La plupart des recherches citées dans cette section traitent des cellules B1-a mais certaines concernent les cellules B1 sans distinguer les cellules B1-a des B1-b.

L'origine des cellules B1 a suscité de vifs débats au sein de la communauté immunologique, centrés principalement sur deux modèles opposés. Le premier est connu sous le nom de « **modèle de la lignée** » et soutenu par les travaux de K. Hayakawa et al., qui proposent que les cellules B1 et B2 représentent des lignées distinctes, dérivant de populations de précurseurs engagés dans l'une ou l'autre voie avant l'expression du récepteur des cellules B (BCR). Cette hypothèse est étayée par des études de transfert cellulaire, où les cellules du foie fœtal ont la capacité de reconstituer à la fois les compartiments B1 et B2 chez des souris irradiées, tandis que les cellules de la moelle osseuse adulte se limitent à la génération de cellules B2 (K. Hayakawa et al. 1985; Hardy et Hayakawa 1994). Cependant, des preuves définitives soutenant ce modèle font encore défaut, notamment sur l'engagement exclusif des précurseurs à la différenciation B2, qui demeure controversé (Kreslavsky et al. 2018). À l'opposé, le second modèle, désigné comme « **modèle de la sélection** », propose que les différences observées dans la capacité des cellules provenant de sources adultes et fœtales à générer des cellules B1 pourraient résulter de variations dans les répertoires du BCR. Il favorise l'idée qu'un progéniteur commun des cellules B puisse donner naissance aux cellules B1 et B2 et soit orienté par la spécificité du récepteur (Berland et Wortis 2002; Ghosn et Yang 2015; Kristiansen et al. 2016; Wong et al. 2019). Ce modèle est largement étayé par de nombreuses études sur les souris transgéniques. En particulier, les travaux de MJ. Chumley et al., portant sur des souris transgéniques exprimant des gènes réarrangés dérivés des cellules B1, codant les chaînes lourdes V_H11 et légères V_κ9. Le transfert des précurseurs isolés de la moelle osseuse de ces souris adultes transgéniques vers des receveurs sublétalement irradiés, a conduit exclusivement à la génération des cellules B1 qui présentaient le phénotype caractéristique des B1 et une capacité accrue à survivre en culture, signature fonctionnelle de ces cellules (Berland et Wortis 2002).

Plus récemment, ce modèle a été renforcé par le système transgénique établi par R. Graf et al., (Graf et al. 2019). Il permet une interconversion qui dépend du BCR entre les cellules B1 et B2 matures. Il cible respectivement les segments de gènes variables pré-arrangés de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH), V_H12 pour les cellules B1 et B1-8 pour les cellules B2. La substitution des BCRs spécifiques des cellules B2 et B1-a a permis de transformer une cellule B2 en cellule B1-a, et ce en l'absence de toute contrainte de lignée. La conversion B2 en B1 est rapide et s'accompagne d'une prolifération cellulaire soutenue, d'un « homing » des cellules vers les cavités pleurales et péritonéales et d'altérations génétiques profondes, menant à un profil transcriptomique typique des cellules B1 (Graf et al. 2019). Ces travaux démontrent que les cellules B2 matures ne sont pas irréversiblement engagées dans un lignage B2 et soulignent le rôle déterminant de la spécificité du BCR et du mode de signalisation dans la différenciation des cellules B1, même en l'absence d'un pré-engagement dans un lignage B1.

Bien que les réarrangements génétiques séquentiels et ordonnés des gènes des chaînes lourdes et légères (cf. Développement des lymphocytes B) dominant le développement des cellules B postnatales, des preuves récentes montrent que, pendant le développement fœtal, les chaînes IgH et IgL sont simultanément coexprimées, favorisant l'expression de BCR auto-réactifs. Ces derniers entraînent l'expansion et la sélection des cellules B, qui, à ce stade, se différencient principalement en cellules B1 (Wong et al. 2019; Graf et al. 2019). Ceci est en accord avec le modèle de Jerne, selon lequel les récepteurs auto-réactifs orientent le développement des lymphocytes et la sélection des clones spécifiques (Jerne 1955).

Alors que lors du développement des cellules B2 dans la moelle osseuse (Cf. Développement des lymphocytes B), la voie de signalisation de l'IL-7R dirige l'ordre séquentiel des événements de recombinaison. Cette dernière ne semble pas affecter le développement des cellules B1 dans le foie fœtal. En effet, l'IL-7 sécrétée par les cellules stromales de la moelle osseuse et son effecteur en aval, STAT5, favorisent l'accessibilité et la recombinaison des gènes de la chaîne lourde (Igh) tout en inhibant fortement la recombinaison du locus de la chaîne légère (Igk). Une fois activé, STAT5 transloque dans le noyau et forme un complexe avec PRC2/EZH2, qui se lie à « l'enhancer » intronique de Igk (iEk) et induit une répression médiée par H3K27me3 pour inhiber la recombinaison de ce locus.

Les cellules progénitrices dérivées du foie fœtal et de la moelle osseuse dépendent différemment de l'IL-7 pour leur développement. Notamment les cellules pro-B dérivées du foie fœtal ont des niveaux significativement plus faibles de STAT5 activé (p-STAT5), par rapport à leurs homologues dérivées de la moelle osseuse (Wong et al. 2019).

Dans leur étude, Wong et ses collaborateurs démontrent que des niveaux faibles de signalisation IL-7R/pSTAT5 dans l'environnement du foie fœtal favorisent une « voie alternative » de développement des cellules B. Dans cette voie alternative, une

recombinaison précoce de l'Igk se produit au stade des cellules pro-B au lieu du stade des petites cellules pré-B au cours du développement « classique » des cellules conventionnelles B2 (Cf. Développement des lymphocytes B) (Figure 7).

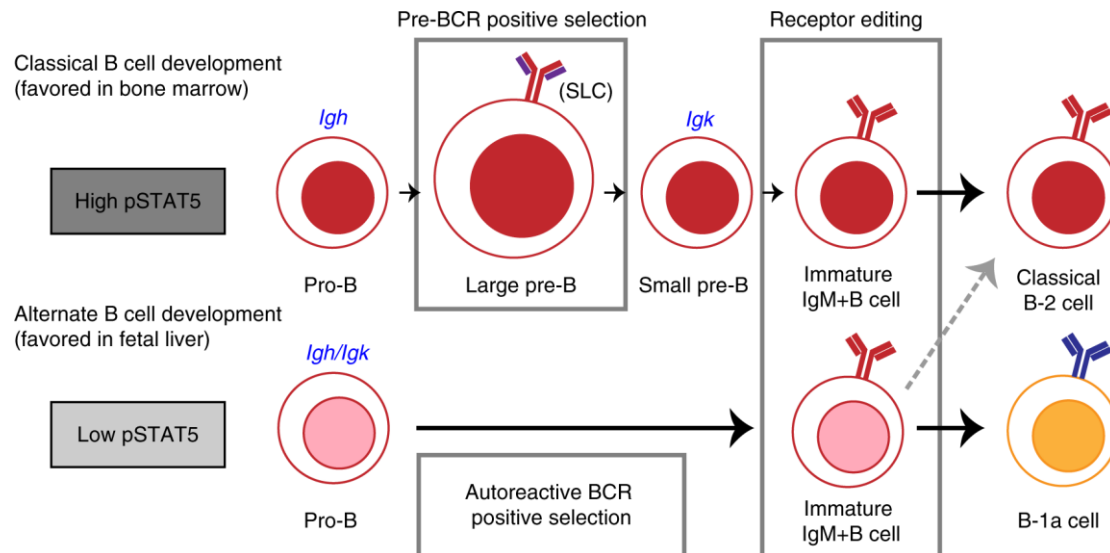


Figure 7 : Modèle du développement classique versus alternatif des cellules B. Le modèle du développement classique des cellules B (haut) est favorisé dans la moelle osseuse, où des niveaux élevés de signalisation STAT5 inhibent la recombinaison d'Igk au stade des cellules pro-B. Au stade des grandes cellules pré-B, l'association réussie de la chaîne lourde productive avec la SLC conduit à l'expansion et la sélection positive. Après la recombinaison d'Igk (bleu) au stade des petites cellules pré-B, les cellules B autoréactives peuvent subir une édition des récepteurs. Le modèle du développement alternatif des cellules B (bas) est favorisé dans le foie fœtal, où des faibles niveaux de signalisation STAT5 dans les cellules pro-B favorisent la recombinaison d'Igk au même stade que la recombinaison d'Igh (bleu). Ceci permet la génération de cellules B exprimant un BCR mature bien que ces cellules B puissent potentiellement subir une édition des récepteurs pour modifier leurs BCR. *Figure adaptée de (Wong et al. 2019).*

La réorganisation productive et simultanée des gènes de la chaîne lourde et légère (*Igh* et *Igk*) au stade pro-B conduit directement à l'expression d'un BCR mature, contournant ainsi la nécessité de la chaîne légère de substitution (SLC) et par conséquent du point de contrôle imposé par le pré-BCR (pre-B-cell (1st) checkpoint) (Winkler et Mårtensson 2018). En effet, étant donné que la SLC s'apparie mal avec les chaînes lourdes auto-réactives, le pré-BCR fournit un mécanisme pour la sélection négative des cellules B auto-réactives. Ainsi, l'expression des chaînes HC et LC, de manière indépendante des SLC, fournit une explication de l'émergence de cellules B avec des récepteurs auto-réactifs caractéristiques des cellules B1-a (Wong et al. 2019).

Par ailleurs, des travaux antérieurs menés dans le sac vitellin, la splanchnopleure para-aortique (P-Sp) et la rate ont démontré qu'aux E9-11 du développement embryonnaire, les cellules progénitrices lymphoïdes précoces expriment Rag2 et VpreB, mais pas encore Igll1. L'expression retardée du composant de la SLC, (Igll1/ λ k5) suggère l'existence d'une fenêtre précoce au cours de laquelle le développement des cellules B peut se produire en l'absence de SLC. Cette étape coïncide avec le stade auquel les premières cellules progénitrices B1 sont détectées (E9 dans le sac vitellin et la splanchnopleure para-aortique).

Les cellules B1 murines résident préférentiellement dans les cavités pleurales et péritonéales et constituent 35 à 70% des cellules B locales. Elles peuvent également être retrouvées en plus petite proportion dans différents tissus dans lesquels elles résident en homéostasie tels que la peau, les poumons, l'intestin ou le foie. Une fois stimulées, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour augmenter rapidement l'expression de BLIMP1, un facteur de transcription qui contrôle leur différenciation et leur production d'anticorps naturels. Une production d'IgM par ces cellules (B1-a) a également été rapportée à l'extérieur des organes lymphoïdes, dans les clusters lymphoïdes associés aux graisses Fat-associated lymphoid clusters (FALC) et les « milky spots » situés dans les cavités séreuses (Jackson-Jones et Bénézech 2018). Ces petites niches anatomiques sont des sites d'activation des cellules B1, riches en CXCL13 et IL-33 provenant des cellules stromales et en IL-5 provenant des cellules lymphoïdes innées du groupe 2 (ILC2), qui vont conjointement permettre à ces cellules B innate-like de produire des IgM pour la protection des cavités corporelles (Figure 8).

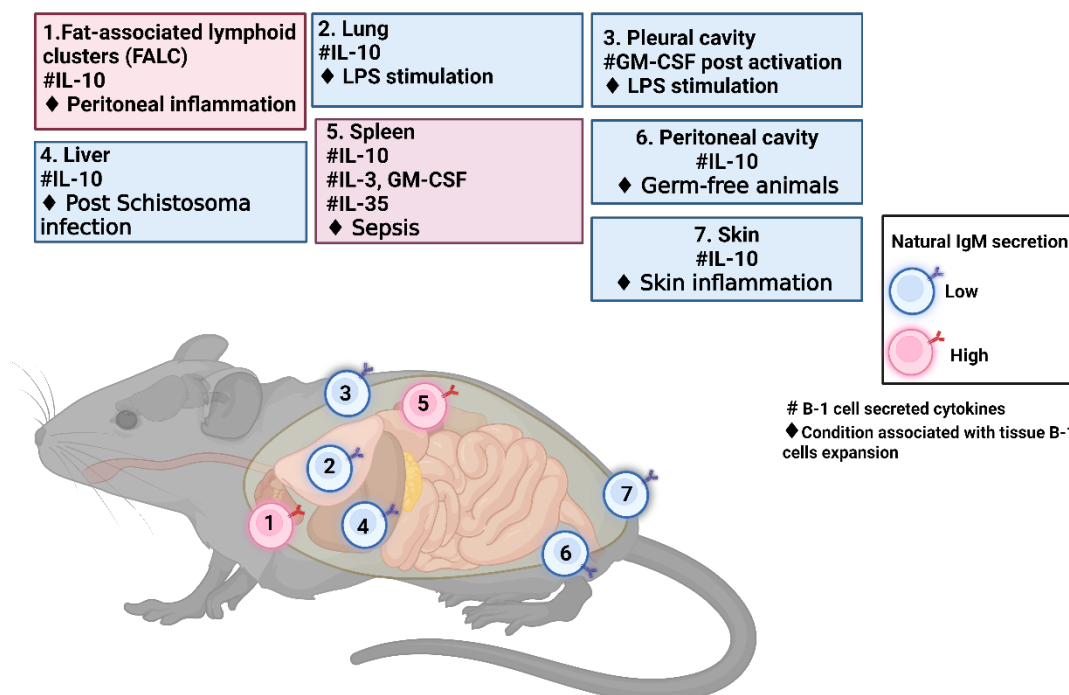


Figure 8 : Distribution des cellules B1 dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes de la souris. (Figure réalisée avec [BioRender.com](https://www.biorender.com/)) et adaptée selon (Suchanek et Clatworthy 2023).

En effet, les cellules B1 jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire immédiate aux agents pathogènes. Elles constituent une source majeure d'IgM naturelles qui, en plus de leurs propriétés anti-microbiennes, participent à maintenir l'homéostasie tissulaire par le processus d'opsonisation et par une meilleure clairance des cellules apoptotiques.

Des travaux antérieurs ont rapporté une fréquence accrue de lymphocytes B CD5⁺ dans le sang du cordon ombilical humain. Il a ensuite été montré par Lee et al., (Lee et al. 2009; Suchanek et Clatworthy 2023) que la majorité de ces cellules B CD5⁺ humaines dans le sang représentait des cellules B « pré-naïves » avec un phénotype intermédiaire entre les cellules B transitionnelles et B naïves. De plus, la plupart de ces cellules perd l'expression du CD5 lors de leur différenciation ultérieure en cellules B naïves.

Un effort visant à définir des marqueurs de surface de cellules B1 humaines a été déployé par Griffin et son équipe (Griffin, Holodick, et Rothstein 2011) grâce au phénotypage cellulaire de sang de cordon ombilical humain. Un pourcentage élevé de cellules B « mémoire » CD27⁺ (3 à 11 % du sous-ensemble CD20⁺), qui expriment également le CD43, un marqueur canonique des cellules B1 murines, a été mis en évidence. L'examen fonctionnel de ce sous-ensemble cellulaire, à savoir les CD20⁺CD27⁺CD43⁺ triés à partir de sang néonatal et adulte, a confirmé trois caractéristiques clés des cellules B1 : une sécrétion spontanée d'IgM, une signalisation tonique du BCR et une stimulation efficace des cellules T. La proportion de ces cellules humaines B1 putatives dans le sous-ensemble CD20⁺CD27⁺ était pour les trois quarts positives pour le CD5 et diminuait considérablement avec l'âge.

Récemment, les travaux de Suo *et al.* (Suo et al. 2022) ont identifié des cellules B1 qui résideraient dans des tissus embryonnaires et fœtaux humains à l'aide du séquençage d'ARN unicellulaire (Figure 9).

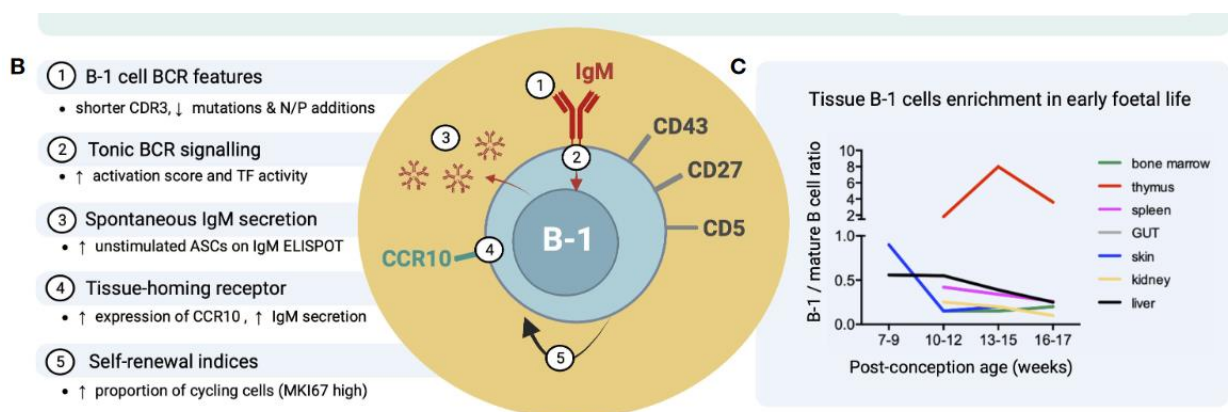


Figure 9 : Identification des cellules B1 présumées dans les tissus humains prénataux par séquençage RNA/BCR à cellule unique. B) Caractéristiques des cellules B1 putatives identifiées dans cette étude en comparaison avec des cellules B matures (IgD⁺IgM⁺CD27⁻) ; C) Graphique montrant l'évolution du ratio du nombre de cellules. Figure adaptée de (Suchanek et Clatworthy 2023).

Conformément aux travaux précédents (K. Hayakawa et al. 1984; Tornberg et Holmberg 1995; Suo et al. 2022; Suchanek et Clatworthy 2023), ces cellules B1 expriment IgM^{hi}IgD^{low} et sont CD27⁺ CD43⁺ CD5⁺. Elles partagent également des caractéristiques fonctionnelles avec les cellules B1 murines, notamment la sécrétion spontanée d'anticorps et certaines caractéristiques de leurs BCR, à savoir la longueur réduite de la jonction CDR3 amoindrissant la spécificité des récepteurs et provoquant une réactivité croisée, la faible fréquence de mutations et d'ajout de NP qui aboutit à une diminution de leur diversité. De plus, au cours du troisième trimestre de grossesse, le rapport entre les cellules B1 et les cellules B matures diminue de manière significative dans la plupart des organes, à l'exception du thymus.

Le marqueur CD5

Le gène CD5

Chez l'homme, le gène CD5 est localisé sur le chromosome 11q13 (Hecht et al. 1989) et chez la souris sur le chromosome 19 (Lecomte et al. 1996). Il s'étend sur environ 24,5 kb et comporte 11 exons. L'exon 1 code la partie 5' UTR et 18 des 24 aa englobant le peptide signal. L'exon 2 de 39 pb code le reste du peptide signal (6 aa) et les 7 premiers aa de la protéine mature (Nh et al. 1986). Les exons 3±6 codent la région extracellulaire. Comme décrit pour d'autres membres de la famille SRCR du groupe B (Aruffo et al. 1997), chacun des trois domaines SRCR extracellulaires est codé par un exon séparé. L'exon 4 de 63 pb code le petit peptide de connexion riche en résidus proline et thréonine très conservé (74% d'homologie d'aa parmi les espèces de mammifères (Lozano et al. 1999)) séparant les domaines D1 et D2. L'exon 7 code le domaine transmembranaire et les exons 8±10, code la queue cytoplasmique. Le codon stop et le 3'UTR de l'ARNm du CD5 sont contenus dans les exons 10 et 11, respectivement (Figure 10).

Il a par ailleurs été décrit qu'un deuxième exon 1 est exclusivement transcrit dans les lymphocytes B humains et résulte de l'intégration d'un rétrovirus endogène humain (HERV) dans le locus du CD5. Cet exon 1 alternatif, désigné E1B, se trouve à 8,2 kb en amont de l'exon 1 conventionnel, renommé E1A, avec lequel il est exprimé simultanément. Ces 2 exons 1 possèdent leur propre promoteur transcriptionnel et par conséquent s'excluent mutuellement (Renaudineau et al. 2005; Burgueño-Bucio, Mier-Aguilar, et Soldevila 2019). Alors que la transcription de E1A conduit à l'expression d'une molécule CD5 complète transloquée vers la membrane, les transcrits E1B (qui excluent E1A) entraînent le déplacement du site d'initiation de la traduction de l'ATG1 à l'ATG2, situé à 171 nucléotides en aval de ATG1 dans l'exon 3. Ces transcrits E1B, prédominants dans les pré-B sont traduits en une isoforme tronquée de la molécule CD5 dépourvue du peptide signal. Ainsi, les produits des transcrits E1B ne sont pas transloqués vers la

membrane et sont retenus dans le cytoplasme, expliquant ainsi l'absence d'expression de CD5 dans ces cellules (Burgueño-Bucio, Mier-Aguilar, et Soldevila 2019).

L'expression de ces 2 exons 1 dans les lymphocytes B différencie les systèmes humain et murin. Etant donné les preuves de l'intégration de l'exon alternatif E1B au sein du locus du CD5 après la divergence des lignées de singes du Nouveau Monde et de l'Ancien Monde, et avant celle des humains des lignées de singes de l'Ancien Monde, il n'est pas surprenant que l'E1B n'ait pas été retrouvé dans les cellules B de la souris (Renaudineau et al. 2005) (Renaudineau et al. 2005; Burgueño-Bucio, Mier-Aguilar, et Soldevila 2019).

Par ailleurs, les rapports d'analyses des études de SNP (polymorphismes nucléotidiques) ont fourni des preuves d'une sélection récente en Asie de l'Est par la substitution « non synonyme » d'un résidu Alanine en Valine en position 471 (A471V ; rs2229177) qui est situé dans la région cytoplasmique du récepteur CD5. Cette substitution sous-tend une transduction du signal plus efficace en terme d'activation de MAPK et de sécrétion d'IL-8 en réponse aux défis environnementaux, très probablement des agents pathogènes infectieux, dans les populations d'Asie de l'Est (Carnero-Montoro et al. 2012).

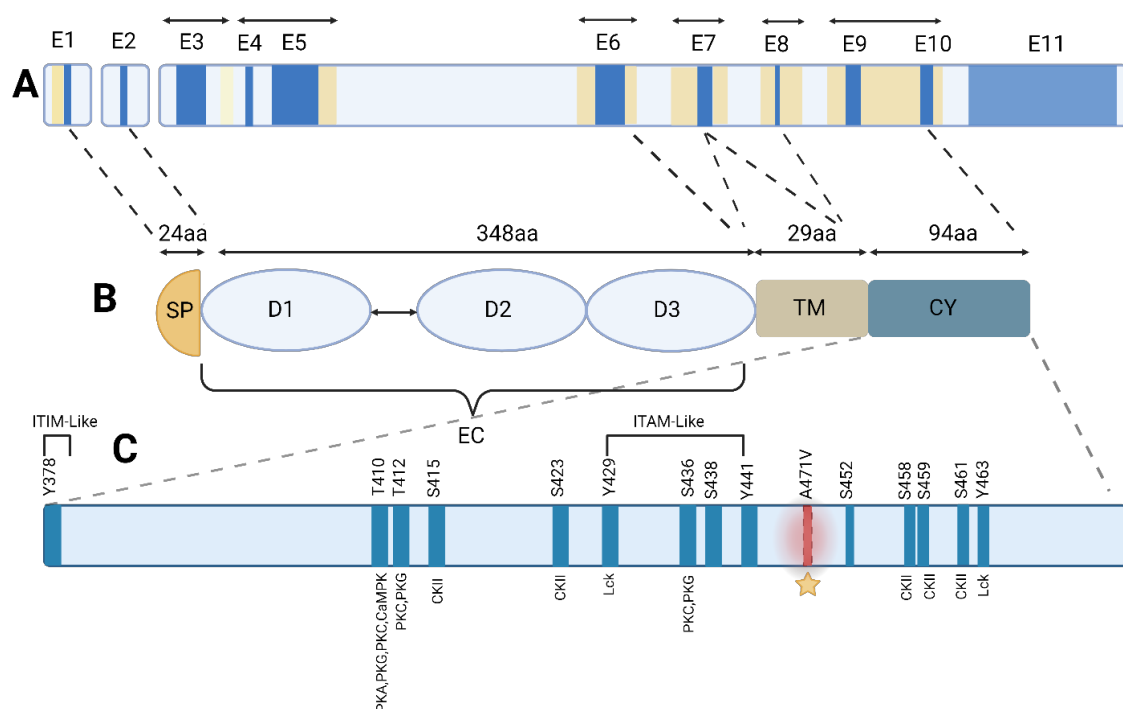


Figure 10 : Structure génique et protéique du récepteur humain CD5. (A) Structure génique du CD5 montrant la position des 11 différents exons. (B) Structure protéique du récepteur CD5. SP, peptide signal ; EC, région extracellulaire ; D1-D2-D3, domaines SRCR extracellulaires ; TM, région transmembranaire ; et CY, région cytoplasmique. (C) Région cytoplasmique montrant des motifs de signalisation conservés et l'emplacement de la substitution A471V. (Figure réalisée avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)) et adaptée selon (Carnero-Montoro et al. 2012) .

La protéine CD5

Le CD5 est une glycoprotéine transmembranaire monomérique de type I de 67 kDa. Il est composé d'un segment extracellulaire de 348 acides aminés (aa) comprenant trois domaines (D1, D2, et D3) de type Récepteur Scavenger Riche en Cystéine (SRCR) (Resnick, Pearson, et Krieger 1994), d'une région transmembranaire de 29 aa, et d'une queue intracellulaire de 94 aa (Nh et al. 1986). Il appartient au groupe B de la superfamille des SRCR qui est divisée en deux groupes (A et B) en fonction du nombre et de la configuration des résidus cystéine présents dans chaque domaine SRCR. Les domaines du groupe A contiennent six résidus cystéine alors que ceux du groupe B en possèdent huit, à quelques exceptions près. Une autre caractéristique distinctive entre les deux groupes est que chaque domaine SRCR des protéines du groupe A est codé par deux exons alors que celui des membres du groupe B ne l'est que par un seul exon (Aruffo et al. 1997).

Le CD5 est exprimé sur la plupart des thymocytes, tous les lymphocytes T matures et un sous-ensemble de cellules B matures susmentionné (Cf. Les lymphocytes B1 (B1-a)) (Hardy et Hayakawa 1994). L'expression de ce marqueur a récemment été décrite dans les ILC retrouvées dans le thymus humain et le sang du cordon ombilical. De plus, il est désormais accepté que le CD5 est un marqueur d'un sous-ensemble de DC2 (DC CD1c+) chez l'homme (He et al. 2023).

Le rôle du CD5 dans la modulation de l'activation des lymphocytes B

Le rôle du CD5 dans la régulation négative de la signalisation du BCR

La fonction principale du CD5 dans les cellules B qui l'expriment consiste en la régulation négative de la signalisation du BCR. Il contribue à imposer des niveaux de seuil des signaux d'activation et maintient ainsi l'équilibre des réponses immunitaires.

Il a d'abord été rapporté par Gary-Gouy et ses collaborateurs que le mécanisme d'inhibition du CD5 est régi par le motif pseudo-ITAM de son domaine cytoplasmique et dépend de la phosphorylation du résidu tyrosine Y429 qui est situé dans le motif DNEY429. En effet, la phosphorylation de la partie cytoplasmique du CD5, qui fait suite à la stimulation du BCR, est essentiellement contrôlée par le résidu Y429 dont le rôle est prépondérant dans les processus d'inhibition des réponses déclenchées par le BCR telles que la mobilisation du Ca^{2+} , l'activation de ERK2 et la localisation membranaire de AKT (Gary-Gouy, Harriague, Dalloul, et al. 2002).

D'autres travaux menés dans les cellules murines B1-a rapportent que le CD5 est constitutivement phosphorylé sur des résidus tyrosine de son domaine cytoplasmique et sert alors de site d'ancrage à la tyrosine phosphatase, SHP-1, avec laquelle il est, en plus du BCR, constitutivement associé. A l'inverse des cellules B2, le CD5 maintient

l'association entre SHP-1 et le BCR de manière prolongée malgré le cross-linking du BCR. Il en résulte une régulation négative des voies de signalisation en aval par l'activité catalytique de SHP-1 (Sen et al. 1999).

Au-delà de la régulation des réponses des lymphocytes B à l'antigène, le CD5 module directement la biologie de ces cellules en régulant au moins trois voies biologiques : le métabolisme, la production de cytokines et la survie cellulaire (Mageed et al. 2012; Taher et al. 2020).

Le rôle du CD5 dans la régulation métabolique des cellules B

Concernant le métabolisme des cellules B1-a, celles-ci sont bio-énergétiquement plus actives que les cellules B2 et présentent des taux plus élevés de glycolyse et de phosphorylation oxydative (Clarke et al. 2018). En effet, le CD5 engage un programme métabolique spécifique dans les cellules B1-a, où il s'associe à la sous-unité p85 de la PI3K pour activer la voie PI3K/Akt/mTOR. L'activation de la sérine/thréonine mTOR résulte dans la régulation de la glycolyse aérobie qui se traduit par l'augmentation de l'absorption du glucose par ces cellules avec l'expression augmentée des transporteurs de glucose (GLUT1) et l'activation des enzymes glycolytiques clés, telles que l'hexokinase. De plus, la sous-unité spécifique Raptor, qui s'associe à mTOR pour former mTORC1, potentialise la glycolyse en induisant l'expression d'HIF1- α alors que l'autre sous-unité spécifique Rictor, qui s'associe à mTOR pour former mTORC2, stabilise mTORC1 améliorant ainsi la glycolyse (Taher et al. 2020; Bystrom et al. 2022; Clarke et al. 2018). L'augmentation du taux de glycolyse dans les cellules B1-a permettra un maintien de leur flux métabolique par le réapprovisionnement en substrats du cycle de Krebs qui alimentera, à son tour, la chaîne respiratoire pour générer de l'ATP (Bystrom et al. 2022). De plus, les cellules B1-a, qui résident dans les cavités séreuses, accumulent des lipides exogènes et conservent des réserves intracellulaires de graisse. Elles contrôlent alors la dynamique de leurs lipides cellulaires en s'engageant dans un programme autophagique afin de garantir la disponibilité de métabolites tels que les acides gras libres, leur permettant d'alimenter davantage le cycle de Krebs (Clarke et al. 2018). Les modifications des propriétés métaboliques que contrôle le CD5 revêtent une importance fondamentale pour la régulation des programmes transcriptionnels des cellules B1-a qui soutiennent ainsi leur état de pré-activation et leur capacité d'auto-renouvellement sous la dépendance de la glycolyse (Clarke et al. 2018).

Le rôle du CD5 dans l'induction de la production de l'IL-10

Comme mentionné précédemment, le CD5 confère également un avantage de survie aux cellules B1-a par deux mécanismes principaux. Premièrement, par un mécanisme de régulation négative de la signalisation précoce du BCR, prévenant ainsi la suractivation et l'apoptose cellulaire. Deuxièmement, par l'augmentation de leur activité métabolique,

assurant ainsi leur capacité d'auto-renouvellement. D'autres études ont également souligné la contribution du CD5 à cet avantage de survie, notamment par la production de la cytokine IL-10 (Clarke et al. 2018; Taher et al. 2020). En effet, les recherches menées par Gary-Gouy et son équipe ont clairement démontré que les cellules B CD5⁺ produisent significativement plus d'IL-10 que leurs homologues B CD5⁻ (Gary-Gouy, Harriague, Bismuth, et al., 2002). Plus récemment, il a été montré qu'indépendamment d'une stimulation par le BCR, le CD5 induit l'expression des gènes codant pour le canal calcique non-sélectif TRPC1 (Canonical Transient Receptor Potential Channel 1) qui conduit à l'augmentation des taux de base de Ca²⁺ intracellulaires. Il en résulte la phosphorylation constitutive de Erk1/2 qui est dépendante du Ca²⁺, de STAT1 et 3, conduisant à la production de la cytokine IL-10 (Garaud et al. 2018). Ainsi, le CD5 conduit de manière constitutive à la production d'IL-10, tout en augmentant également sa production en réponse à la stimulation du BCR (Gary-Gouy, Harriague, Bismuth, et al., 2002; Alhakeem et al., 2015). Cette production d'IL-10 confère des propriétés anti-apoptotiques et assure un avantage de survie aux cellules CD5⁺ par rapport à leurs homologues CD5⁻ (Gary-Gouy, Harriague, Bismuth, et al., 2002). La potentialisation de la production d'IL-10 en réponse à une stimulation du BCR a été étudiée plus finement. Ces études ont révélé que l'engagement du BCR augmente la production de cette interleukine dans les cellules B CD5⁺ péritonéales suite à l'implication de la protéine p38/MAPK qui est constitutivement phosphorylée dans ces cellules. Cette production d'IL-10 contrôle l'expansion de ces cellules en ralentissant leur prolifération en réponse à l'engagement du BCR (Alhakeem et al. 2015).

1.2.2.3 Les lymphocytes B régulateurs

Les lymphocytes B, à savoir les B1 et B2, constituent respectivement une composante essentielle de l'immunité innée et adaptative. Les deux sous-groupes répondent à une vaste gamme de stimulations antigéniques et ont tous les deux la capacité de se différencier en cellules effectrices spécialisées. L'auto-renouvellement des cellules B1 dans la cavité péritonéale et la production permanente des cellules B2 dans la moelle osseuse garantissent la reconstitution et le remplacement des populations dans les tissus périphériques pour maintenir une réponse immunitaire coordonnée et efficace. Pour prévenir à la fois une inflammation excessive et une auto-immunité pathologique, des sous-populations régulatrices comme les cellules B régulatrices (Breg) modulent et résolvent les réponses immunitaires pour le maintien de l'homéostasie après une infection ou une lésion tissulaire.

La fonction suppressive des cellules B a été postulée pour la première fois dans les années 1970 en examinant l'hypersensibilité retardée (HSR) chez les cochons d'Inde. En effet, le transfert de splénocytes déplétés en cellules B est associé à une augmentation de l'intensité et des réactions HSR prolongées chez les cochons d'Inde sensibilisés au

2,4 dinitrofluorobenzene (DNFB) (Turk, Parker, et Poulter 1972). Des études ultérieures ont montré que le transfert adoptif de splénocytes totaux supprime l'intensité de la réponse d'hypersensibilité retardée (Neta et Salvin 1974).

Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette réponse suppressive n'avaient pas été caractérisés. En 1990, une lignée de souris déficiente en cellules B, appelée μ MT, a été établie par la délétion du gène de la chaîne d'immunoglobuline μ entraînant une altération de la différenciation de la lignée des cellules B (Kitamura et al. 1991). Cette avancée a marqué un tournant dans la recherche sur les cellules B régulatrices (Bregs) et l'étude de leurs fonctions suppressives, notamment grâce aux travaux de l'équipe de Charles Janeway, qui ont révélé que ces souris déficientes en cellules B développent une forme exacerbée d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (Wolf et al. 1996). Plus tard, en 2000, trois études ont montré que les cellules B exercent des fonctions suppressives en produisant de l'IL-10 dans divers modèles d'inflammation, y compris la colite (Mizoguchi et al. 2002), l'EAE (Fillatreau et al. 2002) et l'arthrite (Mauri et al. 2003). Ces observations ont ouvert la voie à des recherches ultérieures, comme celles de Natalie A Carter et al., qui ont montré que des souris présentant une délétion spécifique des cellules B pour l'IL-10 affichent une déficience en cellules T régulatrices (Treg) après l'induction d'une auto-immunité. Ces résultats soulignent ainsi l'importance cruciale des cellules B dans le maintien du compartiment des cellules Treg (Carter et al. 2011; Carter, Rosser, et Mauri 2012).

Si le terme Breg décrit la capacité fonctionnelle de ces cellules B à atténuer les réponses immunitaires, il ne définit pas leur nature exacte, à savoir leur phénotype, leur mécanisme de régulation ni leur contexte fonctionnel. En effet, des fractions de cellules Breg sont observées à différents stades de la différenciation B et sont distribuées dans de nombreux organes, que ce soit de manière transitoire ou permanente, en fonction des divers contextes inflammatoires.

L'hétérogénéité des Bregs, associée à l'absence de marqueurs spécifiques permettant leur identification, a poussé les recherches vers une caractérisation plus fine de ces cellules. A ce jour, plusieurs fractions de cellules B phénotypiquement variables ont été identifiées comme étant des Bregs dotées d'une capacité à produire de l'IL-10. En outre, d'autres molécules immunosuppressives et d'autres mécanismes régulateurs, indépendants de l'IL-10, ont également été décrits dans des modèles humains et murins. Pour simplifier cette diversité, les mécanismes régulateurs sont souvent divisés en fonction de la dépendance ou non à l'IL-10 (Yang et al. 2021; Neu et Dittel 2021). Même si tous les sous-ensembles de cellules B ont une capacité de régulation en fonction du contexte, certaines sous-populations sont intrinsèquement mieux adaptées que d'autres.

1.2.2.3.1 Phénotypes des lymphocytes B régulateurs

Chez la souris, les cellules Breg ont été identifiées dans divers organes, comme la rate, les ganglions lymphatiques drainants et la cavité péritonéale. Grâce à des études transcriptomiques comparatives et sur la base du score des gènes immunosuppresseurs, Yang et son équipe (S.-Y. Yang et al. 2021) ont caractérisé 7 sous-ensembles de Bregs qui sont spécifiques des organes et qui sont impliqués dans diverses voies de régulation négative dépendantes ou non des gènes liés à l'IL10. Parmi ces 7 sous-ensembles de cellules B10 ou non-B10, la plus large proportion réside dans la cavité péritonéale et présente la plus forte expansion clonale. Grâce à ces travaux, certains des gènes qui avaient déjà été rapportés dans la littérature (sous-mentionnés) comme des marqueurs des Bregs ont été retrouvés mais ne représentent qu'une partie des cellules Bregs identifiées. Parmi tous les gènes, 19 d'entre eux sont exprimés spécifiquement par les cellules Bregs, notamment *Fcrl5*, *Zbtb20*, *Ccdc28b*, *Cd9* et *Ptpn22*, et sont communs aux cinq organes murins analysés (Figure 11).

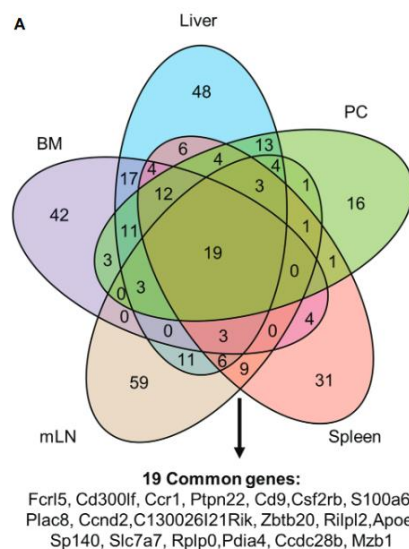


Figure 11: Diagramme de Venn montrant le chevauchement des gènes différentiellement exprimés (DEGs) à la hausse en comparant les cellules Breg avec les cellules non-Breg dans différents organes : BM, Bone Marrow; Liver ; PC, peritoneal cavity ; Spleen ; mLN, mesenteric lymph nodes. Figure adaptée de (Yang et al. 2021).

Plus spécifiquement, l'analyse différentielle des cellules Breg B10 et non B10, a révélé que les « non B10 » expriment à minima l'IL-10 et présentent des scores d'enrichissement élevés pour les effecteurs des voies de signalisation médiées par le TGF- β ou l'IL-35 (S.-Y. Yang et al. 2021).

1.2.2.3.1.1 Les cellules B productrices d'IL-10

De façon générale, il est difficile de déterminer le rôle de ces fractions cellulaires productrices d'IL-10 en tant que Bregs. En effet, leur production d'IL-10 est évaluée suite à des stimulations « artificielles » *ex-vivo* avec des lipopolysaccharides (LPS), des oligodéoxynucléotides contenant des motifs CpG ou encore, de l'acétate de myristate de phorbol (PMA) et de l'ionomycine, qui peuvent affecter les caractéristiques phénotypiques des cellules B et qui ne reflètent pas nécessairement leur comportement « régulateur » *in vivo*.

Cependant, ces approches de stimulation ont permis d'identifier plusieurs populations de Bregs productrices d'IL-10 chez la souris. Notamment les B10 spléniques affectent directement les fonctions effectrices des cellules T par l'intermédiaire de l'IL-10R et inhibent par leur production d'IL-10, la sensibilité des cellules T CD4⁺ à l'IFN γ et au TNF α . Ces B10 diminuent également la différenciation des lymphocytes T en Th17 (Yanaba et al. 2008; Tedder 2015). Les précurseurs B transitionnels 2 de la zone marginale (T2-MZP), qui sont caractérisés par le phénotype CD21^{hi}CD23^{hi}IgM⁺ dans la rate et les ganglions lymphatiques, ont aussi été décrits comme de puissants producteurs d'IL-10 de la même manière que les cellules B de la zone marginale (MZ) de la rate, activées par des cellules apoptotiques via la cascade de signalisation enclenchée par le récepteur Toll-like 9 (TLR9) (Gray et al. 2007). Parmi les cellules B de souris, les plasmablastes sont connus pour produire de l'IL-10 en quantité en absence de stimulation *ex vivo* (Matsumoto et al. 2014). En effet, le facteur de transcription IRF4, nécessaire à la différenciation des plasmablastes, est également impliqué dans la production d'IL-10 qui joue un rôle dans la suppression de l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques (DC) (Matsumoto et al. 2014). Les plasmocytes spléniques produisent, quant à eux, de l'IL-10 *in vivo* dès le premier jour de l'infection à la *Salmonella typhimurium*. Dans ce contexte infectieux, le phénotype des plasmocytes producteurs d'IL-10 est régulé par la voie impliquant MyD88 ; l'IL-10 produite supprime la sécrétion d'IFN γ par les cellules Natural Killer (NK) et empêche l'accumulation de neutrophiles au site de l'infection (Neves et al. 2010; Matsumura, Watanabe, et Fujimoto 2023).

Contrairement à leur distribution hétérogène dans les organes murins, les lymphocytes B producteurs d'IL-10 humains sont principalement retrouvés dans le sang périphérique. Les cellules B transitionnelles immatures (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) constituent la première fraction décrite de cellules Bregs humaines productrices d'IL-10 suite à une stimulation du CD40 (Blair et al. 2010). Une autre fraction de cellules Bregs mémoire humaines (CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺) a également été mise en évidence pour sa puissante production d'IL-10. Bien que les lymphocytes B CD24^{hi}CD38^{hi} et CD24^{hi}CD27⁺ soient capables de produire de l'IL-10 en réponse à une stimulation avec le ligand du CD40 (CD40L), le CpG ou des anticorps anti-BCR, et interfèrent avec la prolifération des cellules T et leur

production de cytokines pro-inflammatoires, les lymphocytes B CD24^{hi}CD27⁺ sont dotés de fonctions régulatrices plus efficaces que les cellules B CD24^{hi}CD38^{hi} (Hasan et al. 2019; Matsumura, Watanabe, et Fujimoto 2023). Enfin, une fraction de plasmablastes (CD24^{hi}CD38^{hi}CD27⁺) présente dans le sang humain a été décrite pour sécréter de l'IL-10, en plus des IgM solubles, après stimulation par l'IL-2, l'IL-6, l'IFN α et le CpG (Matsumoto et al. 2014).

1.2.2.3.1.2 Les cellules B productrices de TGF- β

D'autres sous-ensembles régulateurs sont présents dans le modèle murin, comme la fraction TGF β ⁺CD5⁺ des ganglions lymphatiques, qui favorise la polarisation des lymphocytes TCD4⁺ vers un profil Tregs *in vitro*. De plus, Parekh et son équipe ont démontré que le TGF β produit par les Bregs provoquait l'anergie des cellules T cytotoxiques T CD8⁺ (Parekh et al. 2003).

Chez l'homme, des Bregs producteurs de TGF β ont également été identifiés parmi des cellules B périphériques stimulées avec du CpG. Nouël et al. ont prouvé que ces Bregs sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T conventionnels et d'augmenter l'expression de Foxp3 et CTLA-4 dans les Tregs par la voie de signalisation du TGF β , indépendamment de la voie IL-10 (Nouël et al. 2015).

Cependant, les caractéristiques phénotypiques de ces cellules B TGF β ⁺ restent à être clarifiées.

1.2.2.3.1.3 Les cellules B exprimant le facteur de transcription FOXP3

Chez l'homme, un autre sous-ensemble spécifique de Bregs, caractérisé par l'expression du facteur de transcription FOXP3, a été identifié. Ce sous-ensemble de Bregs joue, entre autres, un rôle crucial dans la tolérance immunitaire vis-à-vis des allergies alimentaires, comme le rapportent les travaux de Noh et ses collaborateurs. En effet, une prolifération des cellules périphériques CD19⁺CD5⁺FOXP3⁺ est observée en réponse à une stimulation par la caséine chez des sujets tolérants au lait, associant ainsi l'émergence de ce sous-ensemble cellulaire chez des personnes dotées de la capacité à tolérer le lait (Noh et al. 2012).

Par ailleurs, Elias et ses collaborateurs ont également mis en évidence l'expression de FOXP3 dans des cellules B périphériques CD25^{high} activées par une stimulation avec du CpG chez des individus sains. Cette expression de FOXP3 est potentialisée par la voie des sémaphorines, dont la semaphorin 3A (Sema3A) (Vadasz et al. 2015).

D'autres travaux ont souligné la présence de FOXP3 dans des cellules B périphériques de donneurs sains. Notamment, les travaux de Grubczak et al. ont mis en évidence l'existence d'une corrélation positive entre la présence, bien que faible, de cellules B FOXP3⁺ et l'expression du marqueur CD38 qui est également associée à la formation de réseaux de connexions complexes entre tous les sous-ensembles de B régulateurs présents chez ces sujets sains (Grubczak et al. 2021).

Des études récentes menées chez la souris sur des cellules B spléniques ont rapporté également l'expression du facteur de transcription FOXP3 dans des cellules B en condition homéostasique. Cette expression est amplifiée par le facteur de transcription RUNX, avec lequel FOXP3 forme un complexe. Cette association réduit l'apoptose des lymphocytes et confère un avantage de survie aux souris exprimant fortement les protéines RUNX/FOXP3 (Chao et al. 2023).

La famille FOX

Les protéines de la famille Forkhead box (FOX) constituent une vaste famille de régulateurs transcriptionnels qui ont en commun un domaine de liaison à l'ADN conservé au cours de l'évolution, appelé "fork head" (FH) domain FOX-DBD. Ce domaine est composé d'environ 100 aa et comprend 3 hélices α - (H1, H2 et H3), 3 feuillets β (S1, S2 et S3) et 2 boucles (W1 et W2), il se lie à la séquence (5'-(G/A)(T/C)(A/C)AA(C/T)A-3') des gènes cibles située sur leurs régions promotrices (Laissue 2019).

Les facteurs de transcription FOX sont également capables de décondenser directement la chromatine, facilitant ainsi la liaison d'autres facteurs de transcription spécifiques aux séquences enhancers, répresseurs et promoteurs, cibles.

Cinquante protéines fork head ont jusqu'à présent été identifiées dans le génome humain. Elles sont catégorisées en 19 sous-groupes, allant de FOXA à FOXS, sur la base de l'homologie de séquence à l'intérieur et à l'extérieur du domaine forkhead (FH) domain FOX-DBD.

La région FOX-DBD/FHD peut être localisée en amino-terminal ou en carboxy-terminal des séquences des membres les mieux caractérisés de la famille (Figure 12), parmi lesquels on retrouve la protéine FOXP3 (Laissue 2019) (Lam et al. 2013; S. Wu et al. 2020).

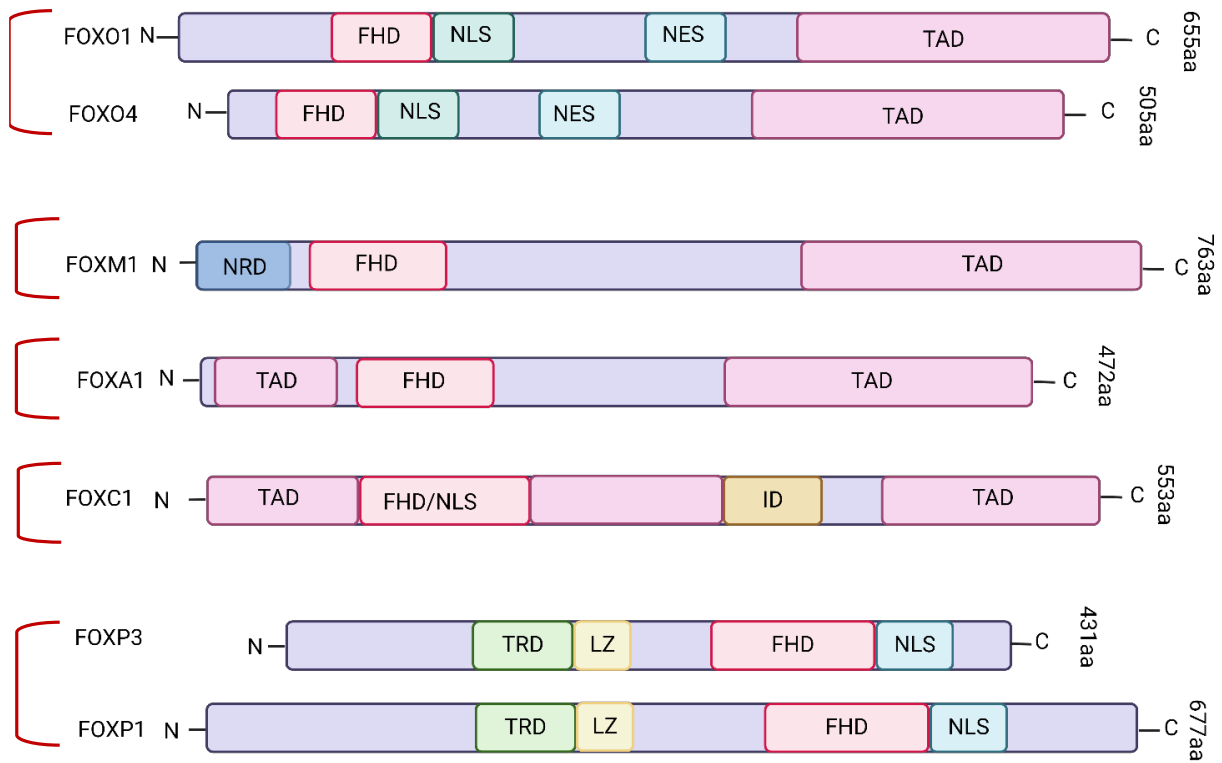


Figure 12 : Organisation structurale des sous-familles FOXO, FOXM, FOXA, FOXC et FOXP. Diagramme schématisant les différents domaines qui caractérisent les protéines de la famille FOX. FHD : Forkhead homology domain, NLS : séquence de localisation nucléaire, NES : séquence d'export nucléaire, TAD : domaine de transactivation. (Figure réalisée avec [BioRender.com](https://www.biorender.com/)) et adaptée selon (Lam et al. 2013).

Le facteur de transcription FOXP3

Le gène et la protéine FOXP3

La protéine Foxp3 (Forkhead box Protein P3) est le facteur de transcription clé qui est impliqué dans le développement des lymphocytes T régulateurs (Treg). Il joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire et permet la stabilité de la lignée Treg.

Le gène *foxp3* humain est situé sur le bras court du chromosome X à la position Xp11.23. Il est constitué de 12 exons et code la protéine FOXP3 qui est composée de 431 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 47 kDa. Cette protéine peut être exprimée sous trois autres isoformes (#2, 3 et 4) qui diffèrent par leur longueur en acides aminés et leur poids moléculaire (Figure 13).

			Amino Acid Composition		Secondary Structure		
Name	Amino Acid Length	Mass [kDa]	Hydrophobic Amino Acids [%]	Hydrophilic Amino Acids [%]	α -Helix	β -Strand	Protein ID
Foxp3	431	47.24	53.60	46.40	12 (26.15%)	10 (6.26%)	Q9BZS1
Isoform2	396	43.41	52.27	47.73	10 (25.25%)	9 (5.55%)	Q9BZS1-2
Isoform 3	456	49.84	53.51	46.49	14 (27.41%)	10 (6.56%)	Q9BZS1-3
Isoform 4	404	44.41	53.47	46.53	12 (24.50%)	11 (7.43%)	Q9BZS1-4

	Foxp3	Isoform 2	Isoform 3	Isoform 4
Foxp3	-	91.88%	80.65%	93.73%
Isoform 2	91.88%	-	86.84%	85.61%
Isoform 3	80.65%	86.84%	-	75.15%
Isoform 4	93.73%	85.61%	75.15%	-

Figure 13 : La protéine FOXP3 et ses isoformes. Table 1, haut) Caractéristiques des propriétés de la protéine Foxp3 et de ses isoformes. Table 2, bas) Le degré d'identité de la séquence d'acides aminés de la protéine Foxp3 et de ses isoformes. *Figure adaptée selon* (Mertowska et al. 2022).

La protéine Foxp3 possède deux domaines fonctionnels importants. Le premier est un domaine « en doigt de zinc » de 26 aa, qui est situé dans la région comprise entre les aa #197 et #222, et qui est directement impliqué dans sa liaison aux séquences d'acides nucléiques (Mertowska et al. 2022). Le second domaine est le domaine « fork-head », qui est long de 87 aa, situé entre les aa #337 et #423, et qui est engagé dans le processus de dimérisation de la protéine Foxp3. Cette dernière comprend également plusieurs autres motifs distinctifs dans sa structure. Deux d'entre eux, situés entre les aa 68-76 et les aa 239-248, sont des signaux d'export nucléaire composés de résidus hydrophobes. Un motif LXXLL, situé entre les aa 92-96, contribue aux nombreuses interactions protéine-protéine qui confèrent à Foxp3 son activité de régulateur transcriptionnel. Un autre motif situé entre les aa 414-417 constitue un signal de localisation nucléaire, qui est chargé positivement et permet l'import nucléaire de Foxp3 (Mertowska et al. 2022). A proximité du domaine en doigt de zinc, se trouve un autre motif « Leucine zipper », localisé entre les aa 239 et 260 et qui permet le processus d'homo- et d'hétéro-dimérisation protéique,

1 MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARPGGTFQGRDLRGGAHASSSS 60

61 LNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQV 120

121 HPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKD 180

181 STLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREM VQ 240

241 SLEQQVLVEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGCCIVAAGSQGPVPAWSGPRE 300

301 APDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTL 360

361 NEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDLELEFRKKKSQR 420

421 PSRCSNPTPGP 431

Legend:

- Nuclear export signal
- LXXLL motif
- Zinc finger domain
- Leucine-zipper
- Fork-head DNA binding domain
- Nuclear localization signal

[illegible]

Le rôle de FOXP3 dans la résolution de l'inflammation

Étant donné le manque de données dans la littérature concernant le rôle de FOXP3 exprimé par les lymphocytes B dans la résolution de l'inflammation dans des conditions homéostatiques, nous aborderons d'abord le rôle de cette protéine dans le modèle bien établi des lymphocytes Tregs. Ensuite, nous explorerons son implication dans les lymphocytes B dans des contextes pathologiques, où son importance pourrait être mieux définie (voir chapitre suivant).

FOXP3 contribue à la résolution de l'inflammation en conférant aux cellules Tregs une structure 3D de la chromatine qui leur est propre. Comme le rapportent les travaux de Liu et al., le rôle essentiel de FOXP3 consiste à contrôler un ensemble d'interactions au niveau de la chromatine et qui est associé à l'expression de gènes dits « FOXP3-dépendants » qui sont liés à la fonction immunosuppressive des cellules Tregs (Liu et al. 2023).

Il a également été démontré que FOXP3 remodèle les loci de ses gènes cibles par l'introduction de modifications des histones. En effet, FOXP3 s'associe aux HAT (Histone acetyltransferases), dont les protéines KAT5/TIP60 et p300, ou aux histones désacétylases 7 (HDAC7). Par ces associations, FOXP3 réprime, entre autres, les gènes codant les cytokines pro-inflammatoires IL-2 et IFN- γ en provoquant la dé-acétylation des histones H3. Il a d'ailleurs été montré que le complexe FOXP3 – TIP60 – HDAC7 est nécessaire pour une répression maximale de la production d'IL-2 dans les cellules T (Lu, Barbi, et Pan 2017) (Mertowska et al. 2022).

Récemment, des études ont illustré que FOXP3 inhibe la présentation antigénique par les DCs en réprimant directement l'expression de RyR2 des lymphocytes T régulateurs (Tregs). Cette répression entraîne une forte diminution de l'oscillation basale du calcium dans les Tregs. En conséquence, le niveau basal de Ca^{2+} devient insuffisant pour activer la m-calpaïne, ce qui compromet le clivage et le recyclage des protéines d'ancrage LFA-1 lorsque les Tregs interagissent avec les cellules dendritiques. Ce phénomène conduit à une adhérence forte et continue des Tregs aux DCs, empêchant ainsi ces dernières d'interagir avec d'autres lymphocytes T conventionnels (X. Wang et al. 2023).

Sur le plan métabolique et à un niveau supérieur de régulation, les travaux de Angelin et al., révèlent que l'expression de FOXP3 reprogramme le métabolisme des lymphocytes Tregs en supprimant les voies glycolytiques et en induisant la phosphorylation oxydative (PHOSOX). Par conséquent, les cellules Treg présentent des niveaux plus élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par rapport aux cellules T conventionnelles (Angelin et al., 2017). Ces ROS augmenteraient la stabilisation de la protéase 3 spécifique de SUMO (SEN3) qui déclencherait la désSUMOylation de Bach2. Cette dernière

empêche son export nucléaire, maintenant ainsi l'expression de FOXP3 et la stabilité des cellules Treg (Shi and Chi, 2019).

2 Inflammation et tumorigénèse

2.1 Les acteurs cellulaires de l'inflammation sous-tendant la tumorigénèse

À mesure que la réponse inflammatoire progresse, les monocytes et les lymphocytes s'accumulent dans les sites inflammatoires. Ce processus, appelé « amplification de l'inflammation » prend fin avec l'apparition de la phase résolutive qui prévient l'infiltration des neutrophiles, réduit la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires et stimule les macrophages pour phagocyter les cellules inflammatoires apoptotiques. L'ensemble de ces événements cellulaires aboutit à la restauration de l'homéostasie tissulaire en atténuant la réponse inflammatoire.

Dans le cas où le stimulus pro-inflammatoire persiste, une inflammation chronique se produit. Celle-ci peut sous-tendre, directement ou indirectement, au développement de nombreuses maladies chroniques telles que l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque chronique, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, l'asthme, le diabète, le psoriasis, l'ostéoporose et le cancer (Bozkurt, Mann, et Deswal 2010; Glass et al. 2010; Kawanishi et al. 2017; Zhao et al. 2021).

Une inflammation chronique est étroitement liée à un risque accru de malignité, puisqu'elle joue un rôle important dans l'initiation, la progression et l'invasion de plusieurs types de cancer. Elle établit un microenvironnement tumoral inflammatoire qui, à son tour, exacerbe l'inflammation en incitant les cellules tumorales ou interstitielles à produire davantage de médiateurs inflammatoires pour assurer leur survie et leur prolifération. Par ces productions, les cellules cancéreuses activent des oncogènes (Mantovani et al. 2008; Zhao et al. 2021), provoquent des dommages à l'ADN et la libération de ROS affectant ainsi plusieurs voies de signalisation, y compris K-RAS, P53 (Coussens et Werb 2002; Zhao et al. 2021) et NF- κ B dont la signalisation régule plus de 500 gènes liés au cancer (Taniguchi et Karin 2018).

De ce fait, près de 20% des cancers ont été associés à une inflammation chronique (Crusz et Balkwill 2015; Zhao et al. 2021). Les facteurs de risque courants associés au développement de ces cancers sont d'étiologie virale et comprennent l'infection par *Helicobacter pylori* dans le cancer gastrique, l'infection par le virus de l'hépatite B ou C dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), l'infection par le virus du papillome humain (VPH) dans le cancer du col de l'utérus ou encore l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) dans le carcinome du nasopharynx (NPC) ou dans certains cancers lymphoïdes (Zhao et al. 2021).

Par ailleurs, de nombreuses études cliniques ont mis en évidence les puissants effets chimio-préventifs des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), en particulier l'aspirine (Cuzick et al. 2009; Zhao et al. 2021). De plus, les effets anti-inflammatoires exercés par les statines réduisent significativement le risque de développement de plusieurs types de cancer, dont le cancer du sein, le cancer colorectal (CCR) et le CHC. Ces constatations

renforcent la notion de carcinogénèse induite par l'inflammation chronique (Poynter Jenny N. et al. 2005; Bonovas, Nikolopoulos, et Sitaras 2013; Zhao et al. 2021). (Figure 15).

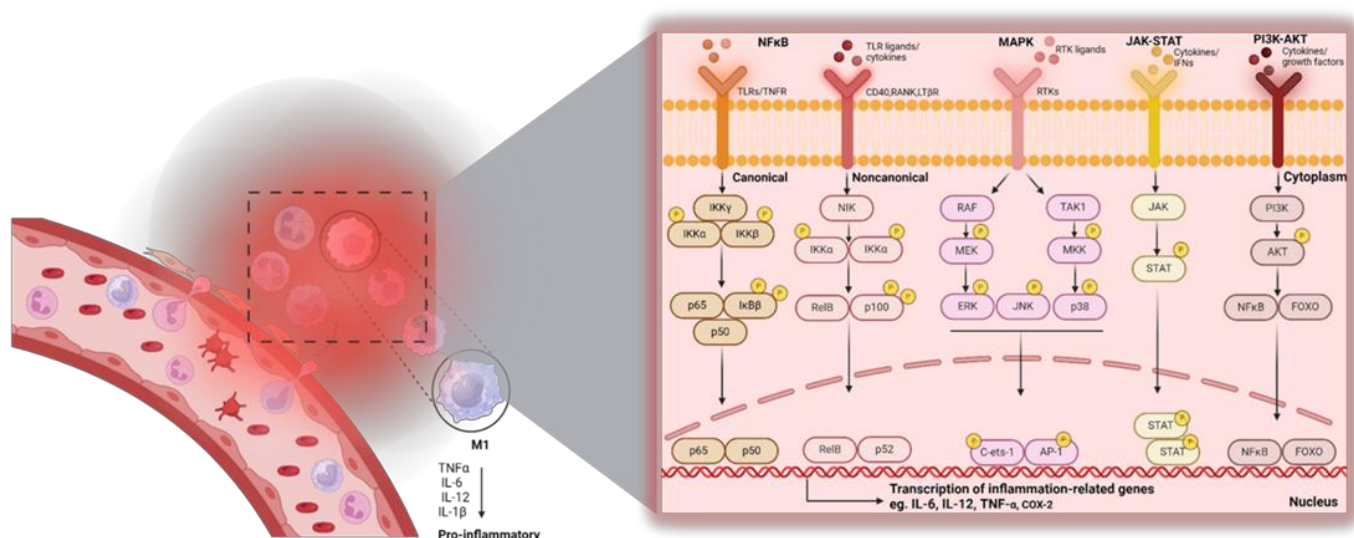


Figure 15 : Les voies de signalisation inflammatoire impliquées dans le développement du cancer. Diverses molécules solubles présentes dans le milieu extracellulaire lient leurs récepteurs dédiés qui sont exprimés à la surface cellulaire. S'en suit l'activation de plusieurs voies de signalisation bien caractérisées (NF-κB, MAPK, JAK-STAT et PI3K-AKT). Ces voies régulent divers facteurs inflammatoires. (Figure réalisée avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)) et adaptée selon (Zhao et al. 2021).

Il a d'ailleurs été démontré que l'obésité, caractérisée par une inflammation systémique chronique à bas bruit, augmente le risque de nombreux types de cancer, tels que le cancer du sein, le CCR, le cancer du foie et le cancer de l'ovaire (Reiche, Nunes, et Morimoto 2004; Avgerinos et al. 2019; Zhao et al. 2021). Ces associations sont attribuées à la capacité du tissu adipeux blanc de sécréter un éventail de molécules inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β et le CCL2 qui peuvent établir un environnement inflammatoire chronique en recrutant des lymphocytes T CD8⁺ et des macrophages (Howe et al. 2013; Zhao et al. 2021). De plus, la perte de l'expression du récepteur PPAR γ par les cellules épithéliales sécrétoires mammaires lors de la transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocytes roses dans le tissu mammaire entraîne la libération de ROS et la sécrétion de chimiokines, comme le CCL5, qui favorisent l'initiation du cancer du sein (Apostoli et al. 2014; Zhao et al. 2021).

L'inflammation chronique à bas bruit est également retrouvée dans la dépression et favorise aussi la tumorigénèse. En effet, le stress chronique déclenché par la dépression, l'anxiété ou la solitude/l'isolement social peuvent également entraîner un remodelage du compartiment immunitaire et de la réponse inflammatoire. Tout d'abord, le stress chronique stimule le

système neuroendocrinien classique, tel que l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HPA), et le système nerveux sympathique (SNS) ce qui entraîne la production des hormones du stress (les glucocorticoïdes et les catécholamines) qui promeuvent la tumorigenèse et le développement du cancer à travers divers mécanismes, comme l'induction de dommages à l'ADN, l'accélération de la dégradation de p53, et l'établissement d'un microenvironnement inflammatoire tumoral (TME). De plus, le stress chronique peut également supprimer sélectivement l'immunité cellulaire médiée par les lymphocytes T $\text{IFN}\gamma^+$ et affaiblir la surveillance immunitaire, augmentant ainsi les risques de métastases et diminuant l'efficacité de la thérapie anti-tumorale (H. Yang et al. 2019; Zhao et al. 2021).

2.1.1 La physiopathologie des cellules B CD5+

2.1.1.1 Dans les maladies auto-immunes

Le répertoire du BCR des cellules B CD5⁺, contrairement à celui des cellules B conventionnelles, est généralement restreint. L'ajout de régions N (Cf. Les lymphocytes B2 producteurs d'immunoglobulines) et l'hypermutation somatique sont très limités au sein des cellules B CD5⁺. Par conséquent, les anticorps naturels dérivés de ces cellules, par opposition à ceux dérivés des cellules B conventionnelles, ont tendance à avoir des séquences proches de celles de la lignée germinale avec des répertoires largement auto-réactifs qui sont fortement impliqués dans les processus auto-immuns. Ceci explique la présence de ces cellules B CD5⁺ dans de nombreuses maladies auto-immunes, telles que le diabète de type 1 (DT1), la polyarthrite rhumatoïde (PR), la spondylarthrite, la myasthénie grave, le syndrome de Sjögren ou le lupus érythémateux systémique (LES) (Ahmed et al. 2018).

Récemment, les cellules B1-a ont été identifiées comme la principale source de production d'IgG spécifiques des phosphatidylsérines (PS), à la fois dans des modèles de lupus murins et chez les patients atteints de LES. Dans cette étude, Ma et al. rapportent que les cascades de signalisation TLR/Syk contrôlent l'expansion des cellules B1a spécifiques des PS et régulent leur production d'anticorps dirigés contre les PS qui sont impliqués dans la progression des lésions rénales lors du développement de la néphrite lupique et qui sont directement corrélés à l'indice d'activité de la maladie (SLEDAI) (Ma et al. 2023).

Des études sur le DT1 rapportent, quant à elles, que les cellules B1-a, par leur répertoire biaisé d'anticorps naturels auto-réactifs, représentent un facteur précoce de l'évolution de la pathogenèse dans le modèle de souris NOD (Non-Obese Diabetic). Ces cellules B1-a sont capables de se lier aux cellules bêta-pancréatiques et d'induire l'expression de Nos2, un élément clé dans la réponse au stress oxydatif des cellules bêta qui sous-tend l'auto-immunité (Côte-Real et al. 2012). Les travaux supplémentaires de Saxena et ses collaborateurs décrivent l'expansion d'une population B CD5⁺FasL^{hi} chez les sujets atteints de DT1. Cette population antagonise l'action des cellules B CD5⁺IL-10⁺ dans le contrôle de l'auto-réactivité des îlots et

est directement impliquée dans l'initiation de l'insulite et du diabète auto-immun dans le modèle de souris NOD (Saxena et al. 2017).

Dans la lèpre lépromateuse (LL), des niveaux élevés de B CD5⁺ sont retrouvés chez les patients et sont associés à une gamme d'autoanticorps, à la fois organes-spécifiques (dirigés contre la thyroïde, les nerfs et la muqueuse gastrique) et organes non-spécifiques, tels que le facteur rhumatoïde, les anticorps anti-cardiolipine ou encore les anti-phospholipides présents dans 50% des cas et pouvant conduire à un anticoagulant lupique (Kotb et al. 2019).

A l'inverse, chez les adolescentes souffrant d'anorexie mentale, des pourcentages significativement réduits de cellules B circulantes CD5⁺, à la fois transitionnelles (B CD24⁺CD38^{hi}) et régulatrices (CD5⁺CD1d⁺), ont été observés dans le sang périphérique. Il est à noter que l'anorexie mentale partage une relation bidirectionnelle avec les maladies auto-immunes. En effet, si des antécédents d'auto-immunité, comme le diabète sucré de type 1, sont associés à un risque accru de troubles de l'alimentation, l'anorexie mentale peut à son tour augmenter le risque ultérieur de maladies auto-immunes liées au tractus gastro-intestinal. De manière intéressante, les cellules B transitionnelles des patientes atteintes d'anorexie mentale expriment des niveaux plus faibles de CD5. Cette basse expression des cellules transitionnelles, associée à la fréquence des cellules B régulatrices CD5⁺CD1d⁺, constitue un facteur prédictif significatif de l'indice de masse corporelle (Freff et al. 2021). Cependant, dans cette étude, les auteurs ont lié la diminution de ces deux sous-populations à un dysfonctionnement du compartiment des cellules B régulatrices, qu'ils ont associé au risque accru de développer une auto-immunité dans l'anorexie mentale. Nous examinerons la physiopathologie des cellules B régulatrices dans les maladies auto-immunes dans la prochaine section.

Il a été démontré que le virus de l'hépatite C (VHC), par son caractère lymphotrope est associé à des maladies lymphoprolifératives bénignes telles que la cryoglobulinémie mixte (MC). Cette dernière se caractérise par la sélection de clones B produisant des IgM auto-réactives soutenant l'auto-immunité et présentant un potentiel d'évolution maligne. Dans leur étude Russi et al. rapportent l'expansion clonale d'une population de cellules B CD5⁺CD220^{dim} qu'ils désignent comme « CLL-like » dans le sang périphérique des patients infectés et qui est directement corrélée à la manifestation de la MC. Ils suggèrent ainsi, que le VHC soutient l'expansion clonale des cellules B CD5⁺ et stimule leur production d'IgM auto-réactives soutenant l'auto-immunité avec une évolution potentielle vers les lymphomes non hodgkinien (LNH) de type B (LNH-B) (Russi et al. 2019).

2.1.1.2 Dans les cancers

Le maintien des populations de lymphocytes B auto-réactifs semble, d'un point de vue évolutif, contreproductif car cela représente une dépense énergétique importante ainsi qu'un risque de pathologie auto-immune, préjudiciable à l'hôte. En revanche, l'élimination de tous ces lymphocytes B auto-réactifs est susceptible de créer de grandes lacunes dans le répertoire des lymphocytes B qui pourraient être exploitées par les agents pathogènes. Ainsi, leur préservation à travers l'évolution suggère qu'ils remplissent une fonction immunitaire critique et bénéfique (McCaw, Lofftus, et Crompton 2023).

Dans les cancers, une rupture de la tolérance peut fournir une réponse antitumorale bénéfique. En effet, il a été démontré que l'auto-immunité associée au cancer présente une valeur pronostique positive dans plusieurs contextes. Par exemple, les patients qui développent des manifestations auto-immunes spécifiques d'organes suite à un traitement avec des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (immune checkpoints (ICI)), ont une meilleure réponse au traitement. De plus, les patients qui développent des syndromes paranéoplasiques ou une auto-immunité spontanée ont également de meilleurs résultats. De manière intéressante, les patients atteints de maladies auto-immunes préexistantes, qui affectaient des organes devenus cancéreux, présentaient des tumeurs réduites et moins invasives, comme dans le cancer de la thyroïde survenant dans le contexte d'une thyroïdite (McCaw, Lofftus, et Crompton 2023). Cet avantage réside dans la capacité des lymphocytes B auto-réactifs à produire des anticorps dirigés contre les antigènes tumoraux. Ces antigènes désignés comme quasi-auto-réactifs possèdent souvent des structures étroitement similaires à celles des antigènes du soi. Parmi ces derniers, les néo-antigènes sont des protéines natives surexprimées ou exprimées de manière ectopique ou encore des protéines dont les modifications post-traductionnelles sont altérées. Les auto-anticorps ont d'ailleurs été suggérés comme des biomarqueurs pronostiques dans les stades précoces de plusieurs types de cancer.

Le potentiel antitumoral, inhérent aux propriétés susmentionnées des lymphocytes B CD5⁺, en particulier ceux utilisant la séquence biaisée VH4-34 dont les anticorps sont intrinsèquement auto-réactifs, a été documenté dans plusieurs types de cancers. En effet, ces lymphocytes B CD5⁺ ont une propension à se lier aux antigènes glucidiques, et donc à reconnaître les motifs de glycosylation aberrante et de modifications post-traductionnelles spécifiques aux tumeurs comme démontré dans les cancers de l'estomac, du côlon, du pancréas, de l'œsophage, du poumon, de la prostate, du sein et de la peau (mélanome) (Brändlein et al. 2003; McCaw, Lofftus, et Crompton 2023). De manière intéressante, les anticorps produits ne se lient pas aux tissus normaux adjacents mais seulement aux tissus précancéreux et cancéreux dans lesquels ils sont capables d'induire l'apoptose dans des cultures *in vitro*. McCaw et al. proposent ainsi que les B CD5⁺ subissent une « rédemption » ou mutation somatique clonale extra-folliculaire

additionnelle qui diminue l'affinité pour les auto-antigènes et accroît l'avidité de leurs anticorps IgM pour les protéines tumorales. Ils peuvent ainsi atténuer les effets auto-immuns indésirables en orientant la réponse immunitaire vers les antigènes spécifiques des tumeurs ce qui expliquerait la présence d'anticorps réactifs aux antigènes tumoraux (quasi auto-réactifs) chez les patients atteints de cancer sans qu'ils ne manifestent d'auto-immunité systémique (McCaw, Lofftus, et Crompton 2023).

Notamment, les récentes études sur les cancers de l'ovaire, qui sont très souvent d'origine épithéliale et qui métastasent majoritairement dans le péritoine (Yousefi et al. 2020), ont mis en évidence la perte de cellules B1 péritonéales et la persistance de cellules B2 conventionnelles au niveau des ascites hémorragiques. Les auteurs attribuent cette perte de cellules B1 à la génération d'une grande quantité de DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), qui est susceptible de submerger l'immunité innée en entraînant un épuisement de ces cellules et leur élimination. Les auteurs attribuent également cette perte cellulaire à la charge métabolique importante qui leur est imposée et qui surpasserait leur capacité à contrôler les peroxydes lipidiques qui conduisent à une ferroptose spécifique des cellules B1 et pas des cellules B2 dont les capacités antioxydantes sont supérieures (Muri et al. 2019). Dans cette étude Maslanka et ses collaborateurs rapportent que la perte des cellules B1 observée dans le modèle murin du cancer ovarien est corrélée à l'afflux des cellules myéloïdes immunosuppressives MDSC (myeloid-derived suppressor cell), une caractéristique retrouvée dans le cancer ovarien humain. De plus, la réduction du nombre de ces cellules B dans l'ascite des patientes est également corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer ovarien (Maslanka et al. 2024).

Paradoxalement, un rôle pro-tumoral des lymphocytes B CD5⁺ a également été décrit dans divers cancers, notamment dans l'adénocarcinome ductal pancréatique où des stimulations inflammatoires impliquant la signalisation de l'IL-1 et de ses effecteurs (Myd88 et IRAK-1) conduisent à la phosphorylation de BTK (Bruton's Tyrosine Kinase). Cette phosphorylation promeut la différenciation et l'expansion des populations CD1d^{hi}CD5⁺ qui sont impliquées dans le développement des néoplasies pancréatiques en inhibant l'activité des lymphocytes T cytotoxiques et en stimulant la prolifération cellulaire tumorale par leur production d'IL-10 et d'IL-35 (Das et Bar-Sagi 2019). Ces résultats corroborent les travaux de Dalloul et ses collaborateurs sur les cellules B CD5⁺ qui ont rapporté que les lymphocytes B, bien que pénétrant rarement dans les tumeurs solides, étaient préjudiciables à l'immunité anti-tumorale. En effet, chez des souris déficientes en lymphocytes B, une immunité T spécifique aux tumeurs caractérisée par la production d'IFN γ a été observée, contrairement aux souris sauvages. Cette inhibition par les lymphocytes B, chez les souris sauvages, est associée à leur expression d'IL-10 (Dalloul 2009).

Cependant, ce potentiel pro-tumoral des lymphocytes B CD5⁺ semble découler de leurs propriétés immuno-régulatrices, lesquelles seront examinées en détails dans la section suivante.

2.1.2 La physiopathologie des lymphocytes B régulateurs

2.1.2.1 Dans les maladies auto-immunes

Les lymphocytes B régulateurs (Bregs) ont la capacité de sécréter des cytokines anti-inflammatoires et d'exprimer des molécules inhibitrices, afin de supprimer l'activité des cellules effectrices et prévenir une inflammation excessive, comme celle caractérisant les maladies auto-immunes.

Les Bregs exercent des effets inhibiteurs par l'intermédiaire de l'IL-10, l'IL-35, des TGFbs et l'axe PD-1/PD-L1 chez les patients atteints de maladies auto-immunes et dans les modèles murins. La relation inverse entre l'activité de la maladie et celle des Bregs suggère que ces cellules jouent un rôle protecteur dans les maladies auto-immunes.

Par exemple, les patients atteints de **lupus érythémateux systémique (LES)** présentent des déficiences fonctionnelles des Bregs. En effet, si les cellules B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, qui ont été isolées à partir d'individus sains, montrent une fonction régulatrice vis-à-vis des cellules T CD4⁺ en inhibant leur expression en IFN γ et TNF α , les cellules B de même phénotype provenant de patients LES ont perdu cette capacité (Blair et al. 2010; Zhu et al. 2021). De plus, les pDCs (cellules dendritiques plasmacytoïdes) issues de donneurs sains sécrètent de l'IFN α , qui induit la production d'IL-10 par les cellules B, entraînant ainsi une suppression de la production d'IFN α par les pDCs. Cependant, ce mécanisme de rétroaction négative est déficient chez les patients atteints de LES car leurs pDCs produisent des niveaux relativement plus élevés d'IFN- α et favorisent la différenciation des plasmablastes (Menon et al. 2016; Zhu et al. 2021; Zheremyan et al. 2024).

Un autre exemple de pathologie montrant des Bregs aux fonctions altérées, est celui de la **polyarthrite rhumatoïde (PR)**, une maladie auto-immune inflammatoire chronique caractérisée par une hyperplasie synoviale. Malgré leur fonctionnement diminué, la présence de ces Bregs est négativement corrélée au DAS28 (score d'activité de la maladie) (Daïen et al. 2014; Zacca et al. 2018; Zhu et al. 2021). Dans un modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA), la présence de cellules B exprimant FoxP3 améliore l'arthrite auto-immune en régulant l'équilibre entre les cellules T régulatrices (Treg) et les cellules Th17 (Park et al. 2016; Zhu et al. 2021).

Dans le cas de **la maladie de Basedow et de la thyroïdite de Hashimoto**, qui sont deux troubles thyroïdiens auto-immuns (AITD) courants et caractérisés par la présence d'anticorps anti-thyroïde circulants, une réduction du nombre de cellules B10 a été observée (Stožek et al. 2020; Zhu et al. 2021). Des constatations similaires ont été rapportées dans la **rétinopathie thyroïdienne (TAO)**, pathologie dans laquelle les PBMCs de patients stimulés par le CD40L et le CpG montrent une diminution de la fréquence des cellules B10 par rapport aux témoins sains (Ding et al. 2018; Zhu et al. 2021).

Les cellules B régulatrices de patients atteints de **diabète de type 1 (DT1)** présentent, elles aussi, une diminution de leur pourcentage et une altération de leurs fonctions. En effet, le pourcentage de Bregs CD24^{hi}CD38^{hi} est diminué chez ces patients et leur production d'IL-10 en réponse à une stimulation (PIB), est nettement plus faible que celle mesurée sur des Bregs isolés de sujets sains (Y. Wang et al. 2020; Zhu et al. 2021). D'autres travaux sur le modèle pathologique murin de DT1 ont mis en évidence l'existence d'une population Breg FasL⁺, capables de produire du TGF- β , dont la fonction consiste à protéger contre le diabète auto-immun en régulant à la baisse les réponses Th1 et en inhibant la présentation antigénique par les APCs (Tian et al. 2001; Zhu et al. 2021).

Dans la **sclérose en plaques (SEP)**, une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique du système nerveux central (SNC), la production d'IL-10 par les Bregs des patients atteints de SEP récurrente-rémittente (SEP-RR) est altérée (Knippenberg et al. 2011; Zhu et al. 2021). De manière intéressante, une rémission partielle de la SEP a été obtenue avec le Fingolimod et le Siponimod ciblant les récepteurs à la sphingosine 1-phosphate (S1PR). Ces traitements s'accompagnent d'une augmentation du pourcentage de Bregs, comprenant des Bregs CD24^{hi}CD38^{hi}, CD43⁺CD27⁺ et TGF- β (Blumenfeld-Kan, Staun-Ram, et Miller 2019; Q. Wu et al. 2020). Ces résultats font écho aux travaux de Bjarnadóttir et ses collaborateurs qui révèlent l'importance des Bregs TGF- β ⁺ dans un modèle expérimental d'Encephalomyélite Auto-immune (EAE) dans lequel les souris déficientes en Bregs TGF- β ⁺ montrent un amorçage plus précoce des symptômes neurologiques par rapport aux souris témoins, associé à une augmentation des réponses Th1/17 du SNC (Bjarnadóttir et al. 2016; Zhu et al. 2021).

Dans le **syndrome de Sjögren primaire (pSS)**, une maladie auto-immune chronique caractérisée par une inflammation des glandes salivaires et lacrymales, Lin et ses collaborateurs démontrent une augmentation de la fréquence des Bregs CD24^{hi}CD38^{hi}. Cependant, ces Bregs présentent une altération de leurs fonctions régulatrices (W. Lin et al. 2014), notamment vis-à-vis des réponses des cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh) et des cellules T régulatrices folliculaires (Tfr) ; les Tfh étant positivement corrélées à la gravité du pSS et négativement corrélées au nombre de cellules B IL10⁺CD24⁺CD38^{hi} chez les patients (Zhu et al. 2021).

Les travaux sur le « homing » cutané des Bregs, qui dépend de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et dont le rôle est crucial dans la résolution de l'inflammation cutanée, soutiennent l'idée que les Bregs sont des acteurs cellulaires critiques de l'environnement cutané dans les maladies inflammatoires de la peau (Aira et Debes 2021). Cette idée est confortée par les données de la littérature qui décrivent le rôle bien établi des TGF- $\beta 1$ et TGF- $\beta 2$ dans la cicatrisation des plaies (Profyris, Tziotziou, et Do Vale 2012; Zheremyan et al. 2024) ou qui démontrent le rôle des Bregs dans la suppression de la production de CCL5 par l'épiderme cutané, empêchant ainsi l'infiltration des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs dans la peau (Schioppa et al. 2011; Zheremyan et al. 2024).

Ainsi, plusieurs pathologies cutanées ont été associées à une diminution des pourcentages et des fonctions des Bregs (Zheremyan et al. 2024), comme dans les ulcérations cutanées associées à l'inflammation à bas bruit dans le **diabète de type 2** (DT2). En effet, les patients DT2 montrent de faibles pourcentages de Bregs et une cicatrisation des plaies retardée (Sîrbulescu et al. 2017; Mendez-Frausto et al. 2021; Zheremyan et al. 2024).

Ces observations sont valables pour le **psoriasis**, une maladie auto-immune affectant la peau, les ongles et les articulations. Chez les patients, un faible nombre de cellules B10 périphériques est retrouvé et ce compte cellulaire est inversement corrélé au score PASI (Psoriasis Area and Severity Index) (Mavropoulos et al. 2017). Dans ce contexte, le rapport de Kersh et Feldman met en exergue le rôle des Bregs dans la suppression de l'inflammation psoriasique médiée par l'IL-23 en favorisant l'expansion des Tregs au détriment des Th17. Ce mécanisme expliquerait, en partie, l'inefficacité de certaines thérapies de déplétion des cellules B qui sont associées à une exacerbation du psoriasis (Kersh et Feldman 2018; Zheremyan et al. 2024).

Une diminution du pourcentage de B10 a également été décrite et associée à la sévérité de la **sclérodermie systémique**, une maladie auto-immune chronique qui affecte la peau et les organes internes. Elle se caractérise par la production et le dépôt excessifs de collagène qui entraînent un durcissement et un épaississement de la peau mais aussi d'autres tissus (Matsushita et al. 2016; 2018; Zheremyan et al. 2024).

A l'inverse, dans le **lupus érythémateux cutané** (LEC), une manifestation cutanée fréquente du lupus érythémateux systémique (LES, cf. ci-dessus, survenant dans 80% des cas), des pourcentages élevés de cellules B10 sont retrouvés chez les patients atteints. Malgré une forte localisation cutanée, ces B10 ont des fonctions immunorégulatrices altérées (Méndez-Flores et al. 2016; Zheremyan et al. 2024).

Une telle augmentation du pourcentage de B10 chez les patients, associée à une altération de leurs fonctions immunosuppressives est observée dans le **pemphigus**, une dermatose auto-immune intra-épidermique caractérisée par des auto-anticorps généralement dirigés contre les desmoglénines 1 et 3 (Hébert et al. 2019; Zheremyan et al. 2024).

Enfin, dans la **dermatomyosite (DM)**, une maladie auto-immune affectant principalement la peau et les muscles, une diminution du nombre de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} est observée dans le sang périphérique des patients. L'étude de Li et al. a montré que les patients DM qui sont positifs pour des auto-anticorps spécifiques de la myosite (MSA Myositis-specific autoantibody) ont un pourcentage plus faible de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} que les patients MSA-négatifs, soutenant le rôle de ces Bregs dans le contrôle de la production d'auto-anticorps (Li et al. 2016; Zheremyan et al. 2024).

Le rôle des Bregs dans la pathogenèse de ces affections auto-immunes cutanées, tel que décrit dans les passages précédents, est illustré dans la figure 16.

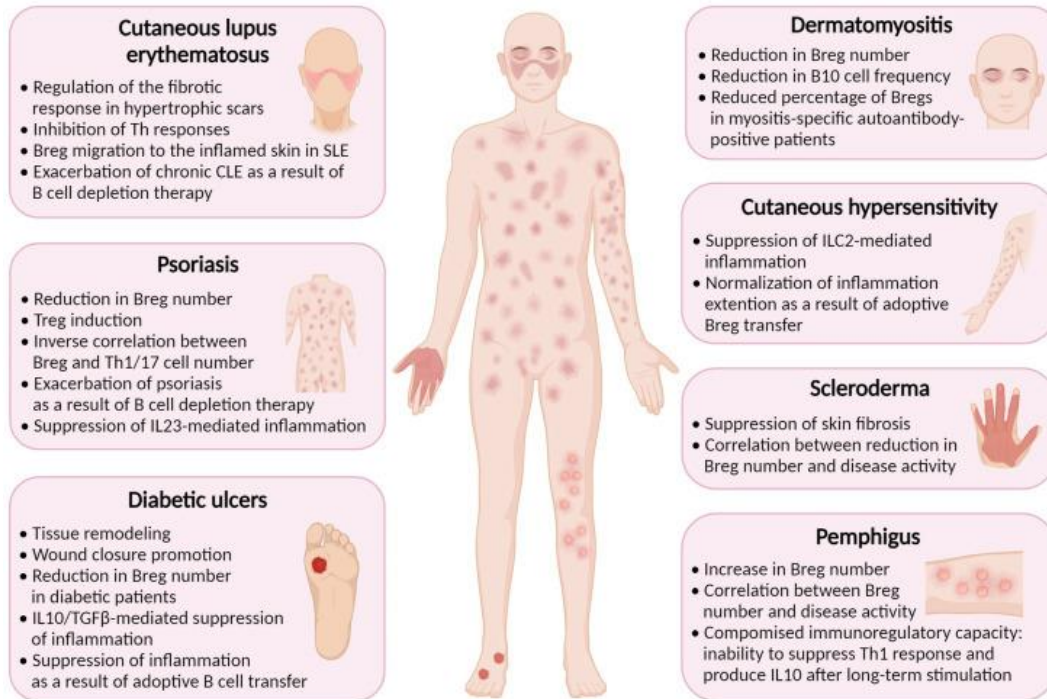


Figure 16 : Rôle des Bregs dans la pathogenèse des affections auto-immunes cutanées.
Figure adaptée de (Zheremyan et al. 2024).

2.1.2.2 Dans les cancers

L'expression déséquilibrée de facteurs pro-inflammatoires associés au cancer est un élément clé dans la subversion des réponses immunitaires et incline la balance entre l'immunité et la tolérance. Cette inflammation tumorale a d'ailleurs été décrite comme augmentant le nombre de lymphocytes B régulateurs, soit par expansion d'une population existante, soit par l'induction de la différenciation des lymphocytes B naïfs en un phénotype B régulateur. Cette plasticité fonctionnelle des TABs (B associés aux tumeurs) est dépendante des stades de la pathologie. En effet, leur présence est associée à un pronostic favorable au début de la pathologie mais à un pronostic défavorable dans les stades les plus avancés de la maladie, comme le rapportent les études sur les cancers oro- et hypo-pharyngés chez l'Homme (Y. Wei et al. 2021). Ces conclusions suggèrent une éducation des lymphocytes B conventionnels en Bregs dont les fonctions régulatrices intrinsèques seront détournées par les cellules tumorales pour favoriser une immunosuppression locale puis systémique qui contrecarre directement l'impact d'une immunothérapie.

Dans ce contexte, Das et Bar-Sagui ont démontré qu'une costimulation des cellules B *in vitro* avec de l'IL-6 et de l'IL-1 β , associée à un agoniste α -CD40, entraîne une augmentation significative de l'expression des sous-unités de l'IL-35 (p35 et Ebi3) et de l'IL-10. Ces résultats suggèrent que les cytokines inflammatoires, qui sont associées au cancer, favorisent la fonction et l'expansion des cellules B régulatrices dans le cancer du pancréas (Das et Bar-Sagi 2019).

De plus, Yoshizaki et al. rapportent que l'IL-21 recombinante, une autre cytokine pro-inflammatoire, augmente significativement la fréquence des cellules régulatrices B10 *in vitro* (Yoshizaki et al. 2012; Michaud et al. 2021) et que son administration à l'intérieur des tumeurs de divers carcinomes humains active les cellules B et favorise le phénotype régulateur IL-10⁺ CD25⁺ et IDO⁺ (Lindner et al. 2013; Michaud et al. 2021).

Plusieurs rapports mettent en évidence une augmentation des phénotypes B régulateurs dans les cancers. En effet, les B10 CD24⁺CD38⁺ ont été caractérisés dans les cancers gastriques et sont associés à une augmentation du nombre de Tregs. La présence de cette population Bregs est également décrite comme étant plus importante dans les tissus mammaires et le sang périphérique des patientes atteintes d'un carcinome mammaire invasif que chez les patientes présentant des tumeurs bénignes ou des sujets sains (W. Wang et al. 2015; Guan et al. 2016; Shang, Zha, et Sun 2020).

Ces Bregs interagissent avec les autres cellules du compartiment immunitaire qui infiltrant la tumeur pour atténuer les réponses antitumorales et faciliter la progression tumorale. Parmi leurs mécanismes d'actions, il existe une inhibition directe des réponses des lymphocytes T effecteurs. Les travaux *in vitro* de Linder et al. décrivent un blocage de la réponse des T effecteurs suite à la dégradation de la chaîne ζ du TCR qui est causée par les Bregs GrB⁺ ; ces

derniers sont retrouvés dans les carcinomes du sein, de l'ovaire, du col de l'utérus, du côlon et de la prostate (Lindner et al. 2013; Shang, Zha, et Sun 2020).

D'autres études *in vitro* sur le cancer du col de l'utérus révèlent l'impact de la production de l'IL-10 par les B10 tumoraux sur la réduction des lymphocytes cytotoxiques T CD8⁺ (Z. Chen et al. 2019; Shang, Zha, et Sun 2020). De plus, les B10 sont capables d'inhiber l'activation des macrophages réduisant ainsi l'efficacité de déplétion des lymphomes lors des immunothérapies ciblant CD20 et dépendante du FcγR (Horikawa et al. 2011; Horii et Matsushita 2021).

En plus de cibler les T effecteurs, les Bregs favorisent également l'expansion des Tregs pour créer un microenvironnement immunosuppresseur. Dans le cancer gastrique, les Bregs régulent positivement l'expression de Foxp3 des lymphocytes T effecteurs CD4⁺CD25⁻ par l'intermédiaire du TGF-β1 (W. Wang et al. 2015; Shang, Zha, et Sun 2020). De plus, les Bregs dérivés de la moelle osseuse inhibent la lyse médiée par les cellules NK dans le myélome multiple (L. Zhang et al. 2017; Shang, Zha, et Sun 2020). Ils atténuent par leur production d'adénosine, la phosphorylation de BTK et l'entrée de Ca²⁺ des cellules B effectrices dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (HNSCC) (Jeske et al. 2020).

Il a également été montré que l'augmentation des cellules B10 dans les ascites des patientes atteintes de cancer de l'ovaire est non seulement associée à des stades avancés de la maladie, mais aussi corrélée aux fréquences des cellules T CD4⁺ FoxP3⁺ et inversement corrélée à celles des cellules T CD8⁺ IFNγ⁺, (X. Wei et al. 2016; Michaud et al. 2021).

Outre l'interaction des Bregs avec les autres cellules immunitaires infiltrantes, ces lymphocytes peuvent également interagir directement avec les cellules tumorales, comme celles du cancer du foie. Par le biais de la voie de signalisation impliquant le couple CD40/CD154, ils favorisent la croissance et l'invasion du carcinome hépatocellulaire, comme le rapporte l'étude *in vitro* de Sha et ses collaborateurs sur les Bregs CD19⁺CD24⁺CD38⁺ isolés à partir de patients atteints de CHC (Shao et al. 2014; Shang, Zha, et Sun 2020). Les interactions entre les Bregs et les cellules tumorales permettent aux deux partenaires cellulaires de se réguler « en trans » dans le microenvironnement tumoral. En effet, alors que les cellules Bregs favorisent la croissance de la tumeur et son caractère invasif, les cellules tumorales du myélome multiple par exemple inhibent l'apoptose des cellules Bregs dans la moelle osseuse (L. Zhang et al. 2017). De même, les cellules cancéreuses du sein produisent des métabolites de la voie de la 5-lipoxygénase pour activer le récepteur PPARα, ce qui entraîne la génération des Bregs et favorise les métastases pulmonaires (Wejksza et al. 2013; Shang, Zha, et Sun 2020). En effet, les Bregs sont associés à de nombreux facteurs clinico-pathologiques et peuvent servir de facteur pronostic de la survie des patients. Leur pourcentage est corrélé au stade clinique et aux récurrences locale et régionale dans le cas du carcinome épidermoïde de la langue (Zhou et al. 2016). Dans les hémopathies malignes, comme la leucémie myéloïde aiguë (AML), l'augmentation de leur fréquence est associée à une survie plus courte chez les patients plus âgés (Lv, Wang, et Liu 2019; Shang, Zha, et Sun 2020). La fréquence des Bregs circulants est aussi significativement

corrélée aux stades FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique), aux métastases ganglionnaires, à la différenciation tumorale, à l'infection par le papillomavirus humain (HPV) et aux métastases tumorales du cancer du col de l'utérus (Z. Chen et al. 2019).

Qian et al. ont par ailleurs montré que les Bregs influencent la progression du cancer de l'œsophage. En effet, la proportion de cellules Bregs (B10) $CD19^+CD5^+$ dans le sang périphérique des patients atteints d'un carcinome de l'œsophage aux stades III-IV est plus élevée que celle des patients aux stades I-II, elle-même plus élevée que celle des témoins sains (Qian et al. 2015; Horii et Matsushita 2021). De même, une plus haute fréquence de cellules Bregs est observée chez les patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) à un stade avancé, par rapport aux patients atteints d'un CHC à un stade précoce (J.-C. Lin et al. 2010; Horii et Matsushita 2021).

Dans le cancer de la prostate, Shalpour et al ont identifié une population infiltrante de plasmocytes B10 IgA^+PD-L1^+ qui inhibent la régression tumorale induite par la chimiothérapie (Shalpour et al. 2015; Michaud et al. 2021), alors que dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), la tumorigénèse est favorisée par l'expression de l'IL-35 (pas celle de l'IL-10) dans les lésions humaines de PDAC et dans un modèle murin de PDAC qui est induit par l'oncogène Kras (Pylayeva-Gupta et al. 2016; Michaud et al. 2021). Il a de plus été montré que la plupart des cellules B $IL-35^+$ se trouvent dans des agrégats lymphoïdes tertiaires qui présentent des pourcentages plus faibles de lymphocytes T $CXCR3^+CD8^+$, mettant en évidence le rôle de l'IL-35 dans l'exclusion des lymphocytes T $CD8^+$ du microenvironnement tumoral dépendante de STAT3 (Mirlekar et al. 2020; Michaud et al. 2021).

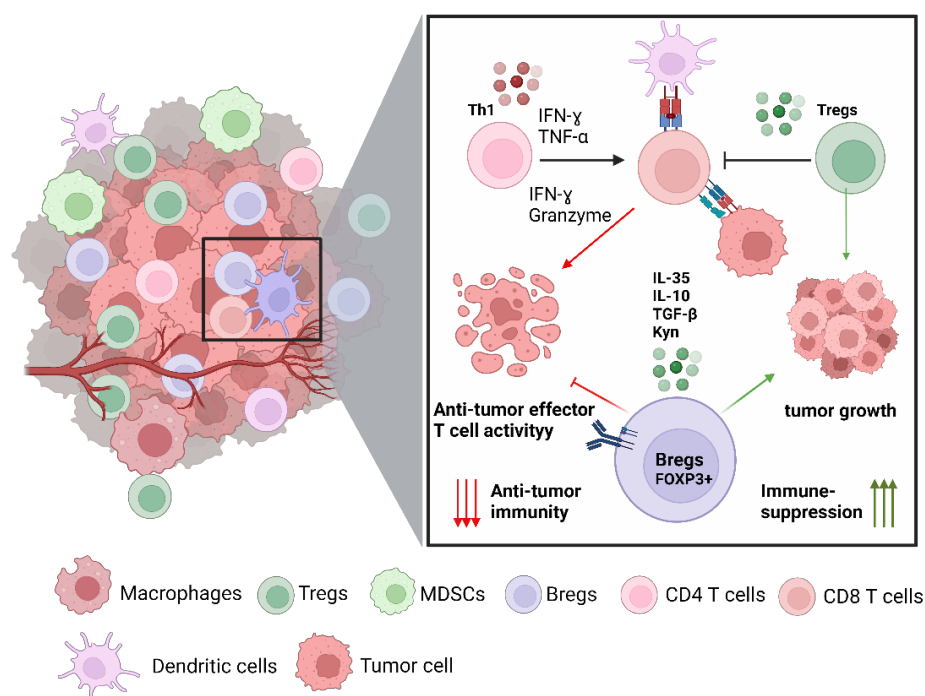


Figure 17 : Rôle des Bregs dans la suppression des réponses anti-tumorales. Les Bregs se développent au sein de la tumeur, dans les structures lymphoïdes tertiaires, les ganglions lymphatiques drainants et les principaux organes lymphoïdes secondaires. Ils peuvent produire des cytokines immunosuppressives en réponse à l'inflammation associée à la tumeur. (Figure réalisée avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)) et adaptée selon (Michaud et al. 2021).

3 Application au modèle pathologique de la LLC

3.1 Généralités

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne fréquente dans le monde occidental et est caractérisée par une expansion clonale de lymphocytes B CD5⁺ (> 5 G/L) dans la circulation, les organes lymphoïdes périphériques et la moelle osseuse. Cette pathologie a une grande hétérogénéité clinique. Elle évolue vers des stades avancés dans environ 30% des cas dont l'issue peut être défavorable malgré les nouvelles thérapies. Les 70% restants sont des patients exprimant une maladie indolente, qui ne nécessite pas de traitement, mais dont le risque de progression reste difficile à évaluer. Historiquement, le pronostic est fondé sur la classification clinique de Binet en Europe et a été complété depuis par de nombreux paramètres prédictifs sur la base de la génétique et la biologie de la LLC. Certains de ces paramètres se sont révélés avoir une valeur prédictive même si elle n'est pas absolue. Ils reposent sur l'expression de marqueurs d'activation, sur la présence d'altérations cytogénétiques et/ou de mutations récurrentes dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs des cellules B leucémiques.

Un des facteurs le plus communément accepté dans la LLC est le statut mutationnel des gènes des régions variables des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHV), désormais intégré dans l'algorithme décisionnel de la prise en charge des patients (Kipps et al. 2017). Les patients dont les cellules B tumorales présentent plus de 2% de mutations somatiques (processus d'hypermutation somatique), sont appelés « mutés » (M-CLL), et ont une évolution clinique lente et une survie sans progression (PFS) longue. A l'inverse, celles qui montrent moins de 2% de mutations de ces mêmes segments de gènes sont observées chez des patients dits non mutés (U-CLL) qui ont une progression de la maladie et une PFS courte (Hamblin et al. 1999). Ceci suggère une implication de ces gènes dans les mécanismes d'expansion clonale. Des différences dans la cinétique *in vivo* des clones LLC ont également été mises en évidence ; les clones U-CLL prolifèrent plus activement *in vivo* que les clones M-CLL. Ce constat est en accord avec l'observation selon laquelle les cellules B U-CLL ont des télomères plus courts et une activité télomérase plus élevée indiquant un renouvellement plus actif (Jebaraj et Stilgenbauer 2021).

La LLC engendre des dysfonctionnements complexes de la réponse immunitaire qui se traduisent par des manifestations cliniques, comme un risque plus élevé d'infections et de malignité secondaire. Ces manifestations cliniques sont des complications courantes qui affectent l'évolution et la prise en charge de la LLC, et ont un impact sur le pronostic global de la maladie. La découverte de la clonalité des cellules de LLC d'un patient indiquent qu'elles dérivent d'une même cellule progénitrice, comme le montre l'utilisation d'un réarrangement génétique IGHV-IGHD-IGHJ unique dans chaque clone leucémique. Elle fournit une explication plus fine de cette incompetence immunitaire des cellules leucémiques, étant donné que leur récepteur (BCR) a un répertoire restreint qui affecte une large couverture nécessaire à une

bonne défense immunitaire, même en supposant un fonctionnement normal des cellules B tumorales (Bagnara et al. 2022).

Des preuves ont été rassemblées en faveur d'une prédisposition germinale à la LLC, comme la prévalence de la pathologie chez les personnes des pays industrialisés, l'apparition de la maladie dans des familles et l'observation que les proches parents de patients atteints de LLC peuvent développer plus fréquemment que d'autres personnes, une LLC ou une lymphocytose monoclonale à cellules B (MBL), qui est considérée comme le précurseur immédiat de la LLC (Nieto et al. 2009; Fazi et al. 2011; Strati et Shanafelt 2015; Rawstron et al. 2017). Ces observations ont encouragé des études d'association pangénomique (GWAS) visant à élucider cette prédisposition au niveau génétique. Cependant, cette enquête a jusqu'à présent conduit à l'identification de polymorphismes mononucléotidiques (SNP), répartis sur 30 loci, qui sont associés à un faible risque de LLC, sans identifier de lésions individuelles ou un groupe restreint de lésions fournissant un mécanisme pathogénique unique (Goldin et al. 2004; Slager et al. 2012).

D'autre part, des lésions cytogénétiques, probablement de nature hétérogène, prédisposeraient les cellules à réagir de manière anormale aux stimuli provenant du micro-environnement, entraînant une prolifération anormale des cellules B et aboutissant à une leucémie à part entière. Notamment, la reconnaissance antigénique par le BCR exprimé sur la cellule leucémique peut promouvoir la leucémogénèse et maintenir l'expansion dérégulée des clones de LLC par rapport aux mécanismes normaux de réponse aux stimuli antigéniques. Ceci tient compte des différences entre le répertoire normal des cellules B et celui retrouvé dans la LLC qui indique la sélection de certaines spécificités du BCR qui favorisent l'expansion clonale de la leucémie. En effet, dans de nombreux cas de LLC, les antigènes reconnus par le BCR spécifique pourraient être des auto-antigènes (Borche et al. 1990; Fabbri et Dalla-Favera 2016; Chiorazzi et Stevenson 2020) ou des épitopes antigéniques provenant de pathogènes (Hoogeboom et al. 2013).

Le répertoire du BCR dans la LLC se caractérise par une utilisation biaisée de segments géniques avec une sur/sous-représentation de certains segments géniques IGHV, IGHD et IGHJ et des associations fréquentes entre eux qui ne sont pas retrouvées dans les cellules B normales. Par exemple, le gène IGHV1-69 et certains de ses allèles sont sur-représentés dans la LLC, tout comme les gènes IGHV4-34 et IGHV3-7 (Fais et al. 1998; Widhopf et Kipps 2001).

Un nombre substantiel de clones de LLC, plus fréquemment les clones U-CLL, partagent des BCRs quasi-identiques, appelés BCRs stéréotypés, qui ne représenteraient pas l'énorme diversité potentiellement générée par la recombinaison des segments géniques IGHV et IGLV (Ten Hacken et al. 2019). Ces stéréotypes lient des ligands spécifiques et facilitent l'expansion de certains clones qui deviennent la cible d'événements de transformation lors de la leucémogénèse et promeuvent l'expansion des clones leucémiques. Notamment, les groupes de cas de LLC, qui partagent les mêmes sous-ensembles de stéréotypes majeurs, ont des évolutions cliniques et des résultats remarquablement similaires. Ce constat renforce l'idée

selon laquelle la stimulation du BCR est cruciale pour favoriser le taux d'expansion clonale (Stamatopoulos et al. 2006; Xochelli et al. 2017; Bagnara et al. 2022).

Les caractéristiques générales pour que deux BCRs de LLC soient considérés comme appartenant au même sous-ensemble stéréotypé sont mentionnées dans le tableau ci-dessous (Table 3). La notion de sous-ensembles satellites a récemment été introduite. Ceux-ci sont définis comme des réarrangements géniques IG, qui partagent le même motif HCDR3 mais qui seraient exclus de la définition du stéréotype par l'exigence stricte d'une longueur de HCDR3 identique. Ces derniers restent néanmoins immuno-génétiquement liés à un sous-ensemble principal (Agathangelidis et al. 2021).

Feature	Requirement
HCDR3 aa Identity	$\geq 50\%$
HCDR3 aa similarity	$\geq 70\%$
HCDR3 aa composition *	shared subset specific motifs
HCDR3 aa length *	shared
IGHV	shared clan or, in some cases, gene
IGHV mutational status	shared

Table 3 : Critères généraux d'appartenance au même sous-ensemble stéréotypé des BCR dans la LLC.* Les sous-ensembles satellites ont été récemment introduits (Agathangelidis et al. 2021). Ceux-ci sont définis comme des réarrangements de gènes IG partageant le même motif HCDR3 avec une longueur différente de HCDR3 et/ou présentant un décalage du motif HCDR3. Ainsi, les sous-ensembles satellites restent immunogénétiquement liés à un sous-ensemble principal. *Figure adaptée de* (Bagnara et al. 2022).

Sur la base des critères susmentionnés, l'initiative européenne de recherche sur la LLC (ERIC) a déterminé que les patients qui présentent des sous-ensembles stéréotypés de tout type (majeur et mineur) atteignaient un pic de 41 % dans une cohorte d'environ 30 000 cas (Rosenquist et al. 2017).

Enfin, le fait que certains inhibiteurs de tyrosine kinases (TKI), capables de bloquer la signalisation du BCR, ont un effet thérapeutique bénéfique a conduit à concentrer davantage l'attention sur le rôle pathogénique du BCR (Burger et Wiestner 2018).

3.2 La signalisation du BCR

Des preuves bien établies de la stimulation antigénique des cellules B de LLC dans des sites sanctuaires de prolifération, proviennent des taux de phosphorylation de kinases qui sont associées à la stimulation du BCR au sein des ganglions lymphatiques (Herishanu et al. 2011). Ces stimulations expliqueraient en partie les faibles niveaux d'immunoglobulines de surface (slg) décrits dans les cellules leucémiques par rapport à leurs « homologues B normaux ». En effet, l'exposition aux antigènes provoque une endocytose des récepteurs qui se traduit par une baisse de l'expression des slg. De plus, les cellules de LLC circulantes, que ce soient les sous-ensembles U-LLC ou M-LLC, présentent une augmentation de l'expression de l'IgM une fois qu'elles sont mises en culture (Chiorazzi et Stevenson 2020). Ces résultats *ex-vivo* argumentent pour une régulation à la baisse de l'expression des slgM *in vivo*, en réponse à une exposition transitoire aux antigènes au sein des niches de prolifération. L'activation et le trafic des cellules B seront abordés plus en détail ultérieurement (Cf. Activation et trafic des cellules B malignes).

Deux types de signaux peuvent être délivrés par les BCRs, à savoir les signaux toniques et actifs, qui revêtent des fonctions différentes dans la leucémogénèse.

Les signaux toniques permettent la survie des cellules B matures *in vivo* par des mécanismes de micro-agrégations spontanées des BCRs qui sont exprimés à la surface cellulaire sous forme d'oligomères auto-inhibés stables. Cette réorganisation en clusters est capable de déclencher l'activation cellulaire. De plus, la capacité du BCR « IgM » de surface à délivrer des signaux toniques est plus efficace que celle des BCR « IgG » ou « IgA ». Ceci explique pourquoi la quasi-totalité des clones de LLC, même mutés, expriment principalement l'IgM de surface, bien qu'une variante rare de la LLC présente une commutation de classe vers IgG/A (Young et Staudt 2013; Bagnara et al. 2022; Gomes de Castro et al. 2019).

Les signaux actifs permettent, quant à eux, la prolifération cellulaire et l'expansion clonale. Ils impliquent l'engagement extrinsèque du BCR (stimulation antigénique classique) et l'engagement intrinsèque du BCR (reconnaissance autonome du BCR). Ces signaux peuvent être subdivisés comme suit :

- **Stimulation par des auto-antigènes** : Un nombre considérable de clones de LLC expriment un BCR qui est caractérisé par une poly-réactivité (Borche et al. 1990). Cette dernière implique que chaque anticorps monoclonal puisse reconnaître, avec une faible affinité, une variété d'(auto)antigènes différents (Potter et al. 2002) qui sont générés notamment à partir des plaquettes, d'IgG agrégées ou encore d'antigènes nucléaires, les brins d'ADN double (ds) et simple (ss), ainsi que l'insuline (Borche et al. 1990).

Les anticorps poly-réactifs qui présentent ces caractéristiques font partie des "anticorps naturels", et représentent l'une des premières lignes de défense contre les agents pathogènes.

Ces BCRs de surface poly-réactifs sont très fréquemment produits par les clones U-LLC, contrairement aux clones M-LLC qui les expriment rarement (Rosén et al. 2010). Ainsi, bien que relativement exceptionnels, des syndromes paranéoplasiques auto-immuns ont été cliniquement décrits dans la LLC, comme le Pemphigus paranéoplasique qui diffère du Pemphigus vulgaris (non malin). En effet, les auto-anticorps isolés dans le Pemphigus paranéoplasique sont poly-réactifs contrairement à leurs homologues non malins qui sont limités aux desmoglénines (Dsgs) (Futei et al. 2003; McCaw, Lofftus, et Crompton 2023). De rares cas de Cryoglobulinémie ont également été décrits dans la LLC où les cellules leucémiques produisent des auto-anticorps monoclonaux de faible affinité dirigés contre les globules rouges ou contre la portion Fc de l'IgG (Stevenson et al. 1989; Potter et al. 2002). De façon intéressante, les clones U-LLC, particulièrement ceux exprimant le BCR stéréotypé VH1-69 sont poly-réactifs et capables de reconnaître des antigènes liés aux cellules apoptotiques. Ils réagissent notamment contre des protéines intracellulaires, telles que la vimentine, la tubuline et la filamine B qui sont exposées à la surface cellulaire lors du processus d'apoptose (Lanemo Myhrinder et al. 2008). Cette poly-réactivité peut jouer un rôle crucial dans la promotion de l'expansion clonale de la LLC, en particulier en présence d'une apoptose cellulaire abondante (Lanemo Myhrinder et al. 2008).

- **Stimulation par des antigènes microbiens** : La sur-représentation des stéréotypes IGHV3-7 et l'observation d'hypermutations somatiques fréquente dans ces clones, qui indiquent une stimulation antigénique avec un passage par les centres germinatifs, a orienté les recherches vers l'identification de ligands microbiens sous-tendant la transduction de signaux actifs du BCR. L'étude des stéréotypes IGHV3-7 (Hoogeboom et al. 2013; Bagnara et al. 2022) a permis d'identifier des BCRs qui sont caractérisés par une séquence HCDR3 très courte (de 5 à 6 acides aminés (aa) au lieu des 15 aa canoniques) et qui présentent une liaison spécifique au β -(1,6)-glucane des levures. L'exposition *in vitro* au β -(1,6)-glucane des cellules de LLC portant ce BCR a montré que cette stimulation conduit à une prolifération cellulaire spécifique. Les anticorps, qui réagissent avec les molécules exposées à la surface des cellules apoptotiques et/ou avec les molécules oxydées en réponse à l'apoptose, montrent une réactivité croisée pour plusieurs composants microbiens. Cette réaction croisée étudiée *in vitro* peut également être retrouvée *in vivo* chez les patients atteints de LLC. En effet, certains BCRs de la LLC sont capables de reconnaître simultanément des antigènes de micro-organismes et des auto-antigènes (Lanemo Myhrinder et al. 2008)..

- **Signal autonome** : Parmi les BCRs exprimés par les cellules de LLC, certains ont la capacité de délivrer de manière autonome des signaux d'activation aux cellules leucémiques, comme cela a été démontré *in vitro* par Dühren-von Minden M et ses collaborateurs (Minden et al. 2012). Leurs travaux ont rapporté une mobilisation calcique en réponse aux signaux délivrés par des BCRs qui présentent un motif HCDR3 particulier. Ce dernier permet la liaison à un épitope conservé dans la région de structure 2 (FR2) du domaine IGHV du même BCR (Figure 18). Un épitope alternatif pour la liaison autologue du BCR a également été retrouvé dans FR3 (Binder et al. 2013). Il a par ailleurs été démontré que certains récepteurs du sous-ensemble des

stéréotypes #2 portent une mutation ponctuelle, appelée R110, à la jonction entre la région variable et la région constante de leurs chaînes légères. Cette mutation facilite les interactions homotypiques BCR-BCR qui provoquent une activation plus robuste de la signalisation autonome. Par conséquent, alors que le stéréotype du sous-ensemble #2 est déjà en lui-même un indicateur de mauvais pronostic, les cas présentant R110⁺ ont un pronostic encore plus défavorable (Maity et al. 2020; Datta et Juma 2022; Märkl et al. 2024).

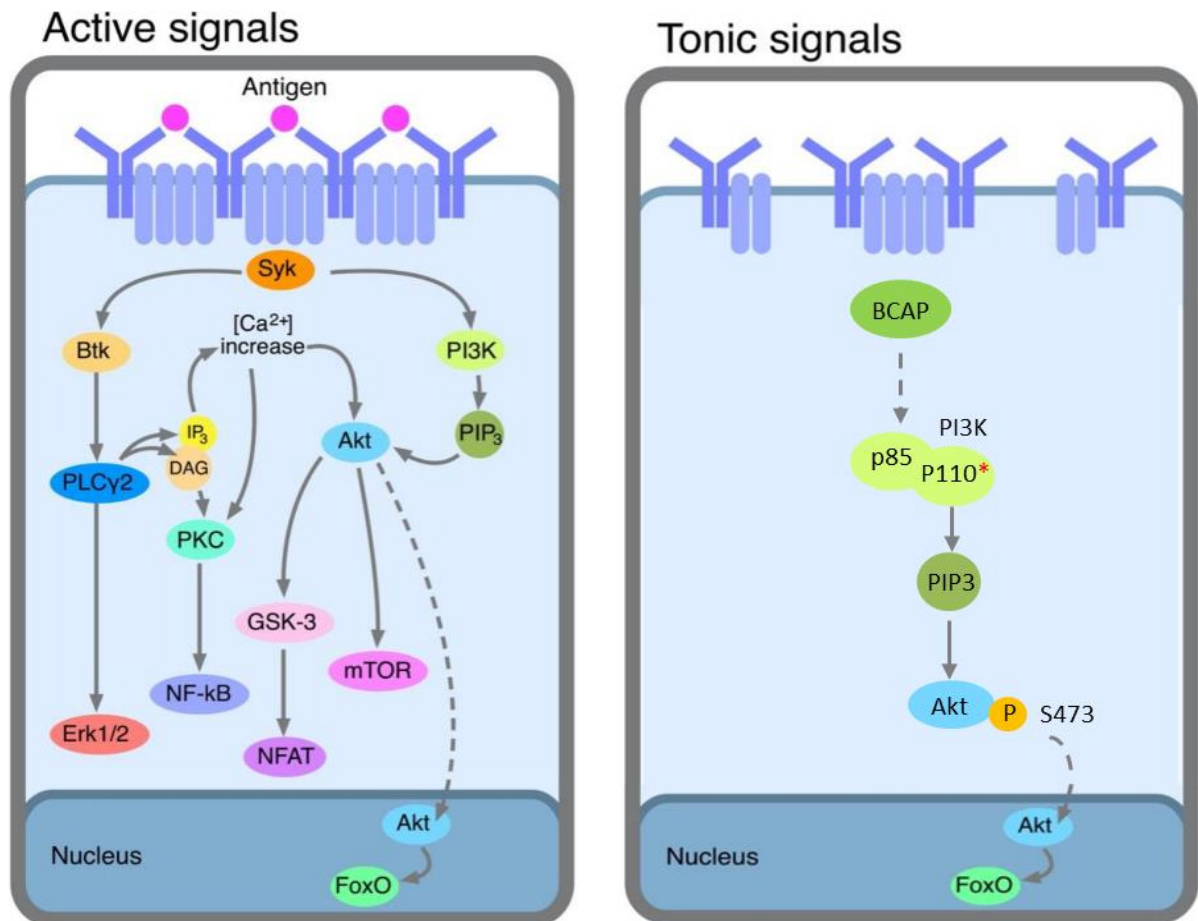


Figure 18 : Signaux actifs et toniques transmis par les BCRs dans les cellules B de LLC. Signaux actifs (à gauche). Les BCRs à la surface des cellules de LLC sont aggrégés suite à une stimulation antigénique (auto-antigènes ou antigènes de micro-organismes), provoquant l'activation de la voie de signalisation en aval, dont les principales étapes sont représentées schématiquement. Signaux toniques (à droite). La micro-agrégation spontanée du BCR entraîne l'activation de la voie PI3K qui soutient la survie des cellules B de LLC (Modèle proposé par les données expérimentales de Lakshmi Srinivasan et al.) *Figure Adaptée selon* (Bagnara et al. 2022) et (Srinivasan et al. 2009).

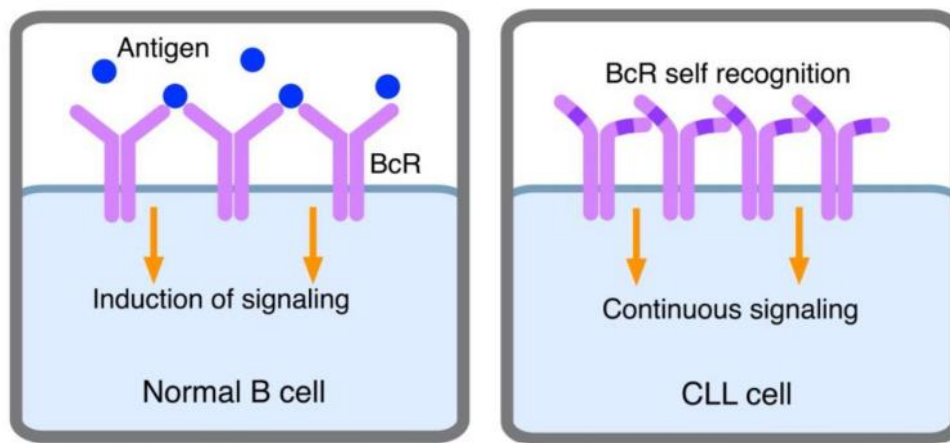


Figure 19 : La signalisation autonome dans les cellules de LLC. Dans les lymphocytes B normaux, la stimulation du BCR est causée par la présence d'un antigène spécifique et est transitoire (à gauche). Dans la LLC, où se produit une signalisation autonome, la signalisation du BCR est constamment activée puisque le BCR se lie à une structure spécifique du BCR lui-même (à droite). *Figure adaptée de Bagnara et al. 2022).*

3.3 Origine cellulaire de la LLC

L'origine cellulaire de la LLC est toujours débattue, en raison d'événements transformants qui peuvent modifier son comportement, notamment son phénotype, la rendant difficilement retraceable parmi les sous-populations de cellules B à ce jour identifiées. La conception prédominante propose que la leucémogénèse, à l'instar d'autres processus de transformation maligne, est un processus graduel et caractérisé par une accumulation progressive de mutations transformantes.

3.3.1 Origine à partir de cellules B matures

Ce modèle propose que la leucémogénèse émane des cellules qui expriment un BCR pleinement fonctionnel, dont l'activation faciliterait l'accumulation de mutations transformantes. Ce mécanisme est soutenu par des études menées sur des modèles murins centrés sur des cellules B1, qui reproduisent des troubles lymphoprolifératifs similaires à ceux observés dans la LLC humaine. En effet, les cellules B1 de souris adultes transférées à des souris nouveau-nées, se multiplient chez l'hôte et entraînent des accumulations de cellules B oligo- ou mono-clonales qui sont considérées comme des progéniteurs immédiats des cellules leucémiques. De plus, la génération d'un processus leucémique complet a été accélérée lorsque le transfert a été effectué chez des souris transgéniques pour le gène *tcl1* (Förster et Rajewsky 1987; Kyoko Hayakawa et al. 2016). Notamment, dans la plupart de ces modèles murins, la spécificité du BCR s'est révélée être un élément clé de la leucémogénèse. Par exemple, dans le modèle transgénique *tcl1*, le BCR des cellules leucémiques présente une ressemblance structurale et une spécificité similaire à celles de la forme humaine U-CLL, comme l'utilisation de gènes IGHV non mutés, la stéréotypie, la polyspécificité et la spécificité pour les auto-antigènes, tels que la myosine II A non musculaire (MyIIA) (Yan et al. 2006; K Hayakawa et al. 2016). Il est important de noter que les cellules de LLC expriment un répertoire du BCR restreint et des jonctions CDR3 quasi-identiques (Tobin et al. 2004; Kikushige 2020). Ce

degré remarquable de restriction structurale des BCRs dans la LLC soutient que la leucémogénèse est caractérisée par une sélection clonale *via* l'engagement du BCR. De plus, l'inactivation génique ou induite par thérapie ciblée de la signalisation du BCR chez les souris *tc/1* entraîne un retard substantiel de l'apparition de la leucémie (Woyach et al. 2014). A l'inverse, l'inactivation génique de la phosphatase PTEN, un régulateur négatif de la signalisation du BCR, provoque une signalisation efficace du BCR et entraîne l'apparition accélérée de la leucémie. Il est à noter que la délétion génique de *pten* est observée dans la LLC, et est associée à une signalisation du BCR plus efficace qui favorise l'expansion clonale chez les patients (Schmid et al. 2022). Chez les souris, l'insertion de gènes codant pour un BCR pleinement fonctionnel, et doté d'une spécificité anti-MYIIA ou anti-phosphatidylcholine, conduit à l'apparition d'une maladie de type LLC, qui est grandement favorisée par le fond génétique *tc/1*. Ceci suggère une collaboration active entre l'engagement du BCR et des lésions géniques transformantes dans la pathogenèse de la LLC (S.-S. Chen et al. 2013; Bagnara et al. 2022).

3.3.2 Origine à partir de cellules souches hématopoïétiques

Ce modèle propose que les événements de transformation initiaux prennent place dans les CSH, qui sont capables de donner naissance à toutes les lignées sanguines. En raison de la transformation, les CSH engendrent une hématopoïèse clonale qui est caractérisée par une différenciation prédominante vers la lignée des cellules B et favorise la génération de sous-clones B dont les réarrangements IGHV-IGHJIGHD, sont similaires à ceux observés dans les cellules MBL et dans lesquelles des événements oncogéniques s'accumulent au cours du processus complexe de leucémogénèse qui aboutit à une leucémie (Bagnara et al. 2022).

La lymphocytose monoclonale des lymphocytes B (MBL) est un état pré-leucémique de la LLC qui est caractérisé par une prolifération asymptomatique de cellules B clonales dont le nombre circulant est inférieur à 5000 cellules/ μ l (Marti et al. 2005; Kikushige 2020; Bagnara et al. 2022). Sa prévalence augmente avec l'âge et varie entre < 1% et 18% (de Tute et al. 2006; Kikushige 2020) et sa progression vers une LLC est observée dans 1 à 5 % des cas par an (Slager et al. 2021). Ceci témoigne de sa longue persistance avant sa transformation en LLC. L'étude d'une large cohorte a démontré que pratiquement tous les patients atteints de LLC avaient préalablement une MBL (Kikushige 2020).

Il est important de noter que la LLC, ainsi que la MBL, ne sont pas toujours monoclonales et peuvent parfois comprendre des clones de cellules B oligo-clonales (Sanchez et al. 2003; Lanasa et al. 2010; Kikushige et Miyamoto 2014; Klinger et al. 2016; Kikushige 2020). Cela suggère que le premier événement oncogénique peut remonter aux cellules progénitrices ou aux CSH, qui présentent déjà une propension à générer des cellules B matures clonales. En effet, dans des modèles de xénogreffes, les CSH dérivées de patients atteints de LLC peuvent générer des cellules B CD5⁺ matures mono- ou oligo-clonales anormales *in vivo* (Kikushige et al. 2011; Fabbri et Dalla-Favera 2016). De manière intéressante, des études NGS ont confirmé

que les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (HSPC) CD34⁺CD19⁻ et/ou les cellules myéloïdes provenant de patients atteints de LLC partagent des mutations somatiques identiques à celles détectées dans les cellules B de la LLC. Ces mutations récurrentes comprennent NOTCH1, SF3B1, BRAF, TP53, XPO1, MED12, NFKBIE et EGR2 (Damm et al. 2014; Quijada-Álamo et al. 2017; M et al. 2018; Kikushige 2020). Les analyses de séquençage du génome entier ont également confirmé des mutations partagées entre les cellules MBL/LLC, suggérant que l'acquisition de certaines mutations somatiques se produit avant le début de la pathologie, probablement au stade des CSHs (Agathangelidis et al. 2018).

De plus, il a été démontré que NOTCH1, dont la signalisation joue un rôle central dans la LLC, est activé de manière aberrante dans les HSPC de patients atteints de LLC, indépendamment de leur statut mutationnel (comparativement aux niveaux observés chez des donneurs sains). Ceci indique que l'activation de NOTCH1 est un événement précoce dans la leucémogenèse de la LLC qui pourrait contribuer au développement de HSPC aberrantes chez les patients atteints de LLC (M et al. 2018; Kikushige 2020).

Enfin, la notion d'hématopoïèse clonale est également compatible avec l'observation fréquente d'accumulations oligo-clonales de cellules B, en plus du clone majeur de cellules B, à la fois dans la MBL et la LLC (Klinger et al. 2016; Damm et al. 2014), et explique l'occurrence relativement fréquente de DLBCL (Lymphome diffus à grandes cellules B) et de LH (Lymphome Hodgkinien) avec des réarrangements géniques IGHV-IGHD-IGHJ discordants par rapport à ceux des cellules de LLC. Ces troubles lymphoprolifératifs proviendraient des mêmes CSH, donnant naissance au clone de cellules MBL/LLC, et leur émergence pourrait être favorisée par un mécanisme de tolérance défectueux pendant la maturation des cellules B qui facilite la stimulation par des auto-antigènes.

Il est aujourd'hui proposé que les événements oncogéniques initiaux commencent et s'accumulent dans les CSH humaines en fonction de l'âge. Il s'ensuit l'émergence d'une hématopoïèse clonale liée à l'âge (ARCH) (Jaiswal et al. 2014) qui implique, chez les individus âgés, le développement clonal de cellules B CD5⁺ matures portant les mêmes mutations. Ces cellules seraient ensuite maintenues par l'engagement du BCR tout en accumulant des événements oncogéniques ultérieurs qui conduisent à la progression de la LLC (Kikushige 2020).

3.4 Activation et trafic des cellules B malignes

La prolifération des cellules de LLC se déroule principalement dans les tissus lymphoïdes périphériques où il a été rapporté un enrichissement en cellules leucémiques positives pour le Ki67 et coexprimant des marqueurs d'activation. Dans ces sites de prolifération, les cellules B leucémiques interagissent étroitement avec de nombreuses autres cellules, notamment les macrophages ou les Nurse-Like Cells (NLC) et les lymphocytes T (Ponzoni, Doglioni, et Caligaris-

Cappio 2011). Cette interaction synergique, conjuguée à un engagement efficace du BCR, qui est facilité par les signaux provenant du microenvironnement, semble jouer un rôle clé dans le processus d'expansion clonale.

Les cellules leucémiques qui entrent dans les tissus lymphoïdes se caractérisent par une forte expression du récepteur CXCR4, qui interagit avec son ligand, le CXCL12 qui est sécrété par les NLC ; cette interaction facilitant leur homing (Burger et Kipps 2006). En retour, les cellules leucémiques libèrent les chimiokines CCL3 et CCL4. Ces facteurs solubles attirent les lymphocytes et les monocytes, qui expriment les récepteurs dédiés, à savoir CCR1 et CCR5, vers les sites sanctuaires de prolifération (Burger et al. 2009). L'activation des cellules B de LLC dans ces centres de prolifération provoque une internalisation du CXCR4 et donc une baisse de son expression membranaire (Saint-Georges et al. 2016), ce qui entraîne la sortie de ces cellules vers la circulation où elles continuent à exprimer des marqueurs d'activation. Notamment le CD5, un marqueur d'activation et un régulateur négatif de la signalisation du BCR, est régulé à la hausse (Saint-Georges et al. 2016; Burgueño-Bucio, Mier-Aguilar, et Soldevila 2019). Au regard du faible nombre d'événements de stimulation dans la circulation, il est observé une diminution de l'activation des cellules leucémiques, caractérisée par une réduction du niveau d'expression du CD5. Parallèlement, la faible concentration plasmatique du CXCL12 fait augmenter le taux de CXCR4. Cela prédispose les cellules à réintégrer les organes lymphoïdes périphériques et à amorcer un nouveau cycle de prolifération (Calissano et al. 2011; Pozzo et al. 2022).

Sur la base des niveaux d'expression du CD5 et du CXCR4, de nombreuses équipes ont défini deux groupes de cellules B de LLC. Un groupe constitué de cellules $CD5^{high}CXCR4^{low}$, appelé fraction proliférative (PF) qui englobe les cellules récemment divisées qui expriment des niveaux élevés de marqueurs d'activation, y compris le CD38. Un second groupe de cellules $CD5^{low}CXCR4^{high}$, nommé fraction quiescente (QF) qui est constitué de cellules au repos et susceptibles de réintégrer les tissus lymphoïdes (Pozzo et al. 2022). D'autres équipes ont déterminé une fraction intermédiaire (IF) qui comprend des cellules B tumorales $CD5^{int}CXCR4^{int}$ qui correspondraient à des cellules à divers stades d'activation et/ou en voie de devenir quiescentes (Bartholdy et al. 2020; Cuthill et al. 2022) (Figure 20). Ces groupes distincts peuvent être identifiés à la fois dans les clones de M-CLL et de U-CLL, confirmant que les deux groupes de patients ont des compartiments de prolifération. Cependant, l'identification des cellules $CD5^{high}CXCR4^{low}$ comme fraction proliférative sur la base d'une expression élevée du Ki67 est contestée car la capacité du Ki67 à discriminer les cellules en division active est sujette à débat. Une alternative a été mise en évidence par Friedman et ses collaborateurs qui ont prouvé l'existence d'une fraction proliférative « active » en phases S/G2/M, qui est caractérisée par le phénotype $CD5^{high}CXCR4^{high}$. Ils ont aussi associé le phénotype $CD5^{high}CXCR4^{low}$ en phase G1 à une fraction « récemment activée » (RAF). Ceci suggère que leur expression élevée du CD5 reflète une activation récente, tandis que les faibles niveaux d'expression du CXCR4 reflètent une internalisation, similaire à celle observée 2 heures après la stimulation du BCR des cellules leucémiques (Vlad et al. 2009). Cette observation est en

accord avec une diminution membranaire du CXCR4 dans les lymphocytes s'engageant dans la phase G1, 3 heures après un événement de stimulation (Lea et al. 2003; Friedman et al. 2023). Bien que les stimuli activateurs entraînent initialement une forte diminution de l'expression du CXCR4, reflétant l'entrée des cellules en phase G1, celui-ci réapparaît rapidement lorsque les cellules entrent en phase S/G2/M, révélant une relation complexe entre l'activation, la prolifération et le potentiel de migration (Figure 20).

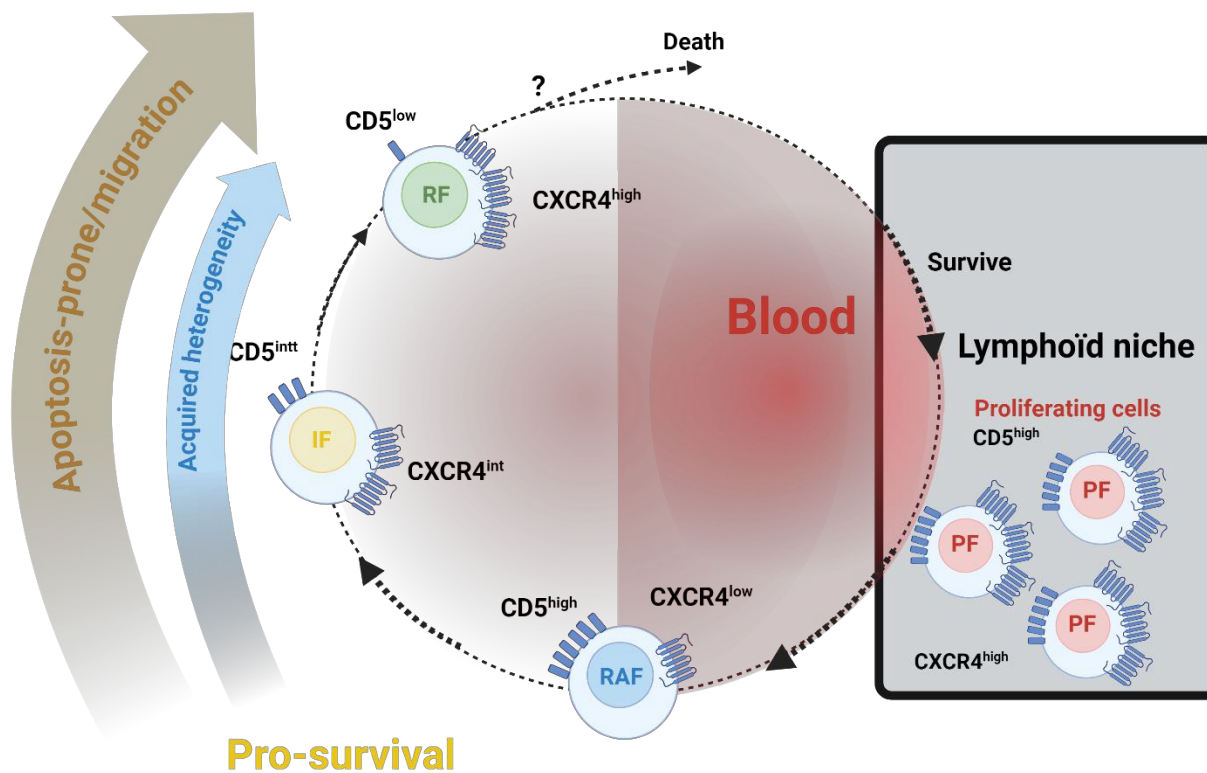


Figure 20 : Modèle hypothétique de la cinétique des cellules leucémiques dans la LLC. La stimulation et l'activation des B de LLC provoquent une internalisation du CXCR4 conduisant les cellules à quitter les centres de prolifération et rejoindre la circulation et une régulation positive du CD5. Les molécules d'activation sont ensuite régulées négativement, confirmant la tendance progressive des cellules de la LLC à atteindre un état plus au repos. Un certain nombre de ces cellules subissent l'apoptose en dehors des centres de prolifération en l'absence de signaux accessoires (cela est particulièrement vrai pour les cellules U-CLL). Les cellules de la LLC, devenant progressivement plus quiescentes en raison de l'absence de stimulation, peuvent devenir tolérantes (en particulier les cellules M-CLL) et/ou réguler positivement leur expression de CXCR4, ce qui permet une nouvelle entrée dans les tissus lymphoïdes et l'initiation d'un nouveau cycle de prolifération dans les centres de prolifération. (Figure réalisée avec [BioRender.com](#)) et adaptée selon (Bartholdy et al. 2020).

Les résultats de Friedman et al. indiquent en outre que ces cellules CD5^{high}CXCR4^{high} présentent des niveaux élevés de récepteurs aux chimiokines CCR7 et CXCR5, ce qui potentialise leur migration en réponse aux signaux de recrutement des ganglions lymphatiques. Ils démontrent également, que cette fraction est enrichie dans des échantillons de patients atteints de LLC lors de la rechute et est associée à un profil clinique considéré comme plus agressif (Friedman et al. 2023).

Cette relation complexe entre l'activation, la prolifération et le potentiel de migration est aussi soutenue par les travaux de Xue et al. sur les cellules B de LLC résidant dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique. Leurs travaux associent l'expression élevée de CXCR4 aux métastases invasives et aux processus liés au cycle cellulaire dans la LLC. Ils ont par ailleurs établi que cette surexpression de CXCR4 représente un marqueur pronostique indépendant défavorable dans la LLC (Xue et al. 2024).

De nombreuses cellules leucémiques subissent le processus d'apoptose lorsqu'elles quittent les centres de prolifération, en l'absence de signaux accessoires, particulièrement dans le cas des cellules U-CLL. Dans d'autres cas, très souvent chez les M-CLL, les cellules, de plus en plus quiescentes en raison de l'absence de stimulation, peuvent devenir tolérantes et/ou réguler à la hausse un nouvel ensemble de molécules d'adhésion pour favoriser leur réintégration dans les tissus lymphoïdes et initier un nouveau cycle de prolifération (Bagnara et al. 2022).

3.4.1 Choix entre la prolifération et l'apoptose suite à la stimulation du BCR

La stimulation des cellules U-LLC avec des anticorps anti-IgM bivalents entraîne soit la survie/la prolifération, soit l'apoptose *in vitro*, selon le stimulus et la présence/l'absence de cellules accessoires et/ou de cytokines (Efremov, Gobessi, et Longo 2007; Le Roy et al. 2012). Il est bien établi que les cellules de LLC, particulièrement les U-LLC, ne survivent pas longtemps en culture, en absence de cellules accessoires telles que les NLC/ macrophages, cellules stromales, fibroblastes et lymphocytes T activés (Dondi et Varin-Blank 2022; Zaaboub et al. 2022). Il apparaît alors, que les cellules de LLC sont dans un équilibre précaire entre survie et mort *in vitro*, dont l'issue est notamment régulée par la stimulation du BCR. Cette dynamique pourrait également s'établir *in vivo*, compte tenu de l'apoptose substantielle observée dans la circulation des patients.

Cet équilibre entre survie et apoptose est également soutenu par une balance entre les molécules pro- et anti-apoptotiques. Par exemple, la protéine Bcl-2, dont le gène n'est ni muté ni transloqué dans les cellules B de LLC des patients naïfs de traitements (Fabbri et Dalla-Favera 2016), est généralement surexprimée. Cette surexpression est, en partie, causée par des altérations génétiques telles que la délétion 13q14 qui caractérise 50 à 60 % des cas de LLC (Kikushige 2020). Cette anomalie chromosomique provoque la délétion du locus codant miR-15 et miR-16, dont la fonction consiste à réguler négativement l'expression de bcl-2 (Calin et al. 2002; Cutrona et al. 2017). Cependant, l'effet anti-apoptotique des molécules de la famille

BCL-2 (BCL2L1, BCL2A1, BCLB, et MCL1) est contrebalancé par l'expression de nombreuses molécules pro-apoptotiques, en particulier celles de la famille BH3, qui sont également surexprimées (Roberts 2020; Bagnara et al. 2022). Cette surexpression est la cible thérapeutique du Vénétoclax, un mimétique de BH3 qui cible les effets anti-apoptotiques des molécules de la famille Bcl-2, modulant ainsi la balance en faveur de l'induction de l'apoptose (Fischer Kirsten et al. 2019).

3.4.2 Tolérance des cellules B leucémiques

Une proportion significative de clones de LLC montre une faible réponse suite à une stimulation des sIgM *in vitro* en termes de phosphorylation, de mobilisation calcique ou d'autres effets biologiques mesurés. Les cellules présentant ces caractéristiques, au sein d'un clone donné, sont définies comme des cellules anergiques. Elles représentent la plupart des cellules circulantes des clones de LLC qui sont négatifs pour le CD38, ZAP-70 et M-IGHV (Lanham et al. 2003; Packham et al. 2014).

Ces cellules anergiques présentent une faible expression de sIgM pour contrôler leur réponses cellulaires (Müschen 2019; Chiorazzi et Stevenson 2020) et des niveaux élevés de Syk et de Lyn phosphorylés constitutivement. La phosphorylation importante de Lyn entraîne celle du motif ITIM du corécepteur négatif du BCR, le CD5, qui sert de site d'ancrage à la protéine tyrosine phosphatase, SHP-1 qui, par son effet de régulateur négatif de la signalisation du BCR, inhibe l'apoptose (Tibaldi et al. 2011). L'origine de la tolérance pour une partie des sous-populations clonales de LLC reste floue et pourrait résulter d'une stimulation chronique du BCR à la surface des cellules *in vivo*, en l'absence de signaux appropriés (Chiorazzi et Stevenson 2020). Cependant, une rupture de la tolérance peut être observée et se manifeste par la nouvelle capacité des cellules à répondre aux stimuli et à proliférer par la suite. Il a d'ailleurs été démontré que la tolérance vis à vis des cellules leucémiques est plus transitoire que celle observée pour les cellules B humaines normales (Bagnara et al. 2022). Il est aussi possible que de plus petites fractions anergiques au sein des clones U-CLL existent également dans la circulation, lesquelles pourraient être masquées par la présence majoritaire de cellules répondant à la stimulation du BCR *in vitro*. Le cas échéant, l'induction d'une tolérance transitoire pourrait fonctionner à la fois dans les deux groupes de patients U-CLL et M-CLL dans des proportions différentes. Ces cellules tolérantes pourraient alors constituer un réservoir de cellules pouvant réintégrer les cycles de prolifération pour les besoins de l'expansion clonale.

3.5 L'immuno-régulation dans la LLC

La majorité des indicateurs pronostiques actuels se concentrent sur les caractéristiques intrinsèques des cellules B malignes. Cependant, les défauts profonds du système immunitaire, impliquant à la fois l'immunité innée et adaptative qui sous-tendent l'échappement des cellules leucémiques à l'immunité antitumorale, sont des causes importantes de la progression tumorale et devraient être pris en compte à des fins pronostiques. Cette progression sous-jacente dépend fortement de la composition du microenvironnement tumoral (MET) et du dialogue croisé entre les cellules de LLC et les composants cellulaires immunitaires et non-immunitaires qui constituent ce MET et sur lesquelles repose, par ailleurs, l'hétérogénéité de la LLC.

Un mécanisme clé de ces interactions bidirectionnelles, réside dans le fait que les cellules leucémiques maintiennent un état inflammatoire chronique pro-tumoral, qui stimule leur propre adaptation dysfonctionnelle ainsi que celles des cellules du microenvironnement en régulant notamment leur polarisation et en favorisant ainsi l'échappement tumoral qui sous-tend la progression (Figure 21).

Les B de LLC et le compartiment T

Il a en effet été démontré que les lymphocytes T dans le MET participent à l'échappement tumoral et à la suppression de la réponse immunitaire. Ils sont notamment caractérisés par la restriction de leur répertoire TCR, leur expansion oligo-clonale ainsi que par l'expansion de clono-types T partagés entre les patients. Ces caractéristiques suggèrent une activation chronique et une sélection par des éléments antigéniques restreints (Vlachonikola, Stamatopoulos, et Chatzidimitriou 2021; Taghiloo et Asgarian-Omran 2024). De plus, ces lymphocytes T présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles comparables à celles des lymphocytes T « exhausted », qui sont fréquemment détectés lors d'infections chroniques comme en témoigne l'expression de différents récepteurs de points de contrôle immunitaires (immune checkpoint), dont les CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIGIT, Tim-3, CD244 (SLAMF4) et CD160 (Roessner et Seiffert 2020; Taghiloo et Asgarian-Omran 2024).

D'autres altérations du profil d'expression des gènes des lymphocytes T ont été rapportées, notamment celles associées au cytosquelette. Ces altérations sont généralement provoquées par un contact direct entre les lymphocytes T et le clone malin (Figure 21). Elles entraînent un défaut fonctionnel dans la polymérisation de l'actine filamenteuse, interférant ainsi avec la capacité des lymphocytes T à former des synapses immunologiques compétentes avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Roessner et Seiffert 2020; Vlachonikola, Stamatopoulos, et Chatzidimitriou 2021; Taghiloo et Asgarian-Omran 2024). De plus, la diminution de la polymérisation de l'actine est également liée à une altération de l'activation des Rho GTPases qui entrave, par conséquent, la migration des cellules, dépendante des intégrines (Taghiloo et Asgarian-Omran 2024).

Ces évènements expliquent en partie l'inefficacité des réponses immunitaires antitumorales malgré une augmentation du nombre de lymphocytes T oligo-clonaux à la périphérie. Cependant, cette déficience immunitaire peut-être également liée au nombre élevé de sous-populations T régulatrices. Il a en effet été rapporté que la fréquence des cellules Tregs est plus élevée dans le sang des patients atteints de LLC que dans celui des témoins sains. De plus, ces Tregs leucémiques sont dotés d'une capacité sécrétoire d'IL-10 et de TGF- β supérieure à celle de leur homologues témoins et présentent une expression accrue de marqueurs d'activation et d'immunosuppression, tels que CTLA-4 (Beyer et al. 2005; Roessner et Seiffert 2020). Outre leur capacité immunosuppressive supérieure, la sécrétion d'IL-4 par les cellules Tregs induit une surexpression de la protéine BCL2 dans les cellules B leucémiques et favorisent ainsi leur survie et la progression tumorale (Vlachonikola, Stamatopoulos, et Chatzidimitriou 2021). Par ailleurs, le nombre de ces Tregs est positivement corrélé au taux de cellules B malignes, aux stades de Rai et Binet les plus élevés ainsi qu'aux altérations cytogénétiques défavorables. Le nombre de Tregs sert, de ce fait, de prédicteur indépendant du délai avant le premier traitement (Roessner et Seiffert 2020; Vlachonikola, Stamatopoulos, et Chatzidimitriou 2021).

Les B de LLC et autres cellules du MET

En plus de leur impact sur le compartiment lymphocytaire T, les cellules B de LLC sont reconnues pour subvertir les fonctions intrinsèques physiologiques d'autres cellules du MET en faveur de leur survie et de leur échappement à la surveillance anti-tumorale. Au cours de ces dernières années, cette notion de « détournement » du microenvironnement cellulaire par les cellules B tumorales est soulignée par un nombre croissant de travaux publiés. Par exemple, dans l'article intitulé « Good cops turn bad », les auteurs démontrent que la plasticité des neutrophiles dans la LLC dépend de la disponibilité du TGF- β . En effet, ce facteur de croissance détermine la polarisation des neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) vers un profil antitumoral (N1) ou pro-tumoral (N2) (H. Zhang et Houghton 2021; Taghiloo et Asgarian-Omrans 2024). En raison d'un environnement tumoral enrichi en chimiokines et en cytokines dites de « pro-survie », ces TANs ont une demi-vie plus longue que celle des neutrophiles conventionnels. Par ailleurs, les neutrophiles circulants des patients atteints de LLC présentent une migration et un chimiotaxisme altérés, ainsi que des capacités phagocytaires réduites et une activité bactéricide diminuée (Mohr et al. 2016; Goral et al. 2023).

Des travaux du laboratoire, ont mis en exergue la capacité fonctionnelle des NLCs qui sont rééduquées par les cellules B leucémiques. Ces dernières orientent vers un phénotype de NLC, les macrophages qui de fait participent au nichage des cellules de LLC dans les organes lymphoïdes, soutiennent le développement tumoral et participent à l'échappement à l'immunité antitumorale (Zaaboub et al. 2022).

Initialement, JA. Burger et son équipe ont démontré *in vitro* l'influence des cellules B de LLC sur la différenciation des monocytes en grandes cellules, rondes et adhérentes qui expriment

le CD68. Fonctionnellement, ces dernières sont capables d'attirer les cellules B leucémiques et de les protéger contre l'apoptose spontanée ou induite par traitement. Ces caractéristiques de soutien, qu'elles partagent avec les nurse-cell thymiques, leur ont valu le nom de nurse-like cells (NLC) (Tsukada et al. 2002; Dondi et Varin-Blank 2022). Ces NLCs ont également des caractéristiques communes avec les macrophages de type M2 qui sont associés aux tumeurs (TAM). En effet, elles favorisent l'angiogenèse et facilitent ainsi l'invasion ou la dissémination des cellules tumorales tout en les protégeant de l'apoptose induite par la chimiothérapie (Ysebaert et Fournié 2011; Filip et al. 2013; Dondi et Varin-Blank 2022). Elles supportent également l'expansion des cellules Tregs, qui sont positives pour le FT Foxp3, tout en inhibant la prolifération des lymphocytes T auxiliaires. Les NLCs promeuvent ainsi l'établissement d'un environnement immunosuppresseur qui permet l'échappement tumoral (Giannoni et al. 2014; Dondi et Varin-Blank 2022).

Outre les interactions cellulaires et moléculaires médiées par les facteurs solubles, l'implication fonctionnelle des vésicules extracellulaires (EVs) dans la pathogenèse de la LLC est de plus en plus reconnue (vom Stein, Hallek, et Nguyen 2023). L'intérêt pour ce moyen de communication intercellulaire vient du fait que des taux élevés d'EVs (CD20⁺) sont retrouvés dans le plasma des patients atteints de LLC comparés à ceux des témoins sains (Haderk et al. 2017; Gargiulo et al. 2023). Ces EVs dans le microenvironnement leucémique (MEL) contiennent plusieurs ligands des « Immune Checkpoints », tels que PD-L1, GAL9, B7-H2, VISTA et MHC I/II, ainsi que de nombreux miARN, comme miR-150, -155, 21, -146a, -378a et -27a. L'ensemble de ces molécules façonne le microenvironnement immunitaire en réduisant ses composants cellulaires pour renforcer les mécanismes d'évasion immunitaire. Ces EVs sont notamment impliquées dans la conversion des cellules stromales en fibroblastes associés au cancer (CAF) et dans la modulation de l'expression de PD-L1 par les monocytes (Paggetti et al. 2015; Haderk et al. 2017; Gargiulo et al. 2023).

Récemment, J. Paggetti et son équipe ont rapporté que les EVs du MEL sont capables de reprogrammer sélectivement le transcriptome, le protéome et le métabolome du compartiment des cellules T CD8⁺ (Figure 21). Cette reprogrammation entraîne leur épuisement cellulaire (exhaustion) et une répression de leur production du granzyme B par les miARNs empêchant ainsi la lyse des cellules B tumorales (Gargiulo et al. 2023). De plus, les traitements *ex vivo* et *in vivo* des cellules T CD8⁺ avec des EVs du MEL provoquent une réduction de leur potentiel de phosphorylation oxydative et une augmentation de la glycolyse qui a, par ailleurs, été associée à l'épuisement des cellules T CD8⁺. À l'inverse, les cellules Treg traitées *ex vivo* avec des EVs du MEL ont montré un phénotype activé, hautement suppressif qui pourrait contribuer à la répression des cellules T CD8⁺ dans le microenvironnement tumoral. De plus, ces travaux effectués sur une cohorte de patients atteints de LLC ont mis en évidence une corrélation entre l'expression des gènes liés aux EVs, les marqueurs pronostiques et la survie des individus atteints. Ils démontrent, notamment, que l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse de ces EVs, tels que Rab10, Rab35 et Rab40c, est plus élevée dans les cellules de patients U-CLL que dans celles des patients M-CLL au pronostic plus favorable.

Ce travail a également permis d'identifier les protéines RAB27a et RAB31 comme des marqueurs prédictifs de la survie globale (OS) des patients LLC (Gargiulo et al. 2023).

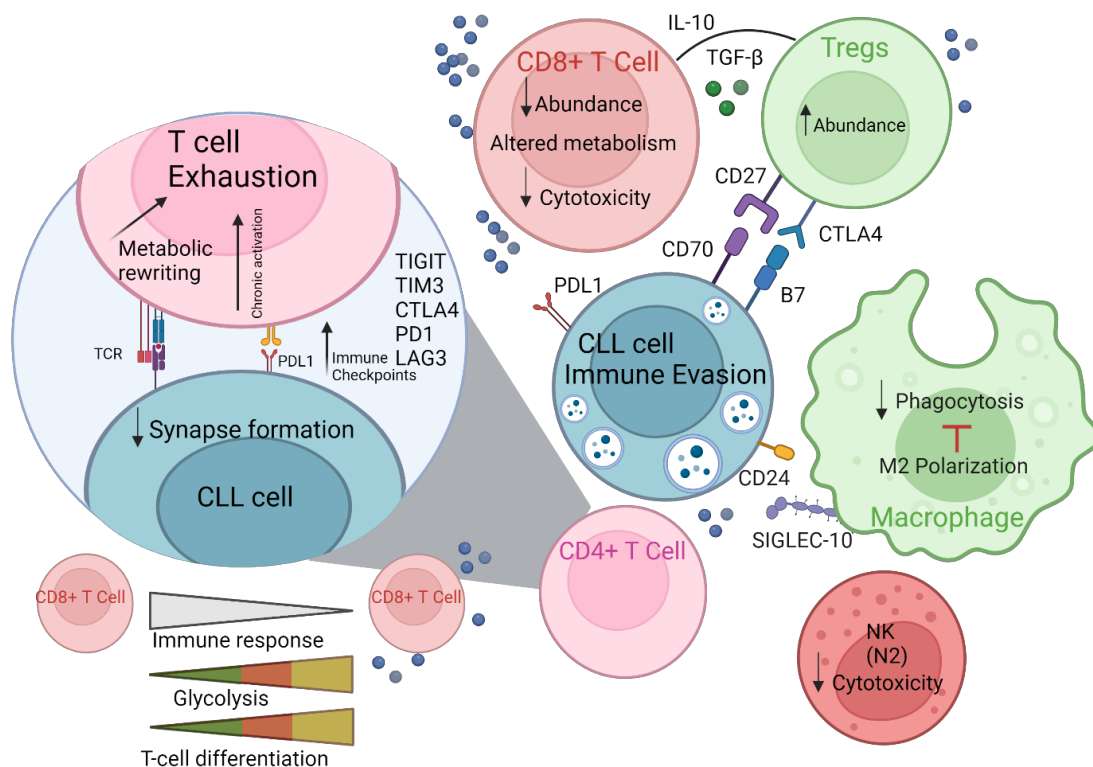


Figure 21 : Les cellules du microenvironnement accélèrent l'évasion immunitaire. 1- Outre les mécanismes intrinsèques aux cellules B de LLC, le microenvironnement tumoral induit également un phénotype d'évasion immunitaire vis à vis des cellules T, macrophages et cellules NK. Les divers mécanismes qui contribuent à la diminution de la surveillance immunitaire sont montrés. 2- Les cellules leucémiques produisent des niveaux élevés d'EVs qui contiennent des ligands de points de contrôle immunitaire (par exemple, PD-L1et GAL9) et des miARN (par exemple, miR-150, miR-210). Les EVs du MEL inhibent la fonction des cellules T CD8 en modifiant leur transcriptome, protéome et métabolome. (Figure réalisée avec [BioRender.com](https://www.biorender.com/)) et *adaptée selon* (Gargiulo et al. 2023; Zhong et Guo 2023).

Si l'acquisition des fonctions Breg par les cellules B de LLC constitue une question importante, elle reste peu explorée dans cette hémopathie. Il a été suggéré que ces événements seraient contrôlés par la localisation tissulaire des cellules B leucémiques. En effet, des travaux révèlent que ces cellules tumorales au sein des ganglions lymphatiques surexpriment un grand nombre de gènes associés à la tolérance immunitaire (CAV1, MCM3, BATF) par rapport à ceux retrouvés dans les cellules B de la moelle osseuse ou du sang périphérique (Mohr et al. 2016).

De manière intéressante, ces cellules B de LLC partagent un certain nombre de propriétés phénotypiques avec les cellules Bregs, comme notamment l'expression des CD27, CD24 et CD5 ainsi que de niveaux faibles d'IgM de surface (Taghiloo et Asgarian-Omrán 2024). Outre une

signature phénotypique commune, les cellules B de LLC, qui expriment le marqueur CD5, sont capables de produire de l'IL-10 et partagent ainsi des capacités immunosuppressives avec les cellules B10 (Garaud et al. 2011; 2018). De plus, Saulep-Easton et al. ont rapporté que BAFF, associé à TACI, joue un rôle clé dans la stimulation de l'activité des cellules B10 chez les patients atteints de LLC aux stades avancés (Saulep-Easton et al. 2016; Taghiloo et Asgarian-Omran 2024). Ces résultats étayent l'augmentation des taux sériques d'IL10 mesurés chez les patients atteints de LLC comparés aux témoins sains (Karmali et al. 2013; Mohr et al. 2016).

Bien que la classification des cellules B leucémiques en tant que cellules Bregs ne soit pas encore complètement établie, il apparaît clair que celles-ci présentent des caractéristiques immunosuppressives capables d'inhiber une immunité antitumorale efficace expliquant ainsi certains aspects immunosuppresseurs des cellules CLL déjà reconnus.

OBJECTIFS

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne qui est caractérisée par l'expansion clonale de lymphocytes B matures CD5⁺. L'hétérogénéité clinique de la LLC s'exprime sous des formes indolentes et progressives, souvent associées à une immunosuppression qui favorise la survenue de malignités secondaires et une plus grande susceptibilité aux infections. Les dysfonctionnements de la réponse immunitaire observés dans la LLC sont concomitants, notamment, à une dérégulation du compartiment cellulaire T et de l'environnement immun cytokinique. Ainsi, en maintenant un état inflammatoire chronique pro-tumoral qui stimule leur propre adaptation dysfonctionnelle, les cellules B de LLC échappent à la surveillance antitumorale tout en favorisant leur propre survie. Cette dernière dépend du récepteur à l'antigène (BCR) comme le démontre l'efficacité clinique d'inhibiteurs d'effecteurs de sa signalisation. Un des régulateurs négatifs de cette signalisation est le marqueur CD5 qui est aussi associé à des propriétés immuno-régulatrices.

Mon travail de thèse vise donc à approfondir la compréhension des dysfonctionnements immunitaires dans la LLC. Il explore les caractéristiques intrinsèques des lymphocytes B leucémiques liés à leur hétérogénéité fonctionnelle en réponse à des signaux extérieurs. Mes objectifs visent à apporter de nouveaux arguments à l'hétérogénéité biologique de la LLC tout en contribuant à la mise en évidence de nouveaux indicateurs de progression de cette pathologie.

Les objectifs de mon travail de thèse sont :

- D'identifier des sous-populations de lymphocytes B capables d'exprimer des facteurs immuno-régulateurs, de déterminer leur impact fonctionnel sur les cellules environnantes, et d'évaluer leur pertinence dans la progression de la LLC.
- D'étudier la dynamique d'expression du marqueur CD5 dans la LLC, d'évaluer son impact fonctionnel sur des cellules B malignes en réponse à une stimulation du BCR, et d'examiner le potentiel de l'hétérogénéité du CD5 membranaire en tant qu'indicateur d'évolution de la LLC.

RESULTATS

Article n°1 :

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

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne des cellules B fréquente chez l'adulte dans notre monde occidental. Son pronostic reste difficile à établir aux stades précoces de la maladie et les options thérapeutiques peuvent entraîner des résistances chez les patients. Caractérisée par une hétérogénéité clinique qui s'exprime sous des formes indolentes et progressives, la biologie de la LLC repose notamment sur des modifications des caractéristiques intrinsèques des cellules B leucémiques qui peuvent acquérir des propriétés de cellules B régulatrices. La progression de la LLC s'accompagne également d'une immunosuppression chez les patients, qui est concomitante à une dérégulation du compartiment cellulaire T et de l'environnement immun cytokinique. Cela suggère que des clones de cellules B de LLC exercent un effet dominant sur leur microenvironnement cellulaire.

Notre étude s'est donc intéressée à une meilleure compréhension des dysfonctionnements de la réponse immunitaire dans la LLC, en examinant les caractéristiques intrinsèques des lymphocytes B leucémiques en tant que potentielles cellules régulatrices.

Nos résultats ont révélé que les cellules B leucémiques exercent des fonctions régulatrices, en favorisant notamment l'augmentation de la proportion de lymphocytes Tregs et l'inhibition de la réponse cellulaire Th1. Cette capacité régulatrice implique la production de cytokines immunosuppressives majeures, telles que l'IL-10 et le TGFβ1. De manière intéressante, nos données montrent aussi que les cellules B leucémiques expriment le facteur de transcription FOXP3. Une analyse hiérarchique non supervisée du taux d'expression des trois facteurs immuno-régulateurs, à savoir l'IL-10, le TGFβ1 et FOXP3, a permis d'établir un lien entre leur expression plus élevée dans les cellules B tumorales, la plus grande proportion de cellules Treg dans les PBMC et, la progression de la maladie. L'ensemble de ces résultats met en évidence la diversité fonctionnelle de l'expansion clonale des cellules B de LLC au sein de la masse tumorale et permet d'ajouter un nouvel indicateur de prédiction de la progression de la LLC.

Il est intéressant de noter que nos résultats ont également permis de déterminer une signature phénotypique des sous-populations de cellules B leucémiques régulatrices. En particulier, les niveaux élevés de CD5 se sont révélés être une caractéristique phénotypique clé de ces sous-ensembles, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles investigations et à la rédaction d'un manuscrit intitulé : ***Features of heterogeneity in CD5 surface expression in Chronic Lymphocytic Leukemia.***

ARTICLE OPEN



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

Arsène Mékinian^{1,2}, Anne Quinquenel^{1,2,6}, Koceïla Ait Belkacem^{1,2,6}, Ferial Kanoun^{1,2}, Elisabetta Dondi^{1,2}, Emilie Franck^{1,2}, Marouane Boubaya³, Maïssa Mhibik^{1,2}, Fanny Baran-Marszak^{1,2,4}, Rémi Letestu^{1,2,4}, Florence Ajchenbaum-Cymbalista^{1,2,4}, Vincent Lévy^{3,5}, Nadine Varin-Blank^{1,2,7}✉ and Christine Le Roy^{1,2,7}✉

© The Author(s) 2023

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 TGFβ1, both associated with a memory B cell phenotype. Neutralizing secreted IL10 or inhibiting the TGFβ 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, TGFβ1 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.

Cancer Gene Therapy (2023) 30:1018–1028; <https://doi.org/10.1038/s41417-023-00602-5>

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 re-populate 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

¹INSERM, U978 Bobigny, France. ²Université Paris 13 dite « Sorbonne Paris Nord », UFR SMBH, Labex INFLAMEX, Bobigny, France. ³URC, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France. ⁴Service d'Hématologie Biologique, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France. ⁵CRC, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France. ⁶These authors contributed equally: Anne Quinquenel, Koceïla Ait Belkacem. ⁷These authors jointly supervised this work: Nadine Varin-Blank, Christine Le Roy. ✉email: nadine.varin@inserm.fr; christine.le-roy@inserm.fr

Received: 24 June 2022 Revised: 29 January 2023 Accepted: 23 February 2023

Published online: 28 March 2023

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 subgroups 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] and investigators were blinded to the group allocation during the experiment and when assessing the outcome. 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; Supplementary Tables 1, 2 provide biological and clinical parameters for cohorts 1 and 2.

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-CELLTM XR Cell Viability Analyzer based on the Trypan Blue Exclusion method (Beckman Coulter, Life Sciences, Villepinte, France). All cells (4 × 10⁶ 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 48 h 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

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.

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 2 × 10⁶ 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 and tested for mycoplasma contamination, respectively, in McCoy's 5 A 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 3.

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 TGFβ1 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 manufacturers' instructions. After washes, cells were analyzed on FACSCanto II or SymphonyTM A3 SORP analyzer (Becton Dickinson) driven by the BD FACSDIVATM software and data compiled with the FlowJoTM 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 72 h by V-plex assays (MSD) according to the manufacturer's protocols.

Statistical analyses

Data are expressed as means ± 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 TGFβ1 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 and the variance was similar between the groups that were compared. 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) (Fig. 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 (Fig. 1B). The CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ Tregs enhancement confirmed the increase of FOXP3⁺ T cells in the presence of B cells (Fig. 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: TNFα and IFNγ. This regulatory effect was dependent on the ration of T/B cells (1/1 to 1/10) present in the co-culture (Fig. 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 TGFβ1

Based on the regulatory function of CLL B cells observed, we next evaluated the expression of two major immunosuppressive cytokines, IL10 and TGFβ1, in a cohort of 28 patients. Flow cytometry analysis of CD5⁺CD19⁺ cells (Fig. S2A) in PBMC samples showed a highly variable proportion of cells expressing IL10 or TGFβ1 (Fig. 2A), with several of them expressing both cytokines (Fig. 2B). The variable expression and co-expression of IL10 and TGFβ1 were confirmed at the transcriptional level using RNA-Flow cytometry analysis, (Fig. S2B). We also examined whether IL10 and TGFβ1 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 TGFβ1 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%) (Fig. 2C, connected lines, and Fig. S2C), suggesting that BCR-mediated activation may be involved in the modulatory function of CLL B cells. Of note several samples containing very low proportions of TGFβ1⁺ cells remained at similar low expression upon BCR triggering.

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 (Fig. 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 (Fig. 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 (Fig. 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, a decrease of active TGFβ1 levels was observed in the supernatant (Fig. 3A). This decrease was likely due to some consumption of the BCR-induced expression of TGFβ1 since activation of Smad2/3, a direct cytoplasmic effector of TGFβ signaling, was observed in TGFβ1 expressing samples. Additional exogenous TGFβ1 treatment only resulted in a minor increase in Smad2/3 phosphorylation and, 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 (Fig. 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 (Fig. 3B), while IL4, IL1β, IFNγ, IL2, IL17 and IL13 remained unchanged (Fig. S3B). As shown in Fig. 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.

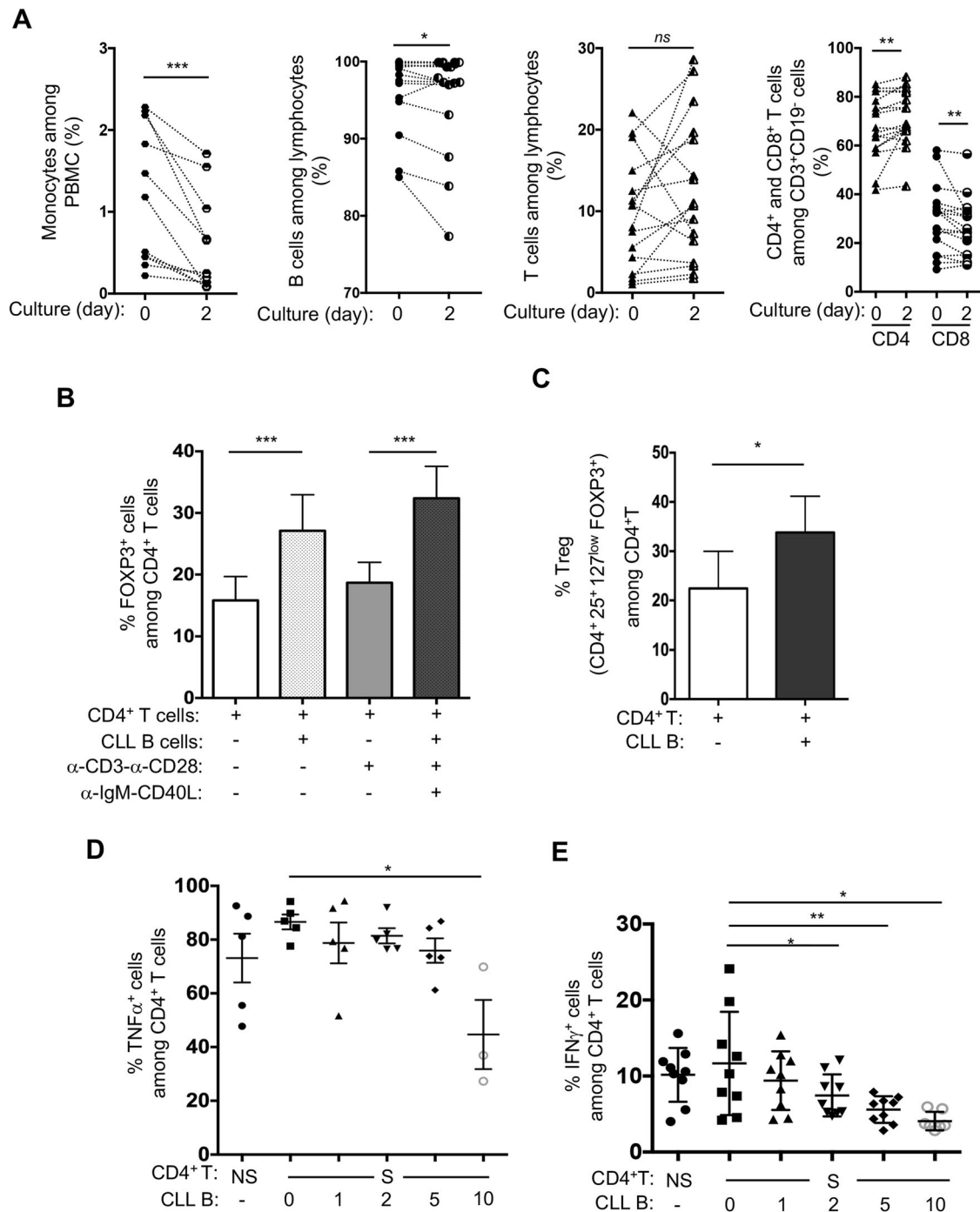


Fig. 1 CLL B cells undertake a regulatory crosstalk with their immune counterparts. **A** Frequencies of various cell subsets (monocytes, $n = 11$; leukemic B cells, $n = 17$; T cells, $n = 16$; CD4⁺/CD8⁺ T cells, $n = 17$) were evaluated by flow cytometry from CLL patients PBMCs prior to or upon 2 days of culture. Dotted lines link individual patient samples. Wilcoxon signed-rank test on means $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, 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 48 h 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 $*P < 0.01$; $**P < 0.001$.

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 (Fig. 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 (Fig. S4B).

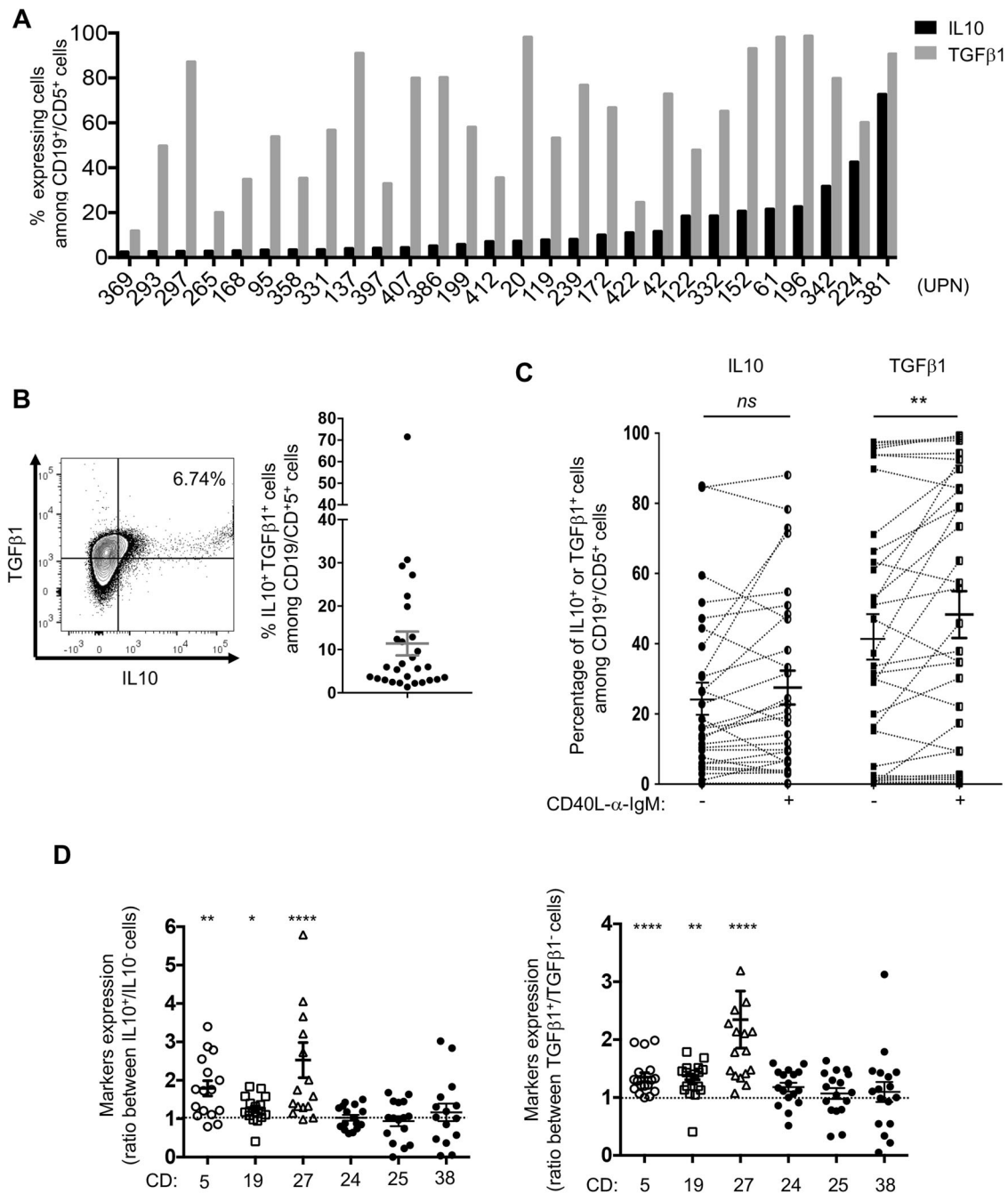


Fig. 2 Specific subsets of CLL B cells express IL10 together with TGFβ1. **A** Percentage of IL10-(black bars) or TGFβ1-(grey bars) expressing cells among CD19⁺ CD5⁺ cells from patient samples (UPN) were evaluated by flow cytometry and graphed; ($n = 28$). **B** Representative dot plot showing IL10⁺ 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, $^{**}P \leq 0.01$, 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 $^{*}P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.01$, $^{****}P \leq 0.0001$.

Given the ex-vivo and in vitro regulatory effects of CLL B cells on immune cells (Fig. 1), we cultured PBMCs from CLL patients for 2 days with or without inhibitors and analyzed Treg, Th2 and Th1 frequencies by flow cytometry (Fig. S4C). Blocking TGFβ signalling decreased Treg frequencies significantly (Fig. 4A), whereas trapping IL10 increased the proportion of IL4-producing T cells and decreased those of IFNγ-ones (Fig. 4B, C). We confirmed a

significant decrease of IL10⁺ CLL B cells in anti-IL10-treated PBMCs ($P = 0.0312$) and of TGFβ1⁺ CLL B cells in SB431542-treated PBMCs ($P = 0.0156$), suggesting that both treatments specifically and negatively modulate the expression of their respective intracellular cytokines (Fig. S4D). Also, SB431542 inhibitor did not change significantly the amount of TGFβ1 secreted by CLL B cells (Fig. S4E). These data highlight the critical role of TGFβs in the

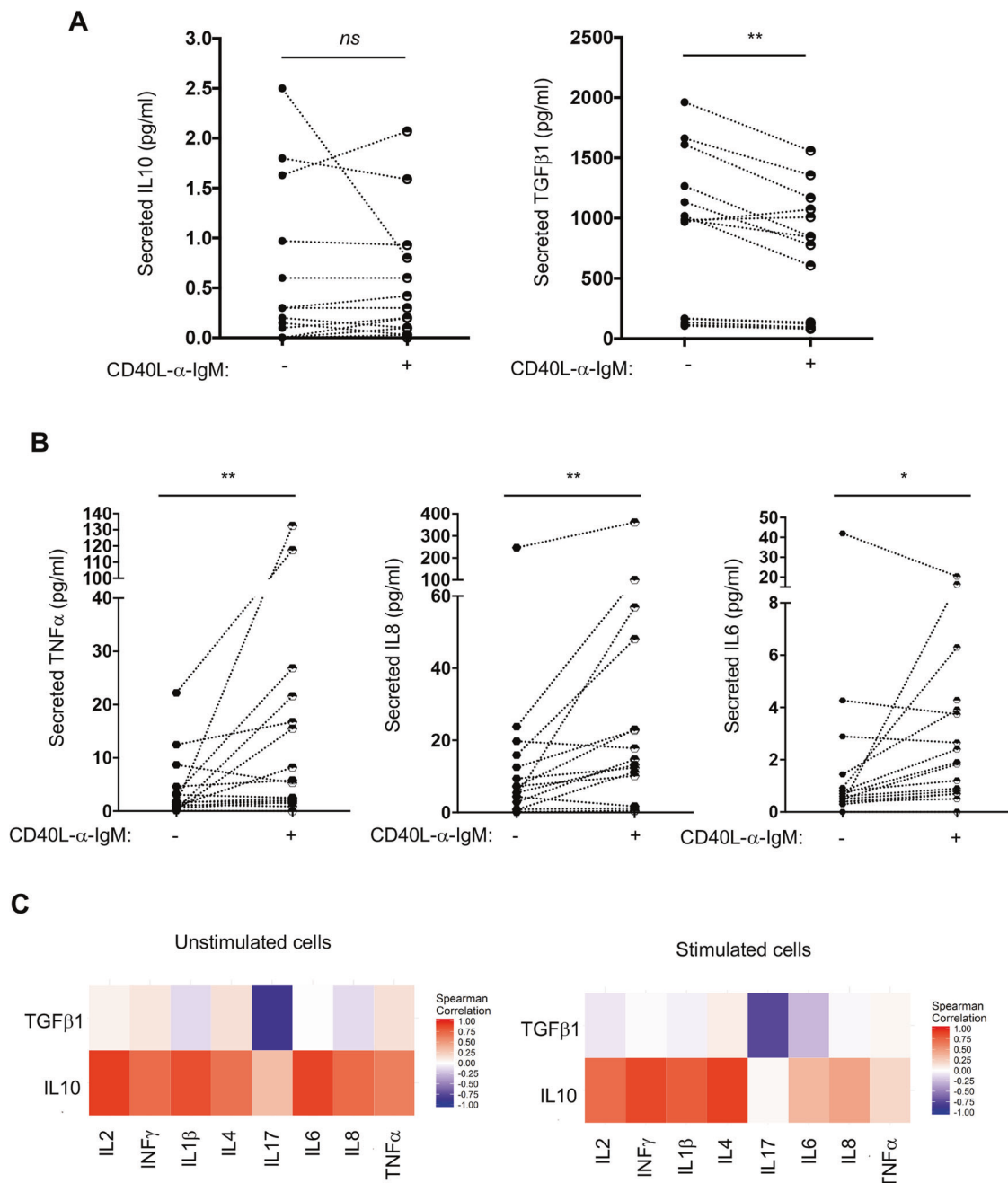


Fig. 3 CLL B cells secrete IL10, TGF β 1 as well as others soluble factors. Graphic representation of IL10 or TGF β 1 secreted levels (**A**), TNF α , IL8 or IL6 (**B**) evaluated by “multi-ELISA”-like technology ($n = 17$) from the culture supernatant of purified CD5 $^{+}$ CD19 $^{+}$ cells stimulated (+) or not (–) with CD40L/anti-IgM for 72 h. Wilcoxon matched-paired signed rank test, * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. **C** A Spearman correlation was established between the levels of IL10 or TGF β 1 and various cytokines secreted in the supernatant of cells stimulated (right) or not (left) for 72 h.

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; Table 1 and Supplementary Table 1) distinguished 2 clusters (Cluster 1 $n = 17$ & Cluster 2 $n = 11$) with a higher proportion of cells expressing both cytokines in group 2 (Fig. 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 (Fig. 5A; $n = 10$). CD4 $^{+}$ T cells were used as a positive

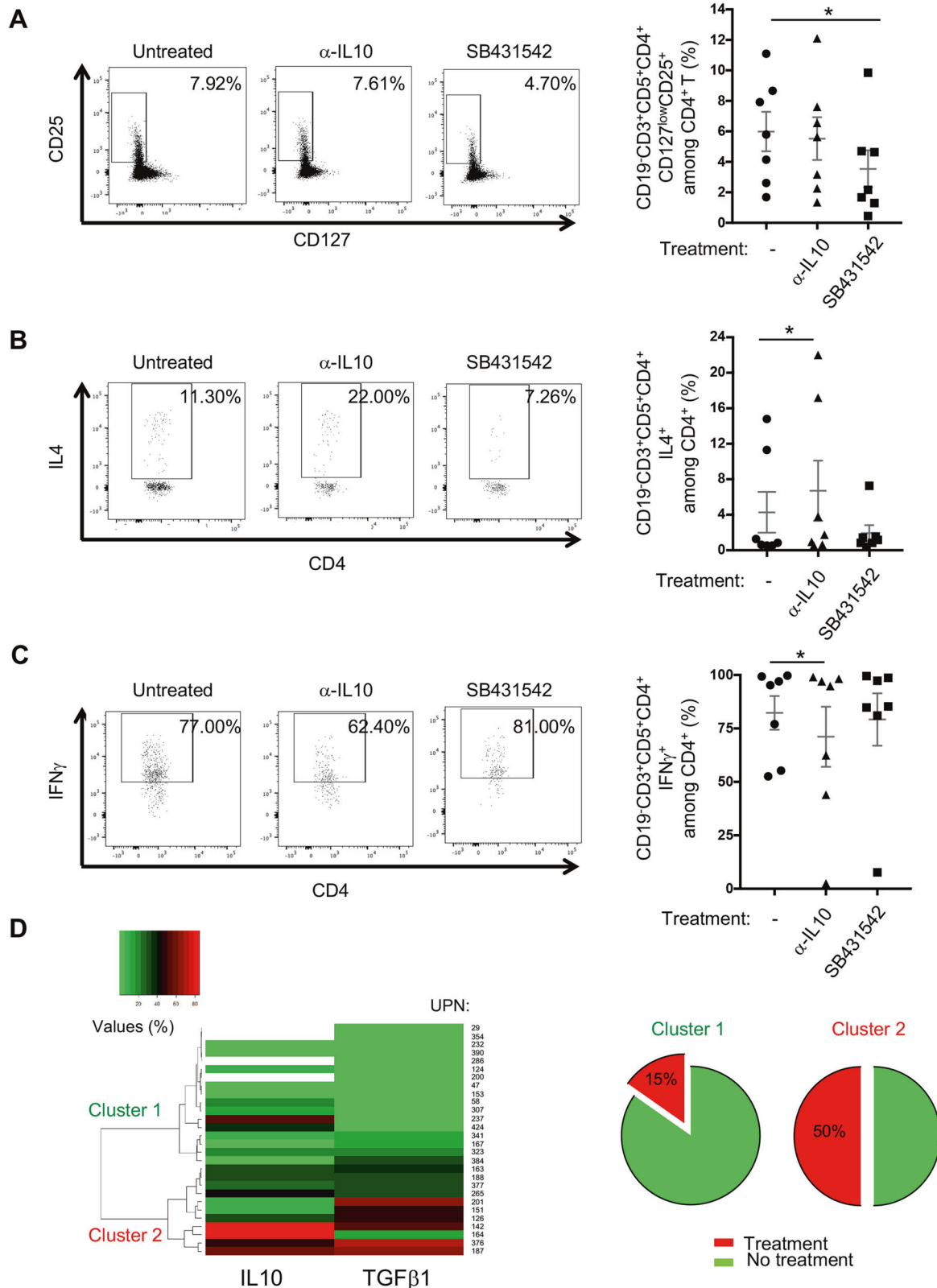
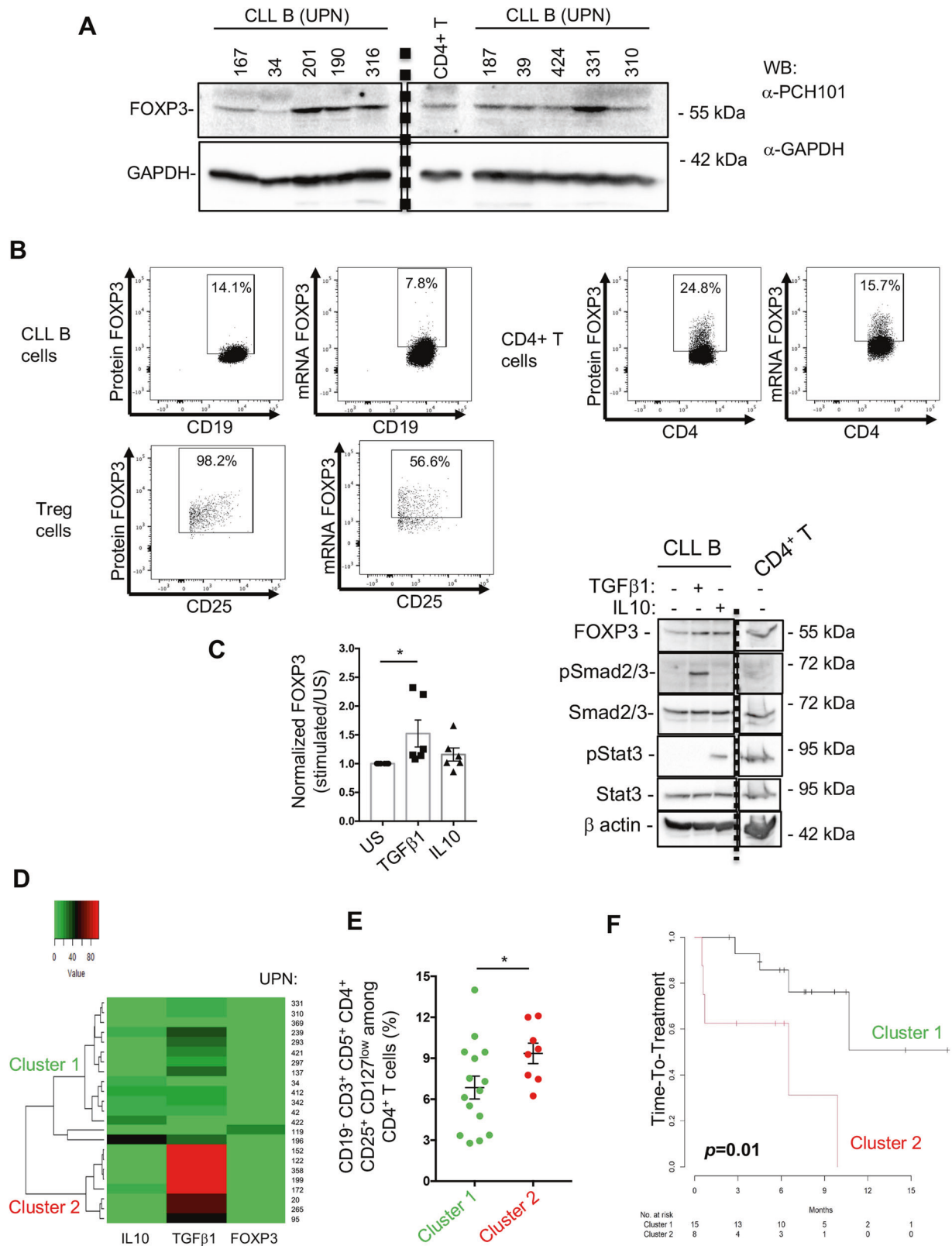


Fig. 4 Functional impact of IL10 and TGF β 1 on their immune counterparts. Representative flow cytometry dot plots (UPN 008 and 196) and graphic representation of Treg (CD5 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD127 low CD25 $^{+}$) (A) Th2 (CD19 $^{-}$ CD4 $^{+}$ IL4 $^{+}$) (B) and Th1 (CD19 $^{-}$ CD4 $^{+}$ IFN γ $^{+}$) (C) frequencies in PBMCs ($n = 7$) left untreated (–) or treated with α -IL10 Ab (10 μ g/ml) or TGF β RI inhibitor (SB431542, 5 μ M) for 2 days. In the representative dot plots, gates indicate positive events with their respective percentages. **D** Unsupervised hierarchical cluster analysis of IL10 and TGF β 1 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 and Supplementary Table 1 cohort 1).



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 (Fig. 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

Fig. 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, CD4⁺T and Tregs 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** CLL B cells were stimulated or not (US) with TGFβ1 or IL10 for 2 days and cell lysates from 6 patients were analyzed by western blot with the indicated antibodies; β-actin was used as loading control. Fold increase of FOXP3 is graphed; Wilcoxon test and $P=0.0312$. **D** 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). **E** Frequencies of Tregs among PBMCs are graphed and compared between the two clusters; Mann–Whitney test and $P=0.0473$. **F** According to patients' clinical annotations (Table 1, Supplementary Table 2 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.

Treg cells, CD19⁺CD5⁺ CLL B cells did expressed both FOXP3 RNA and protein (Fig. 5B and S5B). As a mirror of TGFβ— regulation of FOXP3 in Treg cells, TGFβ1-treated CLL B cells showed increased FOXP3 levels while IL10 treatment did not reach significant increase (Fig. 5C), further arguing for different roles between TGFβ1 and IL10. We next examined the clinical relevance of FOXP3⁺ B CLL cells in a second cohort of 23 untreated CLL patients (Table 1 and Supplementary Table 2). We analyzed expression of IL10, TGFβ1 and FOXP3 in CLL B cells (CD19⁺ CD5⁺ CD27⁺) by flow cytometry on thawed PBMC samples. Unsupervised hierarchical clustering of IL10-, TGFβ1- and FOXP3- expression frequencies in CLL B cells revealed the discrimination of two clusters of patients (Fig. 5D; 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 (Fig. 5E). 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 ($p=0.01$) (Fig. 5F), demonstrating that expression of IL10-, TGFβ1- 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 heterogeneous immune modulating functions of the clonal B cell expansion.

Phenotypic assessment of the regulatory populations in auto-immune diseases led to the description of various subtypes with IL10- or TGFβ1-dependent suppressive mechanisms [17, 19]. An initial study on CLL characterized a B10-like CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ regulatory subset [21]. CD27 marker was also found differentially expressed between IL10⁺ and IL10⁻ cells in our experiments and the CD5⁺CD19⁺CD27⁺ subpopulation contributed to the expression of IL10. 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 TGFβ1 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 TGFβ1 and IDO producers [31]. TGFβ1 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 TGFβ1⁺vs- subsets, which also resembled CD19⁺CD81⁺CD27⁺CD25⁺PD-L1^{hi} tumor evoked Bregs producing both IL10 and TGFβ1 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 TGFβ1 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 TGFβ1 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 NFκB regulates anti-tumour immunity [54, 55]. TGFβ1 and TGFβ2 have been implicated in FOXP3 induction in peripheral Tregs and adenocarcinoma expansion [56]. Moreover, FOXP3 and TGFβ1 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. FOXP3 expression is also regulated by both CD5 and TGFβ1 in this subset of Tregs [57]. Interestingly, we found that TGFβ1-treatment also leads to higher expression of FOXP3 in CLL B cells. 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.

DATA AVAILABILITY

The main data supporting the results in this study are available within the article and its Supplementary Information. All data generated in this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

REFERENCES

- Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:145–62.

- Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol*. 2010;20:431–8.
- Manna A, Kellett T, Aulakh S, Lewis-Tuffin LJ, Dutta N, Knutson K, et al. Targeting CD38 is lethal to Breg-like chronic lymphocytic leukemia cells and Tregs, but restores CD8⁺ T-cell responses. *Blood Adv*. 2020;4:2143–57.
- Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:17008.
- Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526:525–30.
- Redondo-Muñoz J, García-Pardo A, Teixidó J. Molecular Players in Hematologic Tumor Cell Trafficking. *Front Immunol*. 2019;10:156.
- Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16:684–701.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194:1639–47.
- Klein U, Tu Y, Stoltovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194:1625–38.
- Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008;112:188–95.
- Märklin M, Heitmann JS, Fuchs AR, Truckenmüller FM, Gutknecht M, Bugl S, et al. NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 2017;8:755.
- Taylor JG, Gribben JG. Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects. *Semin Cancer Biol*. 2015;34:36–45.
- Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J, Wasik E. T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia-the three-color flow cytometry analysis. *Leuk Res*. 2002;26:657–60.
- Jitschin R, Braun M, Büttner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote Tregs. *Blood*. 2014;124:750–60.
- Inoue S, Mai A, Dyer MJ, Cohen GM. Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2006;66:6785–92.
- Gorosito Serrán M, Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Acosta Rodríguez EV, Montes CL, Gruppi A. The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. *FEBS Lett*. 2015;589:3362–9.
- Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015;42:607–12.
- Noh J, Choi WS, Noh G, Lee JH. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+) Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune Netw*. 2010;10:247–9.
- Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol*. 2015;27:479–86.
- Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32:129–40.
- Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117:530–41.
- Shalpour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*. 2015;521:94–8.
- Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 2014;41:1040–51.
- 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;27:170–82.
- Drennan S, D'Avola A, Gao Y, Weigel C, Chrysostomou E, Steele AJ, et al. IL-10 production by CLL cells is enhanced in the anergic IGHV mutated subset and associates with reduced DNA methylation of the IL10 locus. *Leukemia*. 2017;31:1686–94.
- Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:34–46.
- Horikawa M, Minard-Colin V, Matsushita T, Tedder TF. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:4268–80.
- Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop

- exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol.* 2011;186:5569–79.
29. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med.* 2013;5:173ra23.
 30. Hagn M, Blackwell SE, Beyer T, Ebel V, Fabricius D, Lindner S, et al. B-CLL cells acquire APC- and CTL-like phenotypic characteristics after stimulation with CpG ODN and IL-21. *Int Immunol.* 2014;26:383–95.
 31. Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in a CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun.* 2015;59:53–60.
 32. Horii M, Matsushita T. Regulatory B cells and T cell Regulation in Cancer. *J Mol Biol.* 2021;433:166685.
 33. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . *Nat Rev Immunol.* 2010;10:554–67.
 34. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharm.* 2009;9:447–53.
 35. Hamblin TJ, Oscier DG. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev.* 1997;11:119–28.
 36. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J Exp Med.* 2011;208:67–80.
 37. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:841–94.
 38. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111:5446–56.
 39. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26:v78–84.
 40. Lagneaux L, Delforge A, Bernier M, Stryckmans P, Bron D. TGF- β activity and expression of its receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 1998;31:99–106.
 41. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun.* 2011;36:228–38.
 42. Chiorazzi N, Stevenson FK. Celebrating 20 Years of IGHV Mutation Analysis in CLL. *Hemasphere.* 2020;4:e334.
 43. Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood.* 2015;126:573–81.
 44. Lee KM, Stott RT, Zhao G, SooHoo J, Xiong W, Lian MM, et al. TGF- β -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur J Immunol.* 2014;44:1728–36.
 45. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol.* 2013;4:190.
 46. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* 2013;73:2468–79.
 47. Parekh VV, Prasad DV, Banerjee PP, Joshi BN, Kumar A, Mishra GC. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF- β 1. *J Immunol.* 2003;170:5897–911.
 48. Jak M, Mous R, Remmerswaal EB, Spijker R, Jaspers A, Yagüe A, et al. Enhanced formation and survival of CD4+ CD25hi Foxp3+ T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009;50:788–801.
 49. Premkumar K, Shankar BS. 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.* 2021;70:153–68.
 50. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res.* 2007;67:8344–50.
 51. Held-Feindt J, Hattermann K, Sebens S, Krautwald S, Mehdorn HM, Mentlein R. The transcription factor Forkhead box P3 (FoxP3) is expressed in glioma cells and associated with increased apoptosis. *Exp Cell Res.* 2013;319:731–9.
 52. Vadasz Z, Peri R, Eiza N, Slobodin G, Balbir-Gurman A, Toubi E. The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *J Immunol Res.* 2015;2015:254245.
 53. Szyllberg Ł, Karbownik D, Marszałek A. The Role of FOXP3 in Human Cancers. *Anticancer Res.* 2016;36:3789–94.
 54. Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol.* 2016;28:401–9.
 55. Kim JH, Hwang J, Jung JH, Lee HJ, Lee DY, Kim SH. Molecular networks of FOXP family: dual biologic functions, interplay with other molecules and clinical implications in cancer progression. *Mol Cancer.* 2019;18:180.
 56. Colamatteo A, Carbone F, Bruzzaniti S, Galgani M, Fusco C, Maniscalco GT, et al. Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Front Immunol.* 2019;10:3136.
 57. Henderson JG, Opejin A, Jones A, Gross C, Hawiger D. CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. *Immunity.* 2015;42:471–83.
 58. Van den Eynde M, Mlecnik B, Bindea G, Fredriksen T, Church SE, Lafontaine L, et al. The Link between the Multiverse of Immune Microenvironments in Metastases and the Survival of Colorectal Cancer Patients. *Cancer Cell.* 2018;34:1012–26.e3.
 59. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, Carter CR, Davison A, Hernandez-Fuentes M, et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25:1575–85.
 60. Larsen M, Arnaud L, Hié M, Parizot C, Dorgham K, Shoukry M, et al. Multi-parameter 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;41:2596–605.

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

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41417-023-00602-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Nadine Varin-Blank or Christine Le Roy.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Supplementary Information

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 ³, Maïssa Mhibik ^{1,2}, Fanny Baran-Marszak ^{1,2,4}, Rémi Letestu ^{1,2,4}, Florence Ajchenbaum-Cymbalista ^{1,2,4}, Vincent Lévy ^{3,5}, 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 URC, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

⁴ Service d'Hématologie Biologique, 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, TGFβ1, FOXP3, Regulatory B cells, CLL progression

Running title: Immuno-regulatory functions in CLL progression

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 or with RIPA 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 FACSDIVATM software and data compiled with the FlowJoTM 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 (2x10⁶) 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 and Tables

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 TGFβ1 (bottom). MFI ratio of CD5, 19, 27, 24, 25, 27 and 38 between IL10^{+/-} (n=16) and TGFβ1^{+/-} (n=15) cells are graphed (*cf.* Supplementary Table 4). Wilcoxon signed-rank test * P≤0.05, ** P≤0.01, **** P≤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≤0.05 and *ns*, not significant.

Supplementary Figure 3: CLL B cells are sensitive to TGFβ1 stimulation and secrete BCR-independent cytokines.

(A) CLL B cells were treated with (+) or without (-) with exogenous TGFβ1 (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 4: 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). (D) Graphs showing the percentages of IL10⁺ and TGFβ1⁺ CLL B cells among PBMC after treatments or not (-) with anti-IL10- or SB 431542 from 7 CLL samples; Wilcoxon test * $P=0.0469$ and $P=0.0156$ respectively). (E) Graph depicting secreted TGFβ1 in supernatants from untreated (-) or SB 431542-treated CLL B cells (n=7).

Supplementary Figure 5: FOXP3 is expressed in CD19⁺CD5⁺CD27⁺CLL B cells.

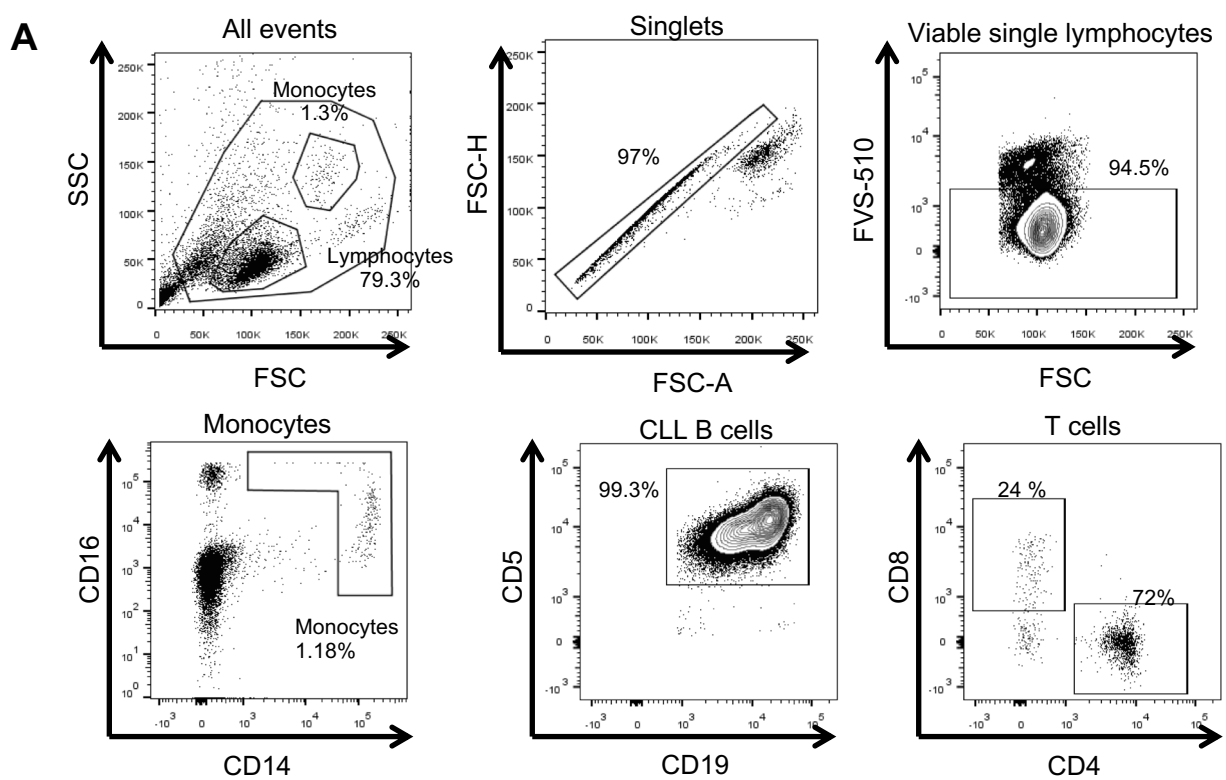
(A) Cell sorting gating strategy of B cells negatively selected for CD19⁺ CD3⁻ CD5⁺ CD27⁺; numbers are percentages of cells for each dot plot. Western blot analysis of FOXP3 expression using the D608R antibody on purified as well as purified and subsequently sorted CLL B cells. U2OS and HEK293T cells 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).

Supplementary Table 1: Features of CLL patients in the cohort #1 (n=28)

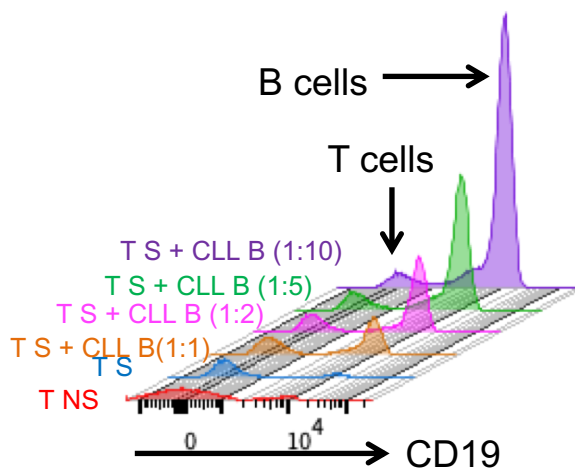
Supplementary Table 2: Features of CLL patients in the cohort #2 (n=23)

Supplementary Table 3: Antibodies and probes used in this study.

Supplementary Table 4: MFI of the CD markers used for Figures 2D and S2D



B



C

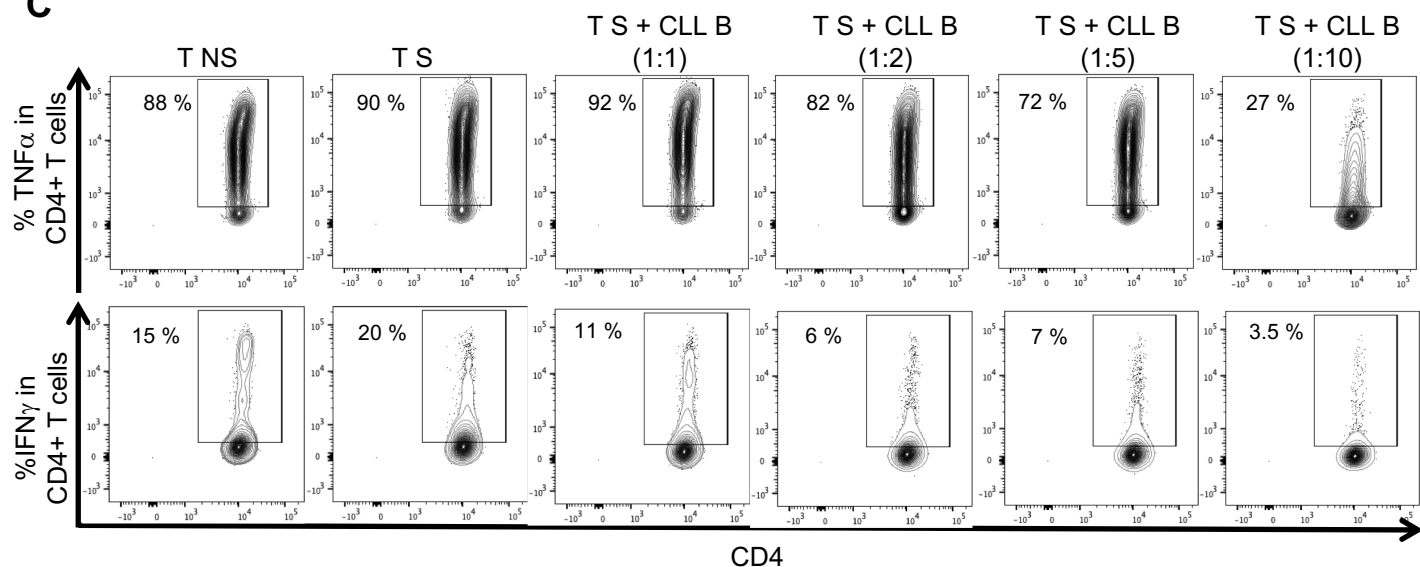
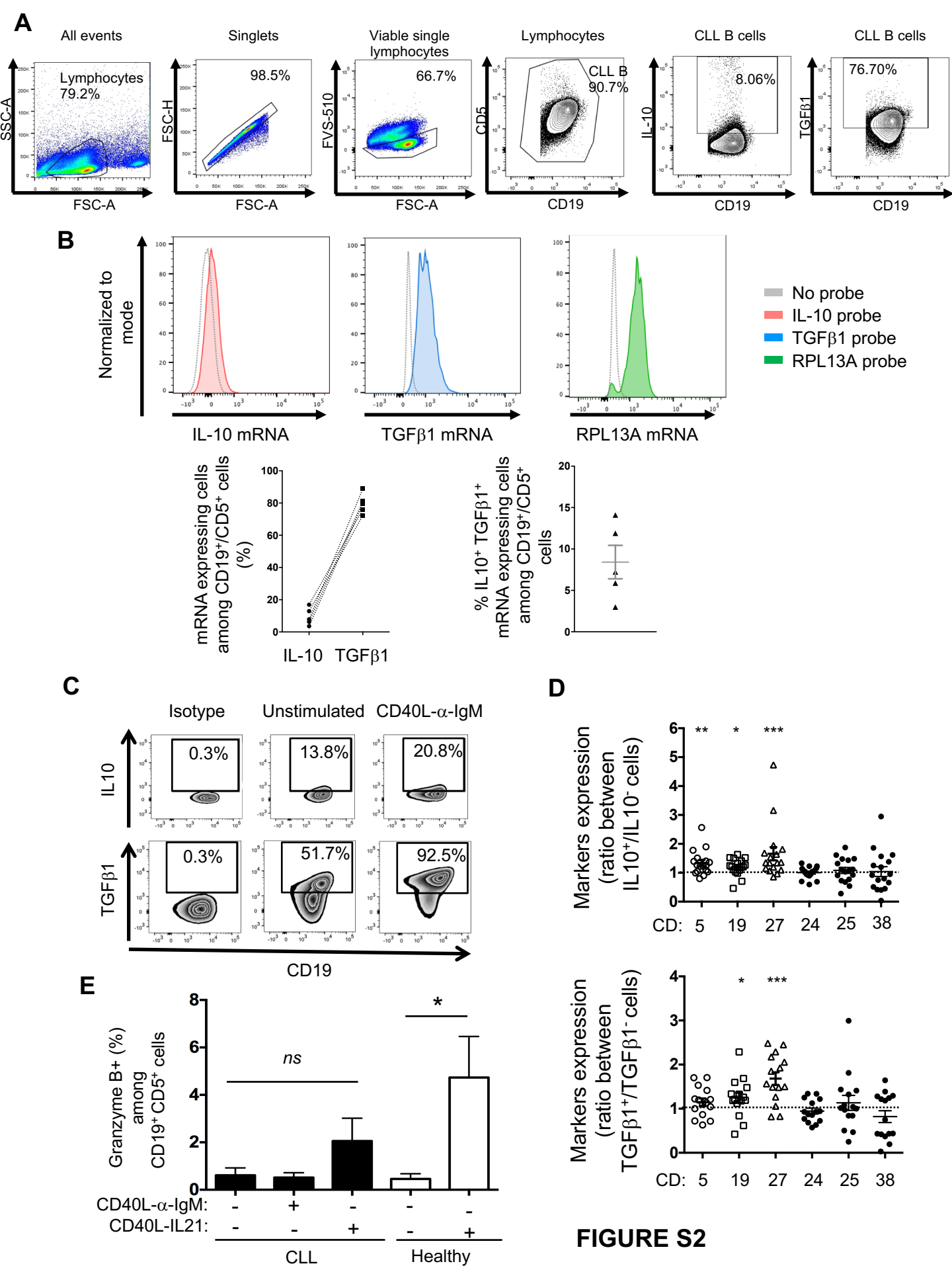
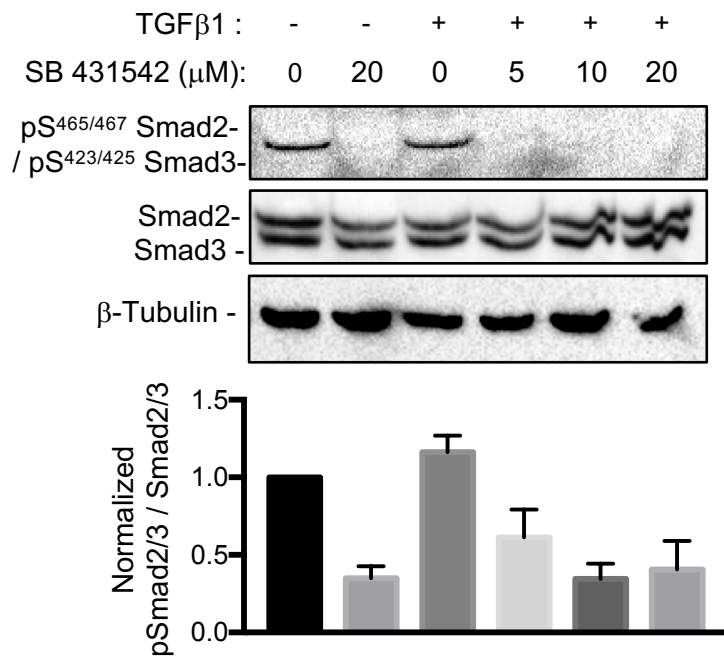
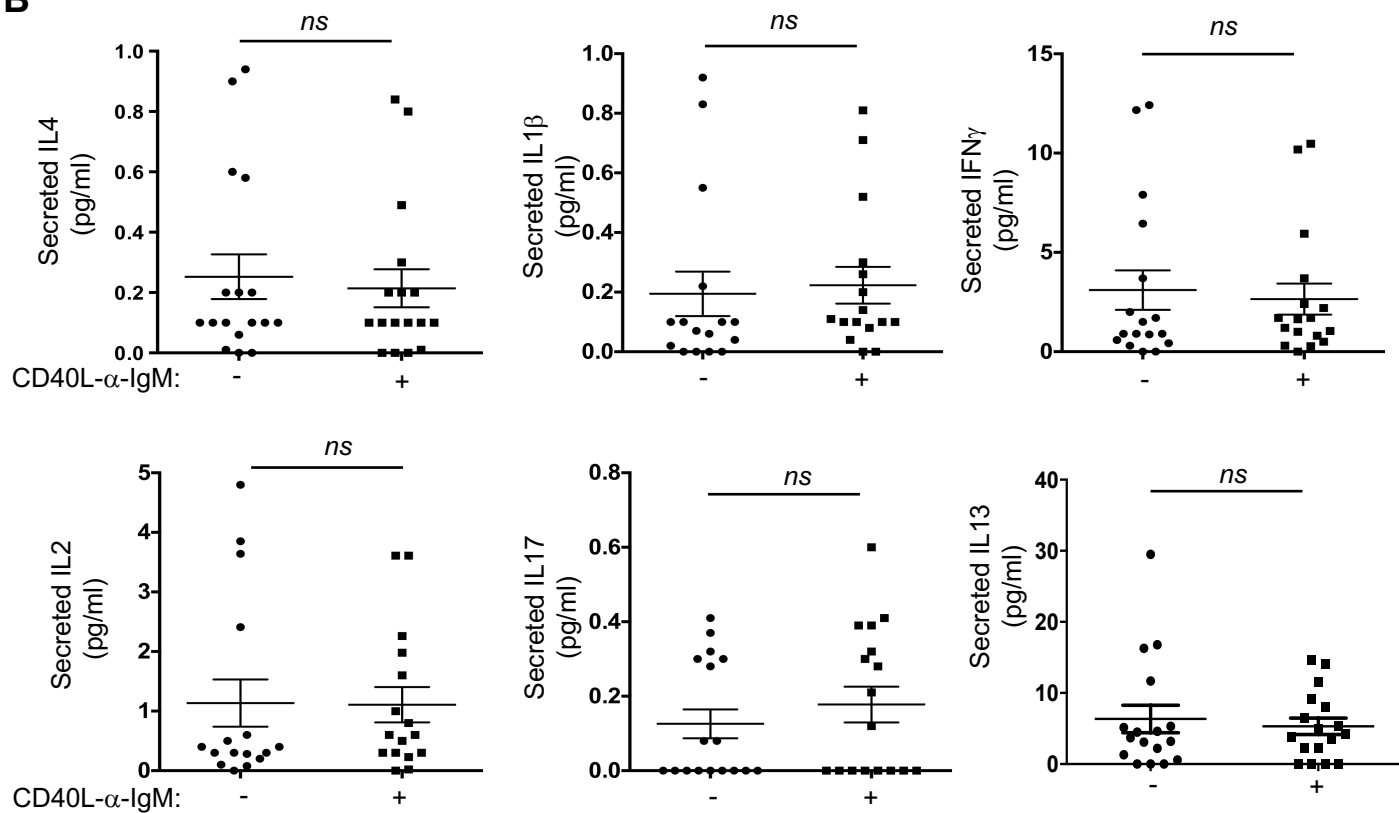


FIGURE S1



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

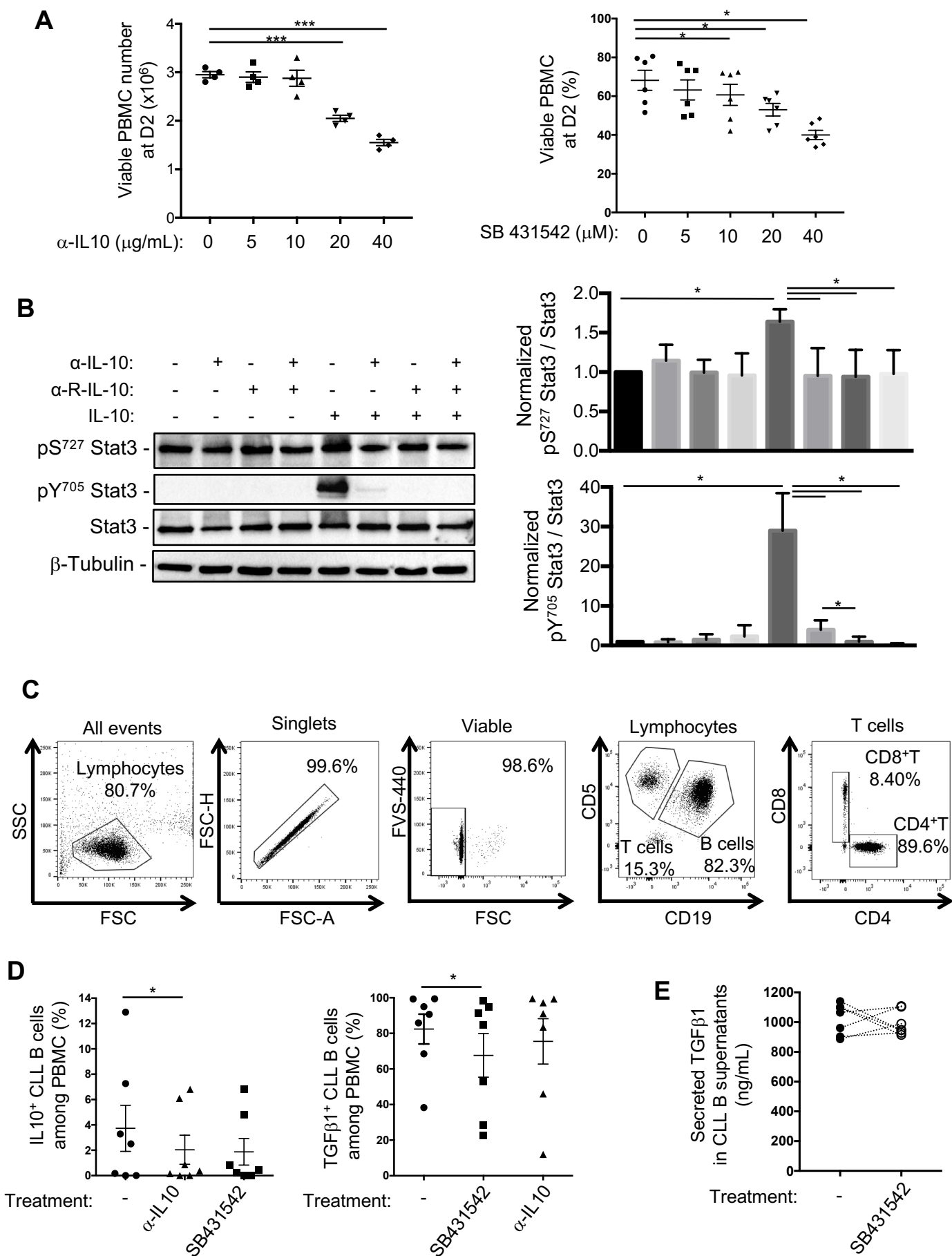


FIGURE S4

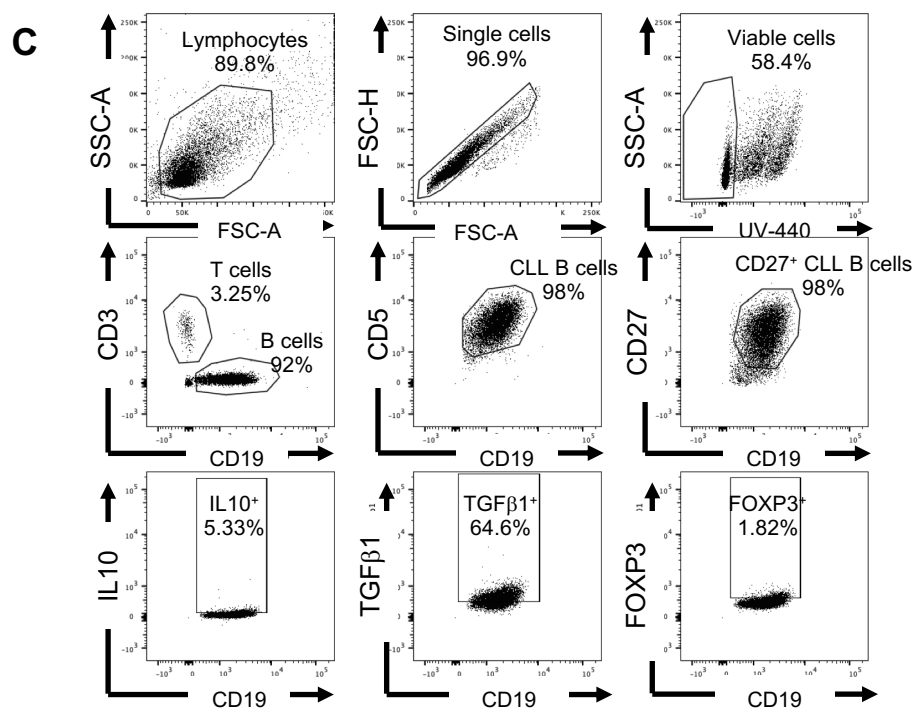
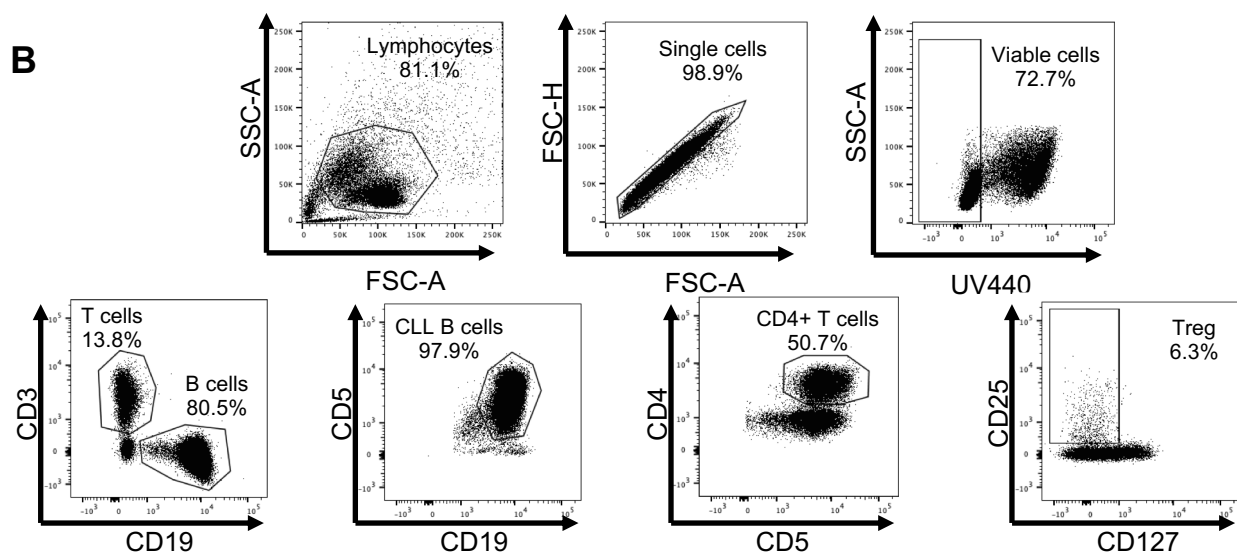
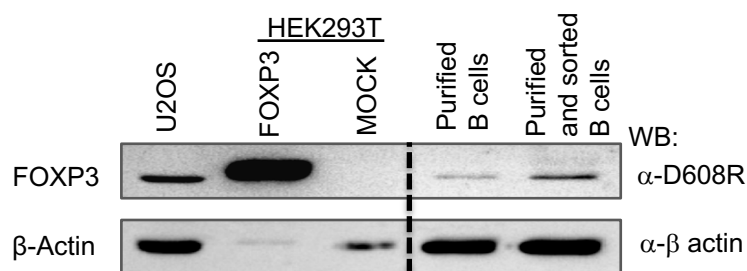
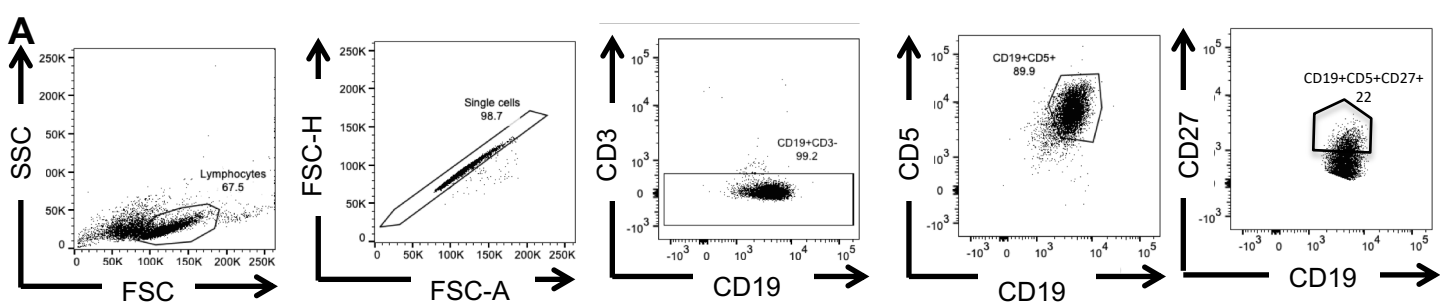


FIGURE S5

Supplementary Table 1: Features of CLL patients in the cohort #1 (n=28)

Cluster #	UPN	Age ^A	Sex ^B	Binet stage ^C	IGHV status ^D	Need of treatment ^E
1	29	56	M	A	UM	0
	354	65	M	B	UM	NA
	232	66	M	B	M	1
	390	55	M	A	UM	0
	286	64	M	A	M	0
	124	48	M	A	M	0
	200	55	M	A	M	NA
	47	75	M	A	M	0
	153	85	F	A	M	0
	58	71	F	A	M	NA
	307	56	F	A	M	0
	237	59	M	A	ND	0
	424	61	M	B	UM	NA
	341	45	M	C	UM	0
	167	59	F	B	UM	0
	323	68	F	A	M	0
	384	58	M	C	UM	1
2	163	63	M	A	UM	0
	188	53	M	A	M	1
	377	78	F	A	M	0
	365	72	F	A	UM	0
	201	49	M	C	UM	1
	151	74	F	C	UM	1
	126	53	M	A	M	NA
	142	60	F	C	UM	1
	164	70	F	A	UM	0
	376	48	M	C	UM	1
	187	64	M	A	M	0

Footnotes

A. Patient's age at the experiment time (year)

B. Female (F) and Male (M)

C. Stage A, B or C at the experiment time

D. Unmutated (UM) or Mutated (M) IGHV status

E. Need of treatment (1) or not (0) prior to the experiment time (more than 2 years)

ND: Not Determined; NA: Not available

Green: patients' cluster #1; Red: patients' cluster #2 (*cf.* Figure 4D)

Supplementary Table 2: Features of CLL patients in the cohort #2 (n=23)

Cluster #	UPN	Age ^A	Sex ^B	Binet stage ^C	IGHV status ^D	Need of treatment ^E
1	331	76	F	A	M	0
	310	67	F	B	UM	1
	369	62	F	A	M	0
	239	76	M	A	M	0
	293	65	M	A	M	0
	421	80	M	A	M	0
	297	68	F	A	M	0
	137	66	F	A	M	0
	34	92	F	A	M	0
	412	74	M	B	M	1
	342	40	M	A	UM	0
	42	92	F	C	UM	1
	422	57	M	A	M	0
	119	62	M	B	UM	1
	196	85	M	B	UM	1
2	152	75	F	B	M	1
	122	59	M	C	UM	1
	358	62	M	C	UM	1
	199	42	M	C	UM	1
	172	70	M	B	UM	1
	20	53	M	A	M	0
	265	54	M	A	UM	0
	95	62	M	A	UM	0

Footnotes

A. Patient's age at the experiment time (year)

B. Female (F) and Male (M)

C. Stage A, B or C at the experiment time

D. Unmutated (UM) or Mutated (M) IGHV status

E. Need of treatment (1) or not (0) after the experiment time

Green: patients' cluster #1; Red: patients' cluster #2 (*cf.* Figure 5D)

Supplementary Table 3: Antibodies and probes used in this study.

Application	Antibody name	Clone #	Catalog #	Fluorochrome	Company
Cell sorting	CD19	LT19	130-113-170	PE-Vio770	Miltenyi Biotec, Paris, France
	CD3	REA613	130-113-141	PerCP-Vio700	Miltenyi Biotec
	CD5	UCHT2	130-119-852	APC-Vio770	Miltenyi Biotec
	CD27	M-T271	130-113-633	VioBlue	Miltenyi Biotec
Western blot	FOXP3	PCH101	14-4776-82	none	eBioscience, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France
	FOXP3	D608R	12632S	none	Cell Signaling Technologies, Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France
	STAT3	D3Z2G	12640S	none	Cell Signaling Technologies
	pSer ⁷²⁷ STAT3	D8C2Z	94994S	none	Cell Signaling Technologies
	pTyr ⁷⁰⁵ STAT3	D3A7	9145S	none	Cell Signaling Technologies
	Smad2/Smad3	D7G7	8685S	none	Cell Signaling Technologies
	pSer ^{465/467} Smad2/ pSer ^{423/425} Smad3	D27F4	8828S	none	Cell Signaling Technologies
	GAPDH	411	sc-47724	none	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
	β-actin	AC-74	A5316	none	Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany
	β-tubulin	AA2	05-661-I	none	Sigma Aldrich
Flow Cytometry Immune cells in isolated PBMCs * 1 st panel & 2 nd panel	CD3* ^{&}	UCHT1	555332	FITC	BD Biosciences, Pont-de-Claix, France
	CD4* ^{&}	RPA-T4	560650	PerCPCy5.5	BD Biosciences
	CD5*	UCHT2	563516	APC-Cy7	BD Biosciences
	CD8 ^{&}	SK1	557834	APC-Cy7	BD Biosciences
	CD14*	MΦP9	563743	BV421	BD Biosciences
	CD16*	B73.1	561304	APC	BD Biosciences

	CD19*&	SJ25C1	557835	PE-Cy7	BD Biosciences
	CD56*	MY31	556647	PE	BD Biosciences
Flow Cytometry B/CD4 ⁺ T FOXP3	CD19	HIB19	561121	V500	BD Biosciences
	CD5	UCHT2	555352	FITC	BD Biosciences
	CD25	M-A251	557753	APC-Cy7	BD Biosciences
	CD127	HIL-7R-M21	560822	PE-Cy7	BD Biosciences
	FOXP3	259D/C7	560046	PE	BD Biosciences
Flow Cytometry PBMCs IL10/TGFβ1	CD3	UCHT1	555332	FITC	BD Biosciences
	CD5	UCHT2	563516	APC-Cy7	BD Biosciences
	CD19	SJ25C1	557835	PE-Cy7	BD Biosciences
	IL10	JES3-19F1	554707	APC	BD Biosciences
	TGFβ1	TW4-9E7	562423	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
Flow Cytometry B cells IL10/TGFβ1	CD19	HIB19	561121	V500	BD Biosciences
	CD5	UCHT2	561154	V450	BD Biosciences
	CD24	ML5	555427	FITC	BD Biosciences
	CD25	M-A251	557753	APC-Cy7	BD Biosciences
	CD27	M-T271	560612	PerCPCy5.5	BD Biosciences
	CD38	HIT2	560677	PE-Cy7	BD Biosciences
	IL10	JES3-19F1	554707	APC	BD Biosciences
	TGFβ1	TW4-9E7	562339	PE	BD Biosciences
Flow Cytometry B/CD4 ⁺ T IFNγ/TNFα	CD19	LT19	130-113-170	PEVio770	Miltenyi Biotec
	CD3	REA613	130-113-141	PerCPVio700	Miltenyi Biotec
	CD5	UCHT2	130-119-852	APCVio770	Miltenyi Biotec
	IFNγ	B27	559327	PE	BD Biosciences
	Mouse IgG1, κ	MOPC-21	551436	PE	BD Biosciences
	TNFα	cA2	130-120-490	FITC	Miltenyi Biotec
	REA Control IgG1	REA293	130-113-449	FITC	Miltenyi Biotec
Flow Cytometry PBMCs Anti-IL10 or TGFβRI	CD3	SK7	557832	APC-H7	BD Biosciences
	CD4	SK3	566104	BV480	BD Biosciences
	CD5	L17F12	751278	BUV615	BD Biosciences
	CD8	RPA-T8	563795	BUV395	BD Biosciences
	CD19	SJ25C1	563325	BV786	BD Biosciences
	CD25	M-A251	561398	Alexa Fluor 700	BD Biosciences
	CD127	HIL-7R-M21	566398	BB700	BD Biosciences

	IFN γ	4S.B3	560741	PE-Cy7	BD Biosciences
	Mouse IgG1 κ	MOPC-21	557872	PE-Cy7	BD Biosciences
	IL4	8D4-8	560671	APC	BD Biosciences
	Mouse IgG1 κ	MOPC-21	554681	APC	BD Biosciences
Flow Cytometry PBMCs IL10/TGF β 1/FOXP3 Cohort #2	CD3	SK7	741206	BUV496	BD Biosciences
	CD5	L17F12	751278	BUV615	BD Biosciences
	CD25	M-A251	557741	PE-Cy7	BD Biosciences
	CD19	SJ25C1	557791	APC-Cy7	BD Biosciences
	CD4	SK3	566104	BV480	BD Biosciences
	CD27	L128	612829	BUV737	BD Biosciences
	CD127	HIL-7R-M21	563324	BV786	BD Biosciences
	IL10	JES3-19F1	554707	APC	BD Biosciences
	Rat IgG2a κ	R35-95	551139	APC	BD Biosciences
	TGF β 1	TW4-9E7	562423	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
	Mouse IgG1 κ	MOPC-21	550795	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
	FOXP3	PCH101	53-4776-42	Alexa Fluor 488	eBiosciences
	Rat IgG2a κ	eBR2a	53-4321-80	Alexa Fluor 488	eBiosciences
Flow Cytometry B cells IL10/TGF β 1 mRNA	CD19	SJ25C1	557835	PE-Cy7	BD Biosciences
	CD5	UCHT2	562646	BV421	BD Biosciences
	CD3	UCHT1	561416	V500	BD Biosciences
	IL10 RNA probe		VA6-13016-PF	Alexa Fluor 750	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France
	TGF β 1 RNA probe		VA4-18704-PF	Alexa Fluor 488	Invitrogen
Flow Cytometry PBMCs mRNA/protein FOXP3	CD3	SK7	557832	APC-Cy7	BD Biosciences
	CD4	SK3	566910	PE	BD Biosciences
	CD5	L17F12	751278	BUV615	BD Biosciences
	CD19	SJ25C1	566396	BB700	BD Biosciences
	CD25	M-A251	557741	PE-Cy7	BD Biosciences
	CD27	M-T271	741833	BUV737	BD Biosciences
	CD127	HIL-7R-M21	563324	BV786	BD Biosciences
	FOXP3	PCH101	53-4776-42	Alexa Fluor 488	eBiosciences
	Rat IgG2a κ	eBR2a	53-4321-80	Alexa Fluor 488	eBiosciences
	FOXP3 RNA probe		VA1-15518-PF	Alexa Fluor 647	Invitrogen

Supplementary Table 4: MFI of the CD markers used for Figures 2D and S2D

UPN	Unstimulated											
	CD5	CD5	CD19	CD19	CD27	CD27	CD24	CD24	CD25	CD25	CD38	CD38
	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+
142	509	1420	1020	1610	456	2640	938	1338	189	310	705	840
365	884	1950	1310	2340	554	1780	652	570	390	564	447	451
323	460	605	989	1180	1200	2100	1188	1408	144	90	2250	3515
377	726	803	770	851	418	478	652	662	234	238	118	68
341	309	546	966	1130	308	398	1700	1090	230	244	413	351
376	312	1060	1530	2810	842	6020	1798	1334	312	454	1740	4940
237	266	533	1870	1820	226	828	568	456	1052	324	2215	76
164	779	1990	905	1230	438	1776	1042	1566	266	274	735	985
58	518	1490	727	1020	240	654	818	1088	139	104	247	116
187	1780	3130	1830	1980	1164	2340	1782	2280	380	135	570	209
126	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
201	3690	6380	2170	3440	2040	3240	1112	942	390	554	416	1255
232	1170	1260	1300	1560	588	778	1420	1670	254	426	620	1135
390	706	560	1110	1150	518	530	1400	1226	119	122	555	725
307	1980	2410	2690	2530	928	1232	1702	1206	684	660	1290	1340
167	1410	1700	1050	1380	1742	2440	792	1090	400	ND	ND	ND
124	1900	1620	6440	2620	574	564	910	558	2260	510	6250	323

UPN	Stimulated											
	CD5	CD5	CD19	CD19	CD27	CD27	CD24	CD24	CD25	CD25	CD38	CD38
	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+	IL10-	IL10+
142	425	597	989	1230	600	1894	764	704	139	224	590	540
365	698	879	1000	1270	498	968	640	684	246	274	347	178
323	384	397	918	1000	434	476	806	766	176	119	1715	2145
377	553	678	737	755	338	326	644	576	210	195	178	72
341	260	392	786	1200	224	406	1052	624	191	197	409	326
376	254	482	1250	1900	828	1270	1032	712	254	364	1315	2445
237	277	275	1090	1070	191	220	336	392	324	350	484	320
164	296	363	1050	1580	191	320	330	344	200	264	136	61
58	530	1360	528	700	332	1570	514	684	195	177	365	590
187	2420	3290	1820	2200	1340	1796	2200	2400	202	146	231	173
126	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
201	2430	4320	1920	3140	1428	2340	934	888	314	464	380	1120
232	1010	1100	901	991	446	602	986	1124	165	184	328	453
390	621	560	850	1010	450	612	1016	1056	83	155	453	540
307	2030	2830	3020	3650	720	962	1122	1164	736	1092	935	1465
167	479	501	1350	952	386	412	642	788	1870	1012	91	87
124	1690	1350	4600	2130	578	494	886	618	2240	630	6700	238

UPN	Unstimulated											
	CD5	CD5	CD19	CD19	CD27	CD27	CD24	CD24	CD25	CD25	CD38	CD38
	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+
142	836	1660	1260	1770	1442	3040	1168	1312	242	344	675	985
365	1150	1480	1460	2610	730	1560	612	612	440	552	451	445
323	473	523	985	1180	1040	3320	1108	1754	133	139	2280	3275
377	676	881	759	857	386	566	624	728	197	322	121	66
341	315	363	911	1380	284	648	1602	2300	234	220	450	245
376	542	541	1580	2270	424	4200	1256	1752	478	366	3145	2925
237	359	365	1830	1910	458	492	502	698	372	552	216	675
164	1780	2330	1140	1660	1528	2260	1518	1304	260	364	860	1540
58	587	710	792	898	282	378	864	960	131	170	215	292
187	1610	3100	1840	1960	914	2420	1612	2380	432	153	645	219
126	765	1100	1960	2960	690	950	1556	2480	432	342	494	108
201	2530	4940	1560	2630	1106	2780	1152	1052	312	460	368	525
232	1160	1410	1290	1910	586	1254	1416	2040	254	276	620	710
390	705	845	1110	1590	516	932	1400	1744	120	94	555	660
307	2030	2160	2650	3570	956	1352	1626	1184	680	638	1295	1430
167	1350	1790	1030	1230	1696	2060	786	834	390	462	51	51
124	1860	2740	6430	2620	562	1002	908	468	2260	740	6250	312

UPN	Stimulated											
	CD5	CD5	CD19	CD19	CD27	CD27	CD24	CD24	CD25	CD25	CD38	CD38
	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+	TGFβ1-	TGFb1+
142	500	604	1070	1260	908	2080	742	700	172	228	478	580
365	677	811	971	1150	400	822	714	622	254	254	750	146
323	457	288	1120	690	462	378	940	594	228	106	2205	955
377	639	461	794	665	330	348	646	600	222	187	204	85
341	262	274	764	1130	220	344	1062	770	195	164	436	191
376	420	364	1180	1570	468	1146	1158	790	312	304	2435	1825
237	328	371	1340	1790	248	372	338	380	234	424	91	113
164	1010	1430	597	752	830	2060	706	606	178	185	481	615
58	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
187	1810	3080	1820	2030	946	1752	1838	2460	300	151	383	165
126	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
201	2040	3120	1510	2410	1012	1948	968	898	268	378	329	540
232	1010	1010	899	1070	444	658	984	1232	166	168	327	387
390	620	757	849	1430	450	978	1014	1358	83	89	452	585
307	2150	2370	3130	3800	768	972	1134	872	784	1124	1010	1400
167	434	740	1080	2470	344	512	612	746	1390	4160	136	51
124	1720	1230	4690	1970	582	480	896	514	2340	582	7100	196

Article n°2 :

Features of heterogeneity in CD5 surface expression in Chronic Lymphocytic Leukemia

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par l'expansion clonale de lymphocytes B matures CD5⁺. Bien que cette accumulation clonale ait été initialement attribuée à un défaut des voies apoptotiques, l'efficacité clinique des inhibiteurs de la signalisation du récepteur à l'antigène (BCR), tels que l'Ibrutinib (inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton, BTK) et l'Idelalisib (inhibiteur de la phosphoinositide 3-kinase, PI3K), suggère qu'elle résulte aussi d'une sélection positive de clones dotés d'une grande capacité de prolifération en réponse à des signaux stimulants, renforçant notamment le rôle pathogénique du BCR dans la LLC (Datta et Jumaa 2022). Il a été établi que le CD5 est un régulateur négatif de la signalisation du BCR et nos résultats suggèrent l'importance de ce marqueur dans le phénotype régulateur des cellules B de LLC (Mékinian et al. 2023).

Au cours de ma thèse, j'ai donc étudié l'expression du CD5 à la surface des cellules B leucémiques, en explorant son hétérogénéité et en analysant les changements moléculaires et fonctionnels induits. Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les niveaux de CD5 modulent la réponse cellulaire pathologique permettrait, au moins en partie, d'expliquer l'hétérogénéité clinique de la LLC, qui reste insuffisamment élucidée par les facteurs pronostiques disponibles.

Dans ce manuscrit, j'ai effectué une analyse cytométrique des profils d'expression du CD5 membranaire sur des cellules B de patients atteints de LLC. Cette analyse a permis de distinguer deux sous-populations de cellules leucémiques, appelées cellules CD5^{Low} et CD5^{High}, au sein de la masse tumorale. L'analyse transcriptomique de ces deux sous-populations montre qu'elles présentent des différences dans l'expression de transcrits impliqués dans les voies de signalisation du BCR, de la production de chimiokines et de la cytokine IL-10. De plus, une approche protéomique par cytométrie en flux révèle que ces deux sous-populations diffèrent également par l'expression à la membrane de récepteurs d'activation et de facteurs de survie. Ces résultats renforcent particulièrement ceux déjà publiés (Mékinian et al. 2023), qui associent les niveaux d'expression élevés du CD5 aux fonctions immuno-régulatrices des cellules B de LLC.

Afin de mieux comprendre l'impact fonctionnel de la dynamique d'expression du CD5 dans les cellules B de LLC, j'ai utilisé la lignée cellulaire HG3 qui présente une expression bimodale du CD5 membranaire (Quentmeier et al. 2016; Rosén et al. 2012). Cette expression bimodale a été successivement inversée par la technologie CRISPR-Cas9 en ciblant le gène CD5 de la lignée B de LLC.

Une analyse fonctionnelle, par la mesure comparative des capacités sécrétoires des cellules HG3 parentales et des trois lignées cellulaires obtenues par des KO consécutifs du CD5, a révélé un changement progressif des profils cytokiniques en passant d'une dominance anti-inflammatoire vers un profil pro-inflammatoire. Ce profil est particulièrement marqué par une diminution des taux d'IL-10 sécrétés au cours de la diminution d'expression du CD5, fournissant ainsi de nouveaux arguments de l'implication fonctionnelle du CD5 dans l'échappement à l'immunité anti-tumorale.

Pour lier l'expression du CD5 à son rôle d'inhibiteur dans la signalisation du BCR, j'ai quantifié la réponse métabolique des différentes lignées HG3, parentales et successivement invalidées pour le gène CD5, suite à un engagement du BCR. Mes résultats démontrent que l'invalidation du CD5 augmente l'activité métabolique en réponse à une stimulation du BCR *in vitro*, ce qui conforte le rôle régulateur négatif du CD5 dans la propagation du signal du BCR dans ce modèle pathologique. Ils suggèrent également que l'hétérogénéité d'expression du CD5 confère aux cellules B tumorales un avantage de survie qui dépend de l'activation du BCR. De façon intéressante, mon analyse du profil d'expression du CD5 membranaire des cellules B de LLC a permis de distinguer deux groupes de patients : le groupe des patients homogènes et celui des patients hétérogènes. Une mesure de l'activité métabolique des échantillons de LLC suite à une stimulation du BCR démontre que les cellules leucémiques des patients appartenant au groupe « hétérogène » présentent un avantage de survie par rapport aux échantillons cellulaires du groupe des patients « homogènes ». Sachant que l'avantage de survie cellulaire est inversement corrélé à la survie globale du patient, mes résultats suggèrent que le profil CD5 des cellules B leucémiques d'un patient pourrait servir d'indicateur de la progression de la maladie.

Features of heterogeneity in CD5 surface expression in Chronic Lymphocytic Leukemia

Kanoun F.^{1,2}, Lambert M.^{1,2}, Irles C.^{1,2}, Aubard L.^{1,2}, Le Coquil S.^{1,2}, Oudar A.^{1,2}, Dondi E.^{1,2}, Cymbalista-Ajchenbaum F.^{1,2,3}, Lévy V.^{2,4}, Varin-Blank N.^{1,2}, Lesage D.^{1,2} and Le Roy C.^{1,2}

¹INSERM U978; Bobigny, France

²Université Sorbonne Paris Nord, LabEX INFLAMEX; UFR SMBH, Bobigny, France

³Service d'hématologie biologique, AP-HP, Avicenne Hospital; Bobigny, France

⁴CRC/URC, AP-HP, Avicenne Hospital; Bobigny, France

Abstract:

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a lymphoproliferative malignancy characterized by an accumulation of tumor B cells expressing the CD5 antigen. Despite its diagnostic and prognostic significance, the functional role of CD5 in CLL remains poorly understood. This study aims to examine the dynamic variability and heterogeneity of CD5 surface expression in CLL tumor cells and to elucidate the mechanisms by which it modulates CLL B cell responses. A transcriptomic approach was employed to identify shared biological profiles between CD5^{high} and CD5^{low} subpopulations, which included the BCR signaling pathway, IL10 and chemokine production. Causal network analysis and flow cytometry demonstrated that CD5 exerts a positive regulatory effect on receptors associated with activation and survival signals, thereby establishing a potential link between regulatory B cells and the proliferative B cell fraction. Moreover, CD5 gene targeting resulted in a reversal of the bimodal CD5 distribution and secretome of the HG3 CLL cell line, with a shift from anti-inflammatory to pro-inflammatory. Furthermore, our results demonstrate that CD5 surface expression confers a leukemic survival advantage following BCR response, suggesting that targeting CD5 may be an effective therapeutic strategy to disrupt these survival mechanisms and improve CLL treatment outcomes.

Keywords: CLL subpopulations, CD5, BCR, activation markers, chemokine receptors, cytokines, cell survival

Introduction:

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a lymphoproliferative malignancy that predominantly affects adults. The presentation and course of CLL are highly variable, with some cases progressing at a slow pace as an indolent disease and others progressing rapidly and aggressively. Notwithstanding the considerable advances that have been made in the field of therapeutic options, the more severe forms of CLL frequently respond inadequately to conventional treatment and develop drug resistance. Furthermore, patients with CLL exhibit a range of secondary immunodeficiency. This is attributable to immune system dysfunction resulting from the disease itself and the cumulative immunosuppression associated with specific treatments and chemotherapy (1, 2).

Patients with CLL display an expansion of tumor cells that typically express CD5, the function of which remains unclear. This marker is present mainly on T lymphocytes, B-1a cells, and regulatory B cells (3). The detection of the CD5 antigen on B cells is part of the lymphocytosis detection for CLL (4), and its expression level has been proposed as a novel prognostic marker (5-7). Aberrant CD5 expression plays a role in the development and progression of CLL through negative regulation of BCR- or CD5-dependent triggering (8-10). In addition to its diagnostic and prognostic values, CD5 represents a promising therapeutic target (11) and several preclinical studies have investigated anti-CD5 immunotherapy for CLL (12, 13).

CLL is characterized by the clonal expansion of mature CD5⁺ B lymphocytes in peripheral blood (PB), bone marrow (BM), and lymphoid tissues (14, 15). Following purification from the peripheral blood, some CLL cells evade apoptosis *in vitro* by increased survival upon BCR stimulation (16, 17), which inversely correlates with overall patient survival (18). The neoplastic proliferation of cells occurs mainly in lymph nodes (LN) within pseudo-follicles, which are of critical importance for the pathogenesis of CLL (19, 20). This lymph node compartment provides a supportive environment for CLL proliferation and offers survival factors for malignant cells, including BCR engagement (21) and CXCR4 activation by SDF-1 α / CXCL12 (22). Enlarged lymph nodes are associated with a reduction in CXCR4 and CXCR5 expression following BCR stimulation, which subsequently decreases CXCR4-dependent CLL B cell migration (23). Distinct CD5 and CXCR4 expression levels are associated with specific circulating B CLL immune phenotypes, proliferation, peripheral blood persistence and survival (24, 25). Moreover, elevated CD5 expression levels are associated with higher levels of IL10 and TGF β 1 in CLL B cells. This cytokine production is linked to reduced Th1 cells and increased Treg cells during CLL progression, indicating that CD5 expression levels may be associated with CLL Breg function (26). It is noteworthy that the continuum of surface CD5 expression, with a predominance of CD5^{high} cells, suggests a dynamic

balance rather than a fixed state. This observation is based on studies of BCR phylogenetics during the evolution of CD5^{low} and CD5^{high} cells (27).

In view of the complexity and controversial role of CD5, the objective of this study was to investigate the dynamic variability and heterogeneity of CD5 surface expression within the tumor mass of CLL patients and to elucidate the mechanisms by which CD5 contributes to modulate CLL B cell responses. To this end, primary leukemic B cells from CLL patients were sorted according to their CD5 surface expression, resulting in two distinct groups: CD5^{low} and CD5^{high}. Gene set enrichment analysis (GSEA) of the transcriptomic profiles revealed a significant enrichment in gene sets involved in the BCR signaling pathway, the production of IL10 and the regulation of chemokine production in the CD5^{high} subpopulation. To further our investigation, we demonstrated significant differences in surface expression levels of activation markers and chemokine receptors between CD5^{low} and CD5^{high} patient B cells. Subsequently, we generated CRISPR/Cas9-mediated CD5 knock-out HG3 CLL cell lines to invalidate CD5 surface expression phenotype. HG3 CD5 knock-out cells exhibited a progressive alteration in their secretion profile for key cytokines, including IL10. Finally, we investigated the impact of BCR stimulation on the survival advantage of tumor cells in both HG3 CD5 knock-out cells and patient-derived CLL B cells. We observed a degree of heterogeneity in CD5 surface expression within the circulating tumor mass of CLL patients, which allowed us to delineate two distinct patient groups: those with homogeneous CD5 expression and those with heterogeneous CD5 surface expression, whose leukemic B cells have a greater survival advantage.

Results and discussion

A. The CD5 surface expression heterogeneity shapes CLL B cell transcriptional and functional characteristics.

A.1. Gene expression profiles of CD5^{high} and CD5^{low} patient B cells display differential clustering into specific biological patterns

Given that heterogeneity is a fundamental property of cellular systems and that clonally derived cell populations exhibit variations in gene expression that influence cell fate decisions, we have selected the transcriptomic approach to gain a deeper understanding of the variability of CD5 in CLL B cells from nine patient samples. Following an extracellular flow cytometry approach, CLL B cells were sorted according to their CD5 surface protein expression (Supplementary Figure S1) and RNA-seq was performed on the CD5^{high} and CD5^{low} subpopulations. Figure 1A shows a volcano plot of the RNA-seq data obtained, wherein statistical significance (P-value) is plotted against fold change. The CD5^{high} and CD5^{low} expressed genes show clustering and a common pattern among these subpopulations at the transcriptional level. Of these genes, 61 were found to be significantly differentially expressed with a fold change threshold of 1.5 (43 upregulated, 18 downregulated) between CD5^{high} and CD5^{low} B cells (Supplementary Figure 2).

The differential features were identified by both Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) and Ingenuity Pathway Analysis (IPA) as being consistently present. Interestingly, we identified specific pathways associated with CD5 subtype cells, confirming the quality and relevance of the sorting process (Supplementary Table 1). Of the top 20 significant biological processes identified in CD5^{high} B cells, it was notable that the B CELL RECEPTOR SIGNALING PATHWAY, INTERLEUKIN 10 PRODUCTION and CHEMOKINE PRODUCTION were highlighted (Figure 1B). In the BCR signaling pathway, 64 transcripts were ranked in the CD5^{high} subpopulation compared to CD5^{low} (Supplementary Figure 3, left panel). The heatmap evidences the differential expression of transcripts, for key effectors of the BCR signalosome such as Syk or Btk, (28-32). A total of 62 transcripts were ranked in the CD5^{high} subpopulation compared to CD5^{low} with respect to interleukin 10 production, including the IL10 transcript itself (Supplementary Figure 3, middle panel). This finding is consistent with previous literature, which indicates that CD5 promotes IL10 production through the MAPK and Ca²⁺-dependent pathways (33, 34). The presence of the FOXP1 gene, which is critical for the Treg function (35), in our RNA-seq data is noteworthy. Given that certain CLL B cells express FOXP3 (26), it would be of interest to determine whether FOXP1 is expressed in malignant B cells and whether it interacts with FOXP3 to regulate CTLA4 and CD25 promoters in the CLL context. The chemokine production dataset yielded 43 matching RNAs (Supplementary Figure 3, right panel). It is noteworthy that only CD5⁺ B cells

produce IL10 in response to TLR9 stimulation (36). We found that CLL B cells synthesize greater quantities of IL10 in patients with progressive disease, a process inhibited by ibrutinib treatment (Quinquenel A, unpublished data). Furthermore, IL-23A (IL-23p19) has been shown to interact with CD5L, and there is evidence that FOXP3 expression varies between CD5^{high} and CD5^{low} CLL B cells, indicating that CD5 may modulate this transcription factor in CLL B cells (26).

A causal network analysis was conducted on the 61 differentially expressed genes (Supplementary Figure 2) using the Upstream Regulator Analysis tool in IPA. This identified several upstream regulators, including IFN γ , PRMD1, IRF4, FOXP3 and IL10RA, within the CD5^{high} subpopulation (Supplementary Table 2). Notably, PRMD1 (BLIMP-1) was significantly upregulated, in accordance with the findings for IL10RA and the enriched GSEA term "Interleukin 10 production." Further IPA analysis predicted the impact of these genes on cellular pathways (Supplementary Figure 3B), indicating that IL10 is upregulated through ERK1/2 activation, which is consistent with the role of CD5 in promoting MAPK activation and IL10 production (34).

A.2. CD5^{high} or CD5^{low} patient B cells express different phenotypic patterns.

Given the involvement of CD5 expression levels on CLL B cell's immune and circulating phenotypes (3, 24, 25), we investigated whether CD5 expression levels correlate with other membrane proteins. To this end, a new cohort of patients (n=12) was analyzed by flow cytometry not only for the expression levels of CD5, but also for various surface markers, including those associated with activation and chemokine receptors (Figure 1C, and Supplementary Figures 4 and 5).

The results demonstrated that the neoplastic subclone exhibiting high levels of CD5 also displayed elevated levels of CD19, whereas the subclone with low CD5 expression showed reduced CD19 levels (Figure 1C). This positive relationship between the expression intensities of CD5, a negative regulator of the BCR, and CD19, a positive regulator of the BCR, indicates that the expression dynamics of CD5 (27) may be associated with those of CD19. Activation markers such as CD27 (a memory B cell marker (37)) and CD22 (a mature B cell marker (38)) exhibited higher expression levels in the CD5^{high} subpopulation, whereas CD24 (a B cell differentiation antigen (39)) remained unchanged (Figure 1C and Supplementary Figure 5B). The higher expression of CD5, CD19 and CD27, but not CD24, is a distinctive feature of CLL B cells that secrete elevated levels of IL10 and TGF β 1, which play a key immunoregulatory role (26). In light of the heightened CD22 expression observed in the CD5^{high} subpopulation, it would be infringing to ascertain whether CD22 constitutes part of the CLL Breg immunophenotypic signature and whether it functions as an inhibitory receptor of the BCR (38). It should be mentioned that the GSEA analysis of the BCR signaling pathway revealed differential transcript levels of CD19 and CD22 between CD5^{low} and

CD5^{high} cells. While the two transcripts are decreased, they are highly expressed as cell surface proteins (Supplementary Figure 3 and Figure 1C), indicating a post-translational regulatory mechanism. In addition, leukemic B cells with elevated CD5 levels also express high levels of the IL10 receptor (CD210a) (Figure 1C), indicating that the cells might respond to IL10 via autocrine secretion (Mhibik M, unpublished data) and/or paracrine stimulation, thereby enhancing survival and inhibiting pro-inflammatory cytokine synthesis (40).

CLL B cells express high levels of CXCR4, CXCR5 and CXCR3, which enable them to bind their respective ligands in protective niches (41-44). The cytometric analysis demonstrated no discernible difference in CXCR4 surface expression between the CD5^{high} and CD5^{low} subpopulations. However, an inverse correlation was observed between the MFI of CD5 and CXCR4 in the CD5^{high} subpopulation (Supplementary Figure 5 C and D), which suggests that the CD5^{high} subpopulation may represent a circulating fraction. Indeed, the expression of CD5 and CXCR4 on circulating CLL B cells has been demonstrated to be differential between recently egressed CLL B cells from the lymph nodes, which constitute the proliferative fraction, and older quiescent cells, which are referred to as the resting fraction. The former is characterized by CD5^{high} and CXCR4^{low}, while the latter is characterized by CD5^{low} and CXCR4^{high} (24). The two fractions have been employed in the construction of a model of CLL B cell trafficking from the bloodstream to the lymph nodes, thereby providing an explanation for further cycles of cell proliferation (45). Furthermore, CXCR5 and CXCR3 were markedly elevated in the CD5^{high} subpopulation (Figure 1C). In murine models, CXCR5 is essential to the localization of CLL B cells to the germinal center in the lymph node, which contributes to CLL B cell activation and proliferation (46). The role of CXCR3 remains incompletely understood, except for its involvement in CXCR4-mediated effects during migration and adhesion (43, 47).

Overall, high CD5 expression can positively regulate the majority of observed cell markers. This suggests a potential link between CD5^{high} Breg cells and the proliferative B cell fraction, which may help CLL B cells evade the immune survey. Furthermore, a STRING analysis was conducted, incorporating the aforementioned activation markers and chemokine receptors. The results, displayed in Supplementary Figure 5E, revealed pertinent gene–gene interaction networks, including the regulation of the B cell receptor signaling pathway and B cell activation. This aligns the GSEA analysis on GO Biological Processes (Figure 1B).

A.3. Effect of reversion of CD5 expression on the cytokine secretome in HG3 cell line.

Given the inability to culture-isolated primary CLL B cells for more than a few days, an investigation of the influence of the CD5-expression level on HG3 cells, a CLL B

cell line that is originally divided into two subpopulations (48), was deemed necessary. The majority of cells express the surface markers CD19 and CD5 (CD19⁺/CD5⁺), while a minority expresses only CD19 (CD19⁺/CD5⁻), as shown by our flow cytometry analyses (Figure 1D, left panel). CD5 knockout HG3 cells were generated by CRISPR-Cas9 using sequential electroporation of ribonucleoprotein (RNP1, RNP2 and RNP3) to increase the rate of CD5 gene disruption within the bulk population. The results of flow cytometry analysis revealed that the sequential targeting of the CD5 gene (RNP1, RNP2 and RNP3) resulted in the reversal of the bimodal distribution of CD5 in HG3 cells (Figure 1D, middle panel). The secretory capacity of HG3 cells was then evaluated through an ELISA-type assay. A clustering analysis of the measured levels of several soluble factors demonstrates a reversal from an anti-inflammatory to a pro-inflammatory secretome (Figure 1D, right panel). The alteration in the cytokine profile is consistent with the function of CD5 in Breg cells. Recently, we showed that CLL B cells expressing heterogeneous surface CD5 are associated with immunoregulatory properties. Indeed, our findings indicated that CLL B cells producing IL10 or TGFβ1 exhibited a higher expression of CD5 than IL10 and TGFβ1-negative cells (26). This provides further evidence of the functional importance of CD5 in evading anti-tumor immunity in CLL and highlights the potential of CD5 as a promising therapeutic target on B cells.

B. CD5 surface expression is related to the survival of CLL B cells.

The capacity of CLL B cells to survive is a significant feature of disease progression. We first evaluated the functional impact of CD5 expression in the native HG3 cell line. This was achieved by measuring the metabolic activity of the CD5-sorted negative *versus* CD5-sorted positive subpopulations of parental HG3 cells in response to BCR stimulation. The results demonstrated that the CD5⁻ subpopulation exhibited a markedly enhanced survival advantage as compared to the CD5⁺ subpopulation (Figure 2A). These findings are consistent with the previously reported negative role of CD5 on BCR signaling capacity (8, 10, 11). Moreover, the bimodal inversion of CD5 knock-out in HG3 significantly enhances metabolic activity (RNP3 vs. HG3; Figure 2B). This suggests that the dynamic expression of CD5 is crucial for the metabolic activity of the CLL B cell line, whereby the level of CD5 may impact the cellular response.

Secondly, we determined the influence of the heterogeneity of CD5 membrane expression on the survival of primary CLL-B cells. To this end, an extracellular flow cytometry approach was employed to evaluate CD5 and CD19 expression profiles in a cohort of 20 patients. Based on the scatter plot showing the dispersion of the surface expression of CD5, the results revealed the existence of two patient groups characterized by homogeneous (n=10) or heterogeneous (n=10) CD5 profiles (Supplementary Figures S6, S1 and S4). Although not statistically significant

($p=0.0649$), the mean of CD5 expression (MFI) tended to be lower in the heterogeneous patient group compared to the homogeneous group (Figure 2C). This suggests that among the tumor B cell populations, the CD5^{low} tumor B-cell subpopulation is indeed present, albeit at a low frequency, as previously described (27). The metabolic activity of leukemic B cells upon BCR stimulation revealed a significant difference in cell survival between the two groups. The heterogeneous group exhibited a more significant survival advantage. These results indicate that a greater heterogeneity of CD5 membrane expression gives a BCR-dependent survival advantage for tumor B cells (Figure 2D).

As has been previously demonstrated, there is a correlation between BCR-dependent cell survival and overall survival in CLL patients (18). Consequently, an investigation was conducted to ascertain the relationship between the CLL B cell CD5 profiles (see Supplementary Figures S1, S4, and S6) and the patient's disease stage. For this purpose, the two CD5 groups of patients (homogeneous and heterogeneous) were classified as either stable or progressive, with the progressive disease being clinically established at the beginning of the patient treatment (Supplementary Table 3). Of the 41 patients, 18 exhibit a homogeneous CD5 profile, while 23 demonstrate a heterogeneous profile. The age distribution among both groups is comparable, with a mean age of 60 and 63 for the CD5 homogeneous and heterogeneous groups, respectively, ranging from 44 to 73 and 41 to 75. This indicates that age is not a confounding variable and that both groups are comparable. Our findings indicate that patients with a homogeneous CD5 profile exhibit a higher proclivity to express a stable form of CLL than those in the group with a heterogeneous CD5 profile (61.1 % vs 38.8 %). In contrast, a smaller proportion of patients with homogeneous CD5 profiles develop progressive disease than those with heterogeneous CD5 profiles (36.9 % vs 63.2 %, Table 1A). No significant association was found between CD5 profiles and disease stage or other clinical variables, including age and sex, or prognostic factors such as CD38 and IGHV mutation status (Table 1B). These findings suggest a potential link between a heterogeneous CD5 profile and CLL progression, although further verification on a larger sample size is necessary.

Conclusion and perspectives

The present study demonstrates that the heterogeneity in CD5 surface expression in CLL B cells impacts their transcriptomic and functional profiles. CD5^{high} and CD5^{low} CLL B cells display disparate gene expression profiles, with differentially expressed genes influencing critical pathways such as B cell receptor signaling, interleukin 10 production, and chemokine production. The association between elevated CD5 surface expression and the enhanced expression of survival and activation markers indicates a potential involvement in immune-surveillance evasion and disease progression. The modulation of the immune microenvironment,

particularly through IL10, highlights the importance of CD5 in CLL pathophysiology. Therapeutically, targeting CD5 on B cells may disrupt these survival mechanisms, offering the potential for improved CLL treatments. Further research into the CD5-associated pathways could elucidate additional therapeutic targets and improve our understanding of CLL B cell survival strategies.

Material and Methods

Cohorts of CLL patients: The study was developed based on blood samples obtained during the clinical follow-up of CLL patients presenting at different stages of the disease, which were collected at the Hôpital Avicenne, Bobigny, France. The analysis of the blood samples was conducted following the relevant national legislation after approval of the local ethics committee (CLEA) and in alignment with the ethical guidelines outlined in the Declaration of Helsinki for the protection of human subjects participating in biomedical research. Consequently, all patients enrolled in the study were informed by their referring oncologist that biological samples collected as part of standard clinical practice could be used for research purposes, and they provided their informed consent. CLL diagnosis was confirmed under international guidelines.

Isolation and culture of CLL cells: Peripheral blood samples were obtained from patients who met the diagnostic and immunophenotypic criteria for B-CLL at the Service d'Hématologie Biologique, AP-HP Hôpital Avicenne, Bobigny, France. B cells were isolated by negative selection (Miltenyi Biotech) following the manufacturer's instructions. Furthermore, the samples were analyzed either fresh or after being thawed from liquid nitrogen storage in fetal bovine serum (FBS, PAA) at a concentration of 10% DMSO (Sigma). The CLL B-cell line HG-3 was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). CLL cells were cultured either fresh or after thawing in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine in a humid atmosphere at 37°C and 5% CO₂ to maintain optimal conditions for cell growth.

Flow Cytometry Analysis of CLL B cell samples: The antibodies utilized in the present study are detailed in **Supplementary Table 4**. Prior to analysis, B cells were incubated with Live/Dead dye (1:100, BD Horizon™ Fixable Viability Stain 440 UV dye, BD Biosciences, #566332) or (1:1000 BD Horizon™ Fixable Viability Stain 510 dye, BD Biosciences, #564406) for 10 min at room temperature (RT) to exclude non-viable cells. Following a rapid wash with PBS, the cell suspension was incubated for 20 min at 4°C with an antibody mixture specific for surface antigens (as detailed below). Subsequently, the stained cells were washed and acquired on the Symphony™ A3 SORP analyzer (BD), driven by the BD FACSDIVA™ software, and the data were compiled with the FlowJo™ software (BD Biosciences). For flow cytometry analysis, cells were initially gated based on their size (FSC-A) and granularity (SSC-A). Subsequently, the Live/Dead negative fraction was analyzed and defined as B CLL cells (CD3⁻CD19⁺CD5⁺). A minimum of 5×10⁵ events were recorded for each sample for all cytometric analyses. Compensations were

performed using a single staining of anti-human IgG and a negative control bead set with each antibody.

Cell sorting and sample preparation for RNA-seq: Following the exclusion of doublets, B cells from 9 patients (5 homogeneous and 4 heterogeneous) were analyzed on the live/dead negative fraction and defined as CLL B cells (CD3-CD19+CD5+). The cells were then sorted into two distinct subpopulations, designed as CD5^{high} and CD5^{low}, based on their CD5 expression levels, using a FACS ARIA III cell sorter (BD). The number of cells collected per fraction ranged from three to ten million cells, with each fraction stored at -80°C in 1 mL TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, 15596026). Following RNA extraction, the integrity and quality of the RNAs were assessed using the Agilent RNA 6000 Nano Kit or RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies) at the GENOM'IC platform of the Institut Cochin. Subsequently, cDNA libraries were prepared for sequencing. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software and Ingenuity Pathway Analysis, IPA (QIAGEN) were employed to ascertain the enrichment score in the CD5^{high} and CD5^{low} fractions.

Generation of HG3 KO CD5: Successive electroporations were conducted over time to enhance the efficiency of CRISPR-Cas9. Two million cells were transfected with Cas9 protein (IDT DNA Technologies, #1081059) and premixed Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA (#1072534), and Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA targeting CD5 (listed in Supplementary Table 5) in Nucleofector Solution SF (Lonza) in a final volume of 80 µL. The cells were transfected using the Amaxa® Nucleofector® II device (Lonza) with the W-003 program. After a 48-hour incubation period at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂, the viability was assessed and found to be up to 70%. The different bulk populations resulting from each electroporation were harvested and cultured.

Metabolic activity assay: Two hundred and fifty thousand HG3 cells or two million CLL cells (PBMC) were cultured for 24 and 72 hours, respectively, in 24-well plates coated or not with rabbit anti-IgM antibody (20 µg/well; Jackson ImmunoResearch Laboratories). The metabolic activity was determined using the CellTiter 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), following the methodology outlined by the manufacturer. The metabolic fold increase ([percentage of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5 -(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], inner salt [MTS]) was determined as follows: [(absorbance stimulated t= 24 hours) – (absorbance unstimulated t= 24 hours)]/(absorbance unstimulated t= 24 hours) x100. In the case of patients, MTS values exceeding 25% and falling below 25% delineated the responder and non-responder CLL groups, respectively (16) (18).

Quantification of cytokine secretion: Following each MTS assay, the supernatants from HG3 cells were collected and stored at -80°C. The concentrations of a panel of cytokines (IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, TNF α , IFN γ , MIP-1 β and MCSF) were determined by V-Plex assays (MSD) in accordance with the manufacturer's instructions on the MESO QuickPlex SQ 120 (MSD) using the Methodical Mind and Workbench software (MSD).

Statistical Analyses: The data are expressed as mean $\pm$ SEM, Mann-Whitney U test or Wilcoxon signed-rank test (paired data) were used for comparison. For nominal data (expressed as counts and percentages), χ^2 or Fisher's Exact Test was performed as appropriate. All tests were two-tailed at a significance level of 0.05, and the variance was similar between the groups compared. The analyses were performed using R statistical software version 3.1.2, SPSS version 29, and Graphpad (Prism 7).

Figures and table legends

Figure 1: Transcriptomic and functional features of heterogeneity in CD5 surface expression in CLL B cells.

A) Volcano plot. The log₂ fold change (FC) represents the mean expression level for each gene. Each data point represents the expression level of a single gene. **B)** The 20 most significant gene sets derived from the Gene Ontology Biological Processes, ordered by Normalized Enrichment Score (NES) from CD5^{high} isolated patient B cells *versus* CD5^{low} isolated patient B cells (n=9). The gene sets significantly enriched among mRNAs with positive and negative correlations were selected based on the GSEA nominal p-value (NOM pval < 0.05). **C)** The graphs illustrate the mean fluorescence intensity (MFI) of CD5, CD19, activation markers (CD27 and CD22), IL10RA and chemokine receptors (CXCR5 and CXCR3) in the CD5^{high} and CD5^{low} subpopulations (n=12). **D)** A representative cytometric dot plot (CD5 vs CD19) (Top) and its respective histogram (bottom) of native HG3 cells are presented (left). The overlay histograms of the bimodal CD5 MFI depict the successive HG3 knock-out cell bulks (RNP1, RNP2, RNP3) (middle). The right-hand side of the panel shows the clustering of the quantified soluble factors in the supernatants of native and sequential CD5 knockout HG3 cells (n=4).

Figure 2: CD5 surface expression plays a role in the survival of CLL B cells.

A) The parental HG3 cells were sorted based on their CD5 expression, counted, and then stimulated or not with coated anti-IgM for 24 hours. The graph illustrates the percentage of metabolic activity (% MTS) of the two subpopulations, one that does not express CD5 (CD5-) and the other that expresses CD5 (CD5+) (n=11). **B)** The parental HG3 cells and the three sequential CD5 knockouts (RNP1, RNP2 and RNP3) cells were enumerated and subsequently stimulated with coated anti-IgM for 24 hours. An MTS assay was conducted, and the resulting data are presented in a graphic format, with a sample size of 5 (n=5). **C)** The profiles of primary CLL B cells (see Supplementary Figures 4 and 6) were classified as homogeneous (n=13) or heterogeneous (n=19) based on the CD5 expression levels, which were measured by flow cytometry. The graph depicts the median fluorescence intensities (MFI) of CD5 in both CLL groups. **D)** The figure depicts the BCR-dependent metabolic activity of the PBMC samples, which were derived from the same blood samples that were used for the purified CLL B cells used in panel C and were classified as homogeneous (n=13) or heterogeneous (n=19).

Table 1: Association of CD5 profile with CLL progression (A) and clinical characteristics of the patient cohort (B).

Supplementary Figure 1: Gating strategy for the identification of CD5^{high} and CD5^{low} cells in a cohort of CLL patients employed for transcriptomic analysis.

CLL B cells were labeled and analyzed by flow cytometry, allowing the identification of the CD5^{high} and CD5^{low} subpopulations in each sample (UPNs are indicated below the dot plot). Based on the gating strategy, cells were sorted and analyzed using a transcriptomic approach. It should be noted that samples were colored blue when they were part of the homogeneous group and red when they were part of the heterogeneous group (n=9).

Supplementary Figure 2: Graphical representation of the transcriptome analysis.

Heatmap of the hierarchical clustering of the 61 differentially expressed genes ranked by GSEA between CD5^{high} and CD5^{low} B cells (43 upregulated genes in red and 18 downregulated genes in blue in CD5^{high} B cells). Expression values are represented as shown in the color caption.

Supplementary Figure 3: GSEA and IPA analyses of the differentially expressed RNA between CD5^{high} and CD5^{low} B cells.

A) Enrichment plots for datasets enriched in the GSEA Gene Ontology Biological Processes analysis, displaying the profile of the running ES Score and the positions of the gene set members on the ranked list. The expression values of CD5^{high} isolated patient B cells (left) versus CD5^{low} isolated patient B cells (right) (n=9) are represented as colors and range from red (high expression), pink (moderate expression), light blue (low expression) to dark blue (lowest expression). **B)** The differentially expressed genes from GSEA (see Supplementary Figure 2) were subjected to a predictive relationship map analysis using Ingenuity Pathway Analysis (IPA), which yielded a set of predictive networks. One of these networks is shown here, with the genes from the GSEA analysis indicated with a superscript number 1. The legend is indicated on the left-hand side.

Supplementary Figure 4: Gating strategy employed for the measurement of cell surface markers in CLL B cell CD5^{high} and CD5^{low} subpopulations.

CLL B cells were labeled for CD5, CD19 and other membrane markers and analyzed by flow cytometry. This enabled the identification of the CD5^{high} and CD5^{low} subpopulations in each sample (UPNs are indicated below the dot plot) and the quantification of activation and survival receptors. It should be noted that samples were colored blue when they were part of the homogeneous group and red when they were part of the heterogeneous group (n=12).

Supplementary Figure 5: Expression of various activation markers and receptors in the CD5^{high} and CD5^{low} subpopulations.

A) A representative cytometric dot plot (CD5 vs CD19) is presented, which illustrates the gating strategy employed to distinguish the CD5^{high} (blue gate) and CD5^{low} (violet gate) subpopulations in a CLL B sample. A total of 12 patients were included in this portion of the study, as illustrated in Supplementary Figure 5. The graphs in panels **B** and **C** illustrate the mean of fluorescence intensity (MFI) of the membrane marker CD24 (**B**) and the chemokine receptor CXCR4 (**C**) in the CD5^{high} and CD5^{low} subpopulations (n=12). **D)** A graphical representation of the correlation between CXCR4 MFI and CD5 MFI in the CD5^{high} subpopulation; no correlation was found in the CD5^{low} subpopulation (data not shown). **E)** The String protein-protein interaction network, constructed from the flow cytometry-studied cell surface markers was used to investigate the functional association networks (see Figure 1C). Colored lines between the proteins indicate the various types of interaction evidence and the colored circles illustrate the functional enrichment, KEGG pathways and Reactome pathways in this network (legend on left-hand side).

Supplementary Figure 6: Flow cytometry and determination of the homogeneous and heterogeneous CLL B cell cases.

The cytometric dot plots (CD5 vs CD19) of the various CLL samples are presented (UPNs are indicated below the dot plot). Based on the heterogeneity of the CD5 labeling, the samples are colored blue when they are part of the homogeneous group and red when they are part of the heterogeneous group (n=20).

Supplementary Table 1: Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of the obtained transcriptomic data.

Extraction of gene set enrichment analysis ordered by Normalized Enrichment Score (NES) from CD5^{high} isolated patient B cells *versus* CD5^{low} isolated patient B cells (n=9). The Gene sets significantly enriched among the positively and negatively correlating mRNAs were selected based on the GSEA Nominal p-value (NOM pval < 0.05). The Size column indicates the number of genes in each gene set. The NES column shows the Normalized Enrichment Score. The NOM p-val column displays the NOMinal p-value. Finally, the FDR q-val column shows the False Discovery Rate.

Supplementary Table 2: Predicted upstream regulators of the transcriptomic data.

The IPA Upstream Regulator Analysis identifies the upstream regulators that may be responsible for the observed differential gene expression changes in the experimental dataset from the GSEA analysis. The column designated “Upstream regulator” indicates the name of the gene. The “Molecular type” column describes the function of the gene-encoded protein. The “activation z-score” column indicates the predicted value of the activity of the upstream regulator’s gene

(positive z-score: activation of the dataset; negative z-score: inhibition of the dataset). The P-value column results from the right-tailed Fisher's Exact Test p-value calculation. The "Target molecule" column lists the genes differentially expressed between CD5^{high} isolated patient B cells *versus* CD5^{low} isolated patient B cells from the GSEA analysis.

Supplementary Table 3: Patients' biological and clinical parameters.

Supplementary Table 4: List of the primary antibodies used for multicolor flow cytometry and cell sorting approaches.

Supplementary Table 5: List of the two Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA (IDT DNA Technologies) used for sequential CRISPR/Cas9 targeting of CD5.

Acknowledgements:

The present study was made possible thanks to the support of the INSERM and the USPN. FK was the subsequent recipient of MRT and LabEX Inflammex funding. We would like to express our gratitude to the GENOM'IC core facility (Institut Cochin) for their valuable advice on CLL B-cell RNA-seq, particularly Drs. Franck Letourneur and Juliette Hamroune. We are also indebted to the TisCel13 and MAP facilities (UFR-SMBH, USPN). We would like to thank Ms Marie Ducroux and Helene Jin for their assistance in the quantification of soluble factors and Pr. Fanny Baran-Marszak, Dr. Gregory Lazarian and Ms Malika Gantier for collecting and sharing the patients' clinical-biological data.

Authorship Contributions:

KF, OA, LCS, DE and AL performed the experiments and analyzed the data; LM and IC provided expertise in CRISPR/Cas9 technology, GSEA and IPA; CF and LV provided patients' samples; and LM, IC, VBN, LD and LRC designed the experiments, interpreted the data and wrote the manuscript.

Financial supports: **INSERM, USPN, LabEX Inflammex n°ANR11 IDEX00502.**

Disclosure and Conflicts of Interests: **There are no conflicts of interest to declare by any authors.**

References:

1. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2015;90(5):446-60.
2. Friman V, Winqvist O, Blimark C, Langerbeins P, Chapel H, Dhalla F. Secondary immunodeficiency in lymphoproliferative malignancies. *Hematol Oncol*. 2016;34(3):121-32.
3. Bikah G, Lynd FM, Aruffo AA, Ledbetter JA, Bondada S. A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *Int Immunol*. 1998;10(8):1185-96.
4. Starostka D, Kriegova E, Kudelka M, Mikula P, Zehnalova S, Radvansky M, et al. Quantitative assessment of informative immunophenotypic markers increases the diagnostic value of immunophenotyping in mature CD5-positive B-cell neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(4):576-87.
5. Friedman DR, Guadalupe E, Volkheimer A, Moore JO, Weinberg JB. Clinical outcomes in chronic lymphocytic leukaemia associated with expression of CD5, a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Br J Haematol*. 2018;183(5):747-54.
6. Jaseb K, Purrahan D, Shahrabi S, Ghanavat M, Rezaeean H, Saki N. Prognostic significance of aberrant CD5 expression in B-cell leukemia. *Oncol Rev*. 2019;13(1):400.
7. Crisci T, Falanga AP, Casalino M, Borbone N, Terracciano M, Chianese G, et al. Bioconjugation of a PNA Probe to Zinc Oxide Nanowires for Label-Free Sensing. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(2).
8. Gary-Gouy H, Bruhns P, Schmitt C, Dalloul A, Daeron M, Bismuth G. The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling. *J Biol Chem*. 2000;275(1):548-56.
9. Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood*. 2002;100(13):4537-43.
10. Pers JO, Berthou C, Porakishvili N, Burdjanadze M, Le Calvez G, Abgrall JF, et al. CD5-induced apoptosis of B cells in some patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;16(1):44-52.
11. Gary-Gouy H, Sainz-Perez A, Marteau JB, Marfaing-Koka A, Delic J, Merle-Beral H, et al. Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. *J Immunol*. 2007;179(7):4335-44.
12. Loisel S, André PA, Golay J, Buchegger F, Kadouche J, Cérutti M, et al. Antitumour effects of single or combined monoclonal antibodies directed against membrane antigens expressed by human B cells leukaemia. *Mol Cancer*. 2011;10:42.

13. Klitgaard JL, Koefoed K, Geisler C, Gadeberg OV, Frank DA, Petersen J, et al. Combination of two anti-CD5 monoclonal antibodies synergistically induces complement-dependent cytotoxicity of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2013;163(2):182-93.
14. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;352(8):804-15.
15. Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(11):684-701.
16. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res.* 2006;66(14):7158-66.
17. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, Baran-Marszak F, et al. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res.* 2009;69(16):6387-95.
18. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;120(2):356-65.
19. Herndon TM, Chen SS, Saba NS, Valdez J, Emson C, Gatmaitan 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.
20. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;117(2):563-74.
21. 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.
22. Burger JA. Disrupting the food chain in B cell lymphomas: co-operation between CXCR4 antagonists and antibodies. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(1):3-4.
23. Saint-Georges S, Quettier M, Bouyaba M, Le Coquil S, Lauriente V, Guittat L, et al. Protein kinase D-dependent CXCR4 down-regulation upon BCR triggering is linked to lymphadenopathy in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget.* 2016;7(27):41031-46.
24. Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan XJ, Yancopoulos S, Hayes G, et al. Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med.* 2011;17(11-12):1374-82.
25. Kriston C, Plander M, Márk Á, Sebestyén A, Bugyik E, Matolcsy A, et al. In contrast to high CD49d, low CXCR4 expression indicates the dependency of

chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells on the microenvironment. *Ann Hematol.* 2018;97(11):2145-52.

26. Mékinian A, Quinquenel A, Belkacem KA, Kanoun F, Dondi E, Franck E, et al. Immuno-regulatory malignant B cells contribute to Chronic Lymphocytic Leukemia progression. *Cancer Gene Ther.* 2023;30(7):1018-28.

27. Bashford-Rogers RJ, Palser AL, Hodgkinson C, Baxter J, Follows GA, Vassiliou GS, et al. Dynamic variation of CD5 surface expression levels within individual chronic lymphocytic leukemia clones. *Exp Hematol.* 2017;46:31-7.e10.

28. Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, Maurer U, Tartare-Deckert S, Raynaud SD, et al. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene.* 2009;28(37):3261-73.

29. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, Pfeifer D, Bartholome K, Burger M, et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 2009;69(13):5424-32.

30. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;120(2):356-65.

31. Efremov DG, Turkalj S, Laurenti L. Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies. *Cancers (Basel).* 2020;12(6).

32. Naeem A, Utro F, Wang Q, Cha J, Vihinen M, Martindale S, et al. Pirtobrutinib targets BTK C481S in ibrutinib-resistant CLL but second-site BTK mutations lead to resistance. *Blood Adv.* 2023;7(9):1929-43.

33. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, et al. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol.* 2011;186(8):4835-44.

34. Garaud S, Zayakin P, Buisseret L, Rulle U, Silina K, de Wind A, et al. Antigen Specificity and Clinical Significance of IgG and IgA Autoantibodies Produced. *Front Immunol.* 2018;9:2660.

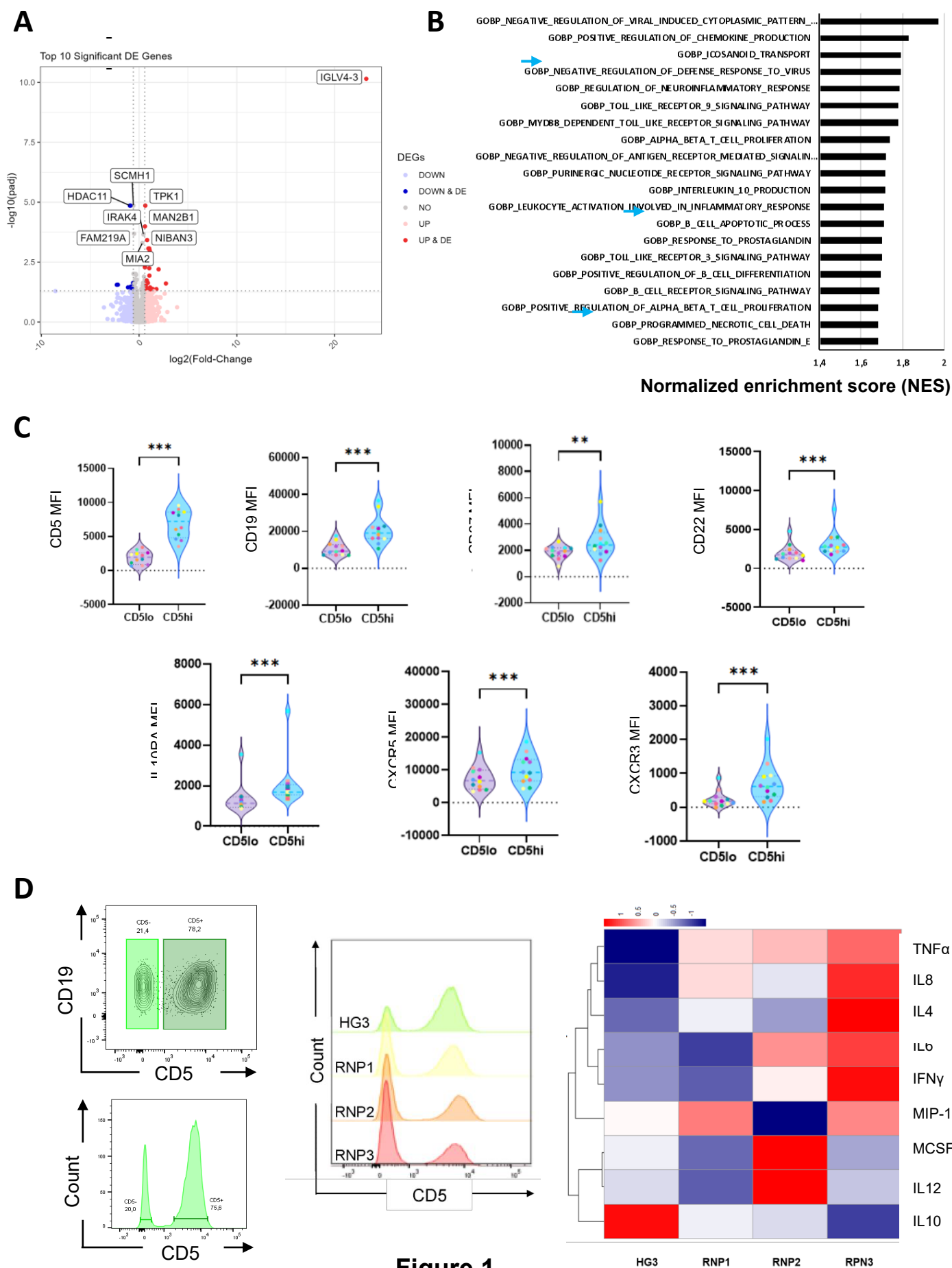
35. Konopacki C, Pritykin Y, Rubtsov Y, Leslie CS, Rudensky AY. Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function. *Nat Immunol.* 2019;20(2):232-42.

36. Sun CM, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity.* 2005;22(4):467-77.

37. Grimsholm O. CD27 on human memory B cells-more than just a surface marker. *Clin Exp Immunol.* 2023;213(2):164-72.

38. Clark EA, Giltiay NV. CD22: A Regulator of Innate and Adaptive B Cell Responses and Autoimmunity. *Front Immunol.* 2018;9:2235.

39. Wang H, Shi P, Shi X, Lv Y, Xie H, Zhao H. Surprising magic of CD24 beyond cancer. *Front Immunol.* 2023;14:1334922.
40. Matesanz-Isabel J, Sintès J, Llinàs L, de Salort J, Lázaro A, Engel P. New B-cell CD molecules. *Immunol Lett.* 2011;134(2):104-12.
41. Burger JA, Montserrat E. Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood.* 2013;121(9):1501-9.
42. Manukyan G, Papajik T, Mikulkova Z, Urbanova R, Kraiczova VS, Savara J, et al. High CXCR3 on Leukemic Cells Distinguishes. *J Immunol Res.* 2020;2020:7084268.
43. Ganghammer S, Gutjahr J, Hutterer E, Krenn PW, Pucher S, Zelle-Rieser C, et al. Combined CXCR3/CXCR4 measurements are of high prognostic value in chronic lymphocytic leukemia due to negative co-operativity of the receptors. *Haematologica.* 2016;101(3):e99-102.
44. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007;110(9):3316-25.
45. Pozzo F, Forestieri G, Vit F, Ianna G, Tissino E, Bittolo T, et al. Early reappearance of intraclonal proliferative subpopulations in ibrutinib-resistant chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2024;38(8):1712-21.
46. Heinig K, Gatjen M, Grau M, Stache V, Anagnostopoulos I, Gerlach K, et al. Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer Discov.* 2014;4(12):1448-65.
47. Bartholdy BA, Wang X, Yan XJ, Pascual M, Fan M, Barrientos J, et al. CLL intraclonal fractions exhibit established and recently acquired patterns of DNA methylation. *Blood Adv.* 2020;4(5):893-905.
48. Rosén A, Bergh AC, Gogok P, Evaldsson C, Myhrinder AL, Hellqvist E, et al. Lymphoblastoid cell line with B1 cell characteristics established from a chronic lymphocytic leukemia clone by in vitro EBV infection. *Oncoimmunology.* 2012;1(1):18-27.



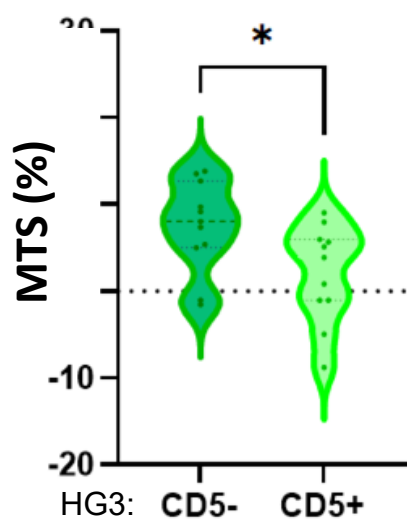
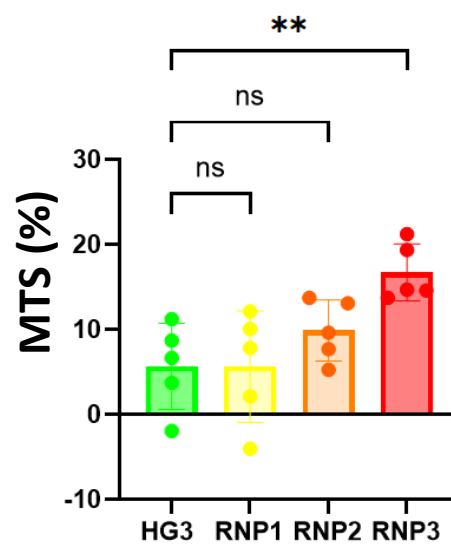
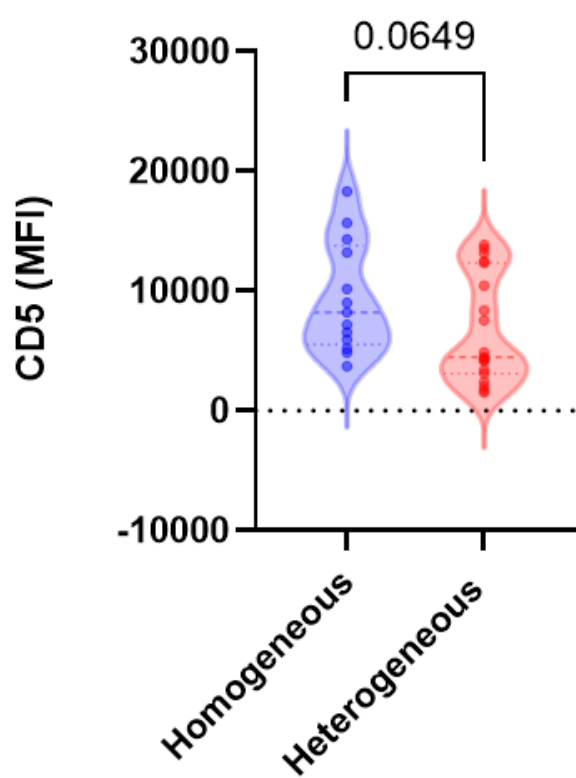
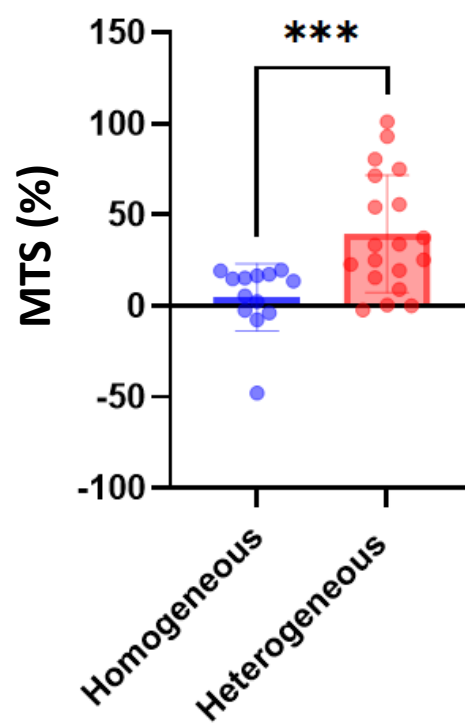
A**B****C****D****Figure 2**

Table 1: Association of CD5 profile with CLL progression (A) and clinical characteristics of the patient cohort (B).

A)

	Stable disease N (%)	Progressive disease N (%)	Total	p-value
CD5 homogeneous	11 (61.1)	7 (36.9)	18	0.140
CD5 heterogeneous	7 (38.8)	12 (63.2)	19	

4 ND values for CLL progression in the CD5 heterogeneous group.

p-values were obtained using the χ^2 test. Test excludes missing values.

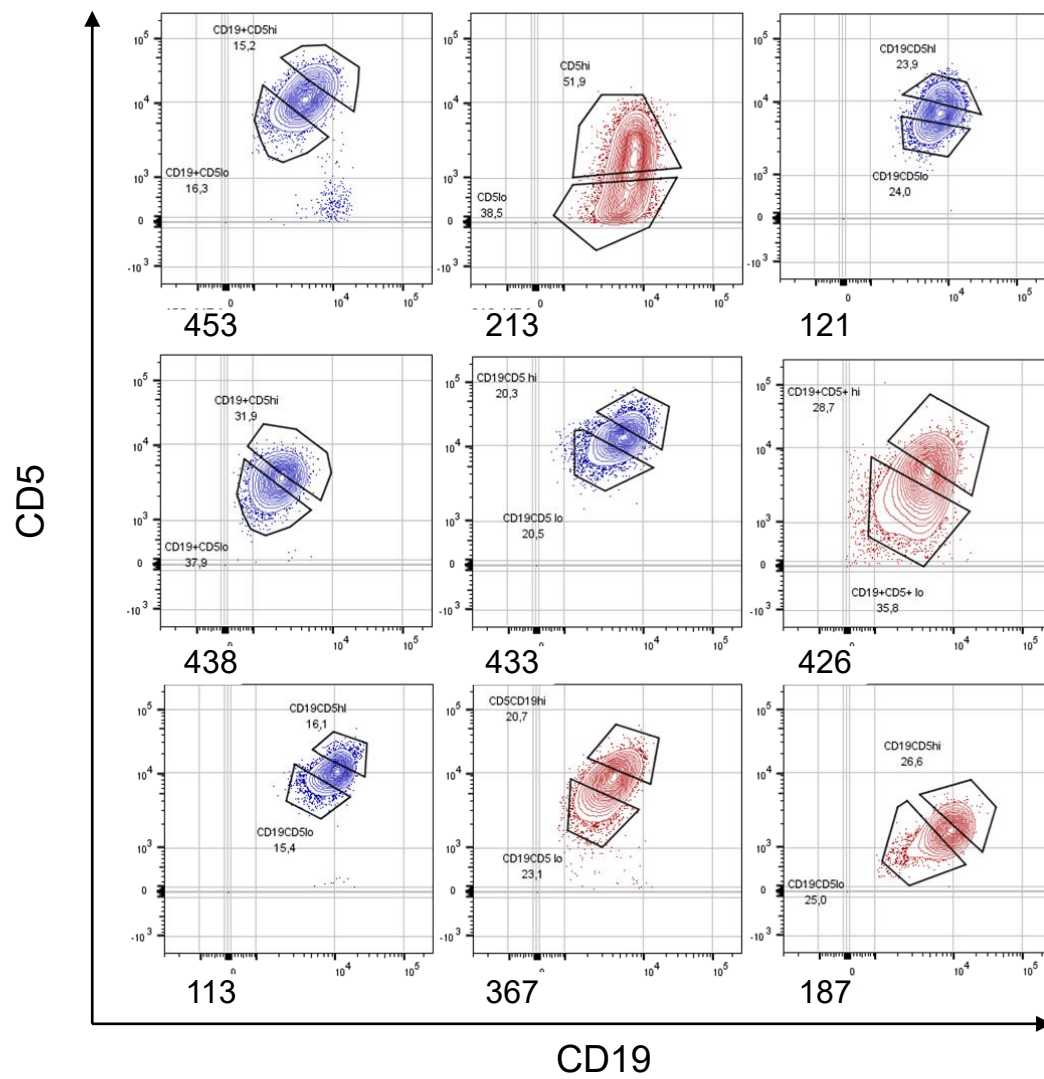
B)

		Stable disease N (%)	Progressive Disease N (%)	p-value
CD5 homogeneous	Sex			0.147
	<i>Female</i>	7 (87.5)	2 (28.6)	
	<i>Male</i>	4 (40)	5 (41.7)	
	CD38			0.308
	<i>Negative</i>	9 (64.3)	5 (41.7)	
	<i>Positive</i>	2 (50)	0 (0)	
	IGHV Status			0.876
	<i>UM</i>	2 (25)	2 (28.6)	

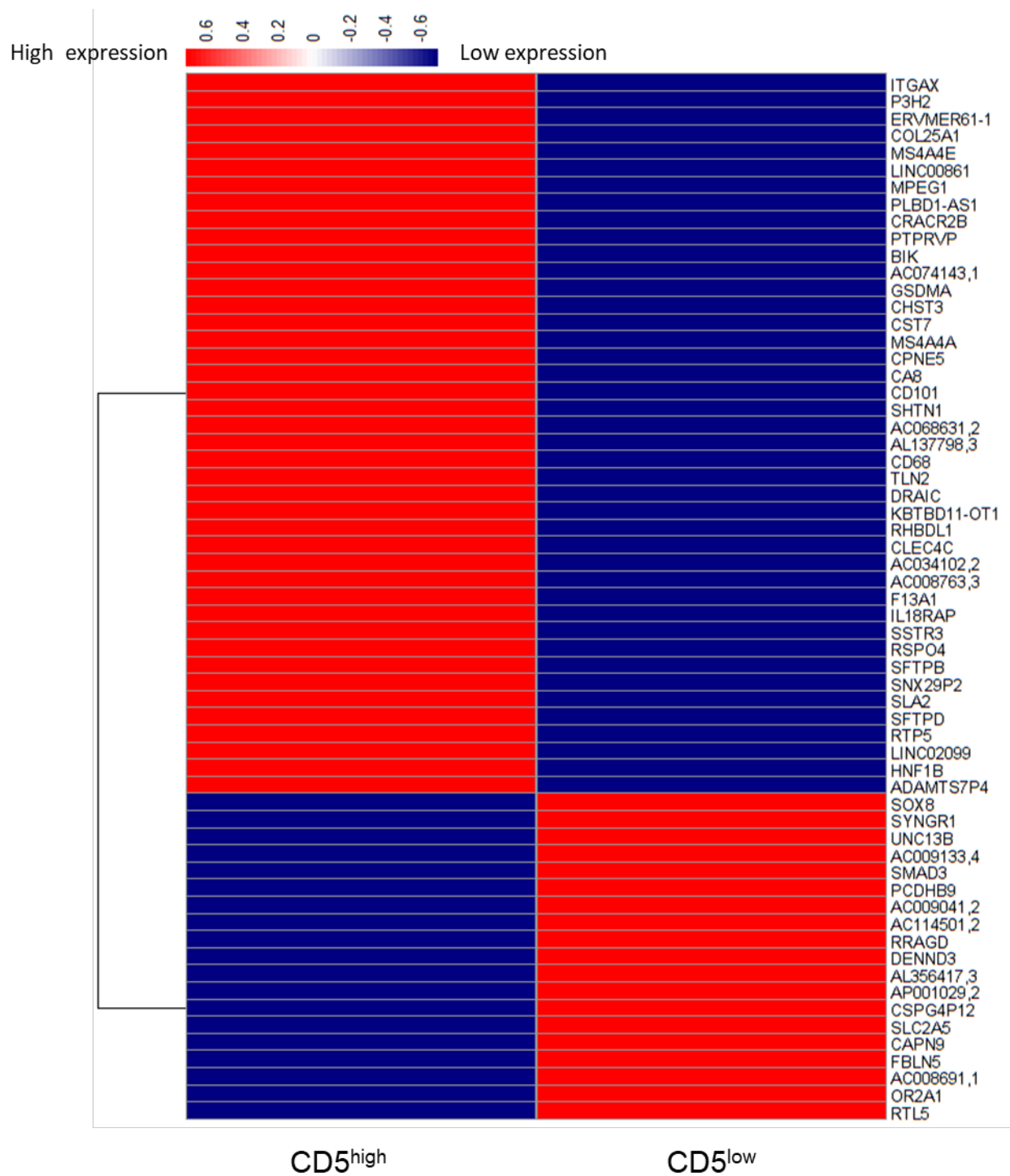
	<i>M</i>	6 (75)	5 (73.3)	
CD5 heterogeneous	Sex			
	<i>Female</i>	1 (12.5)	5 (71.4)	0.216
	<i>Male</i>	6 (60)	7 (58)	
	CD38			
	<i>Negative</i>	5 (25.7)	7 (58.3)	0.949
	<i>Positive</i>	2 (50)	3 (100)	
	IGHV Status			
	<i>UM</i>	1 (14.3)	4 (36.4)	0.308
	<i>M</i>	6 (85.7)	7 (63.6)	

UM: unmutated IGHV status, M: mutated IGHV status.

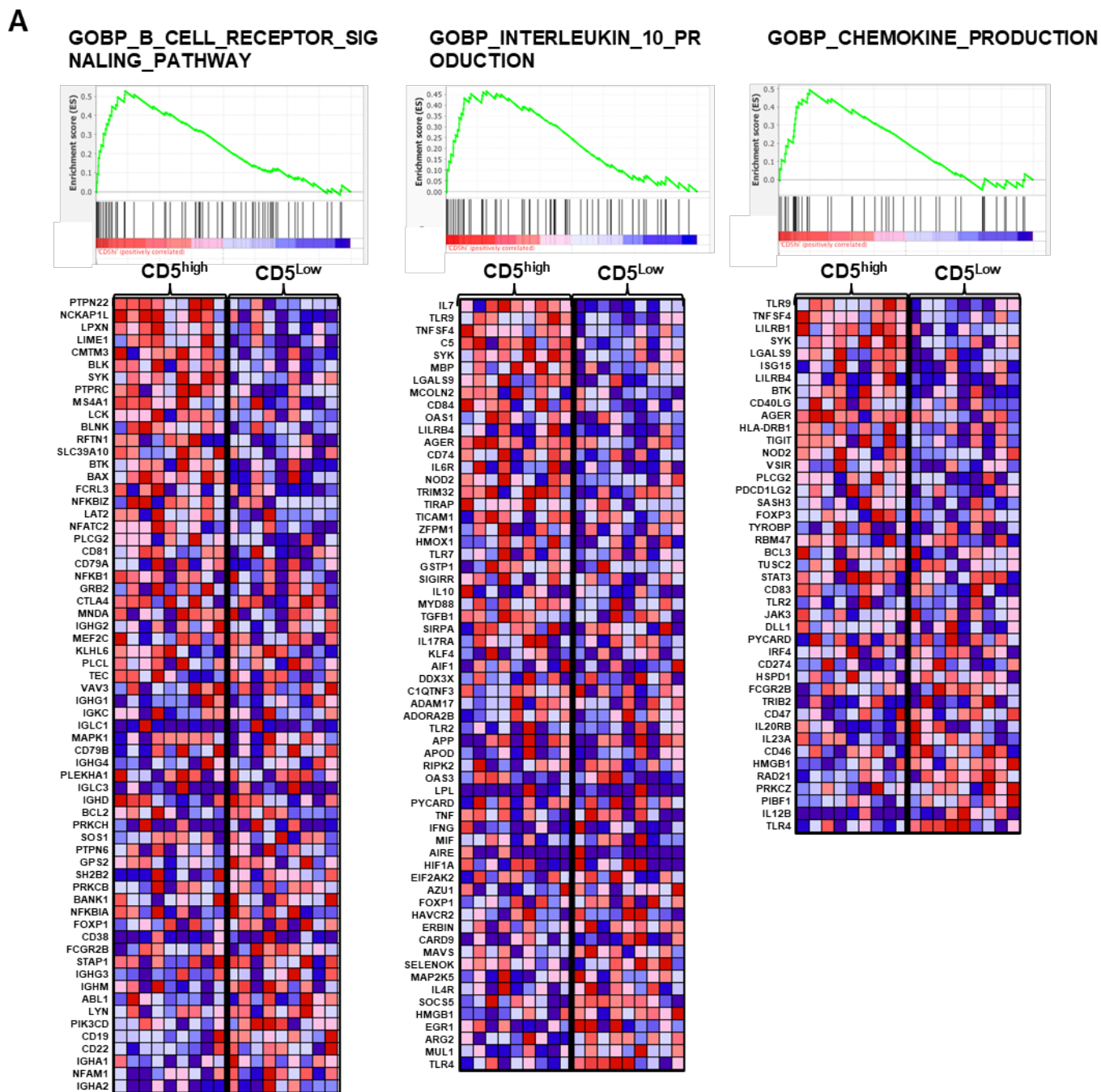
p-values were obtained using the χ^2 or Fisher's Exact Test, as appropriate. Test excludes missing values.



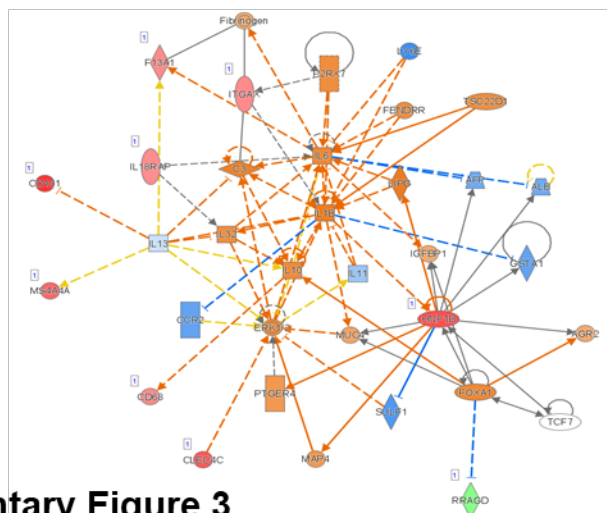
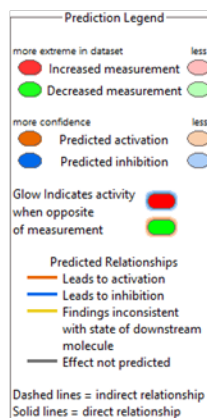
Supplementary Figure 1



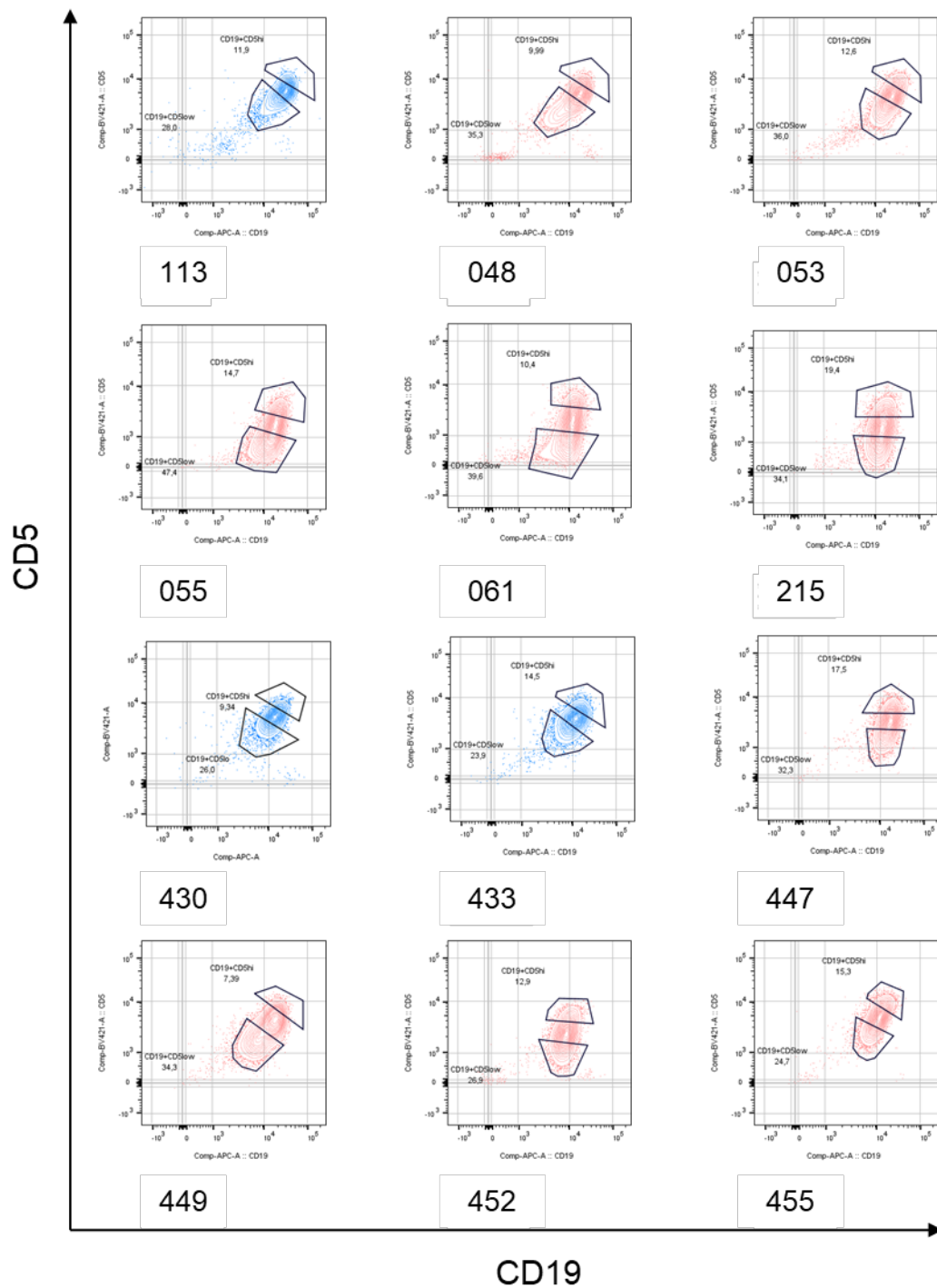
Supplementary Figure 2



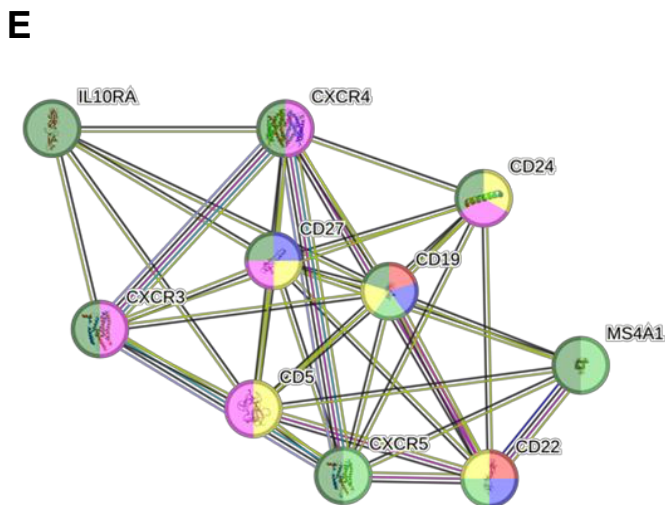
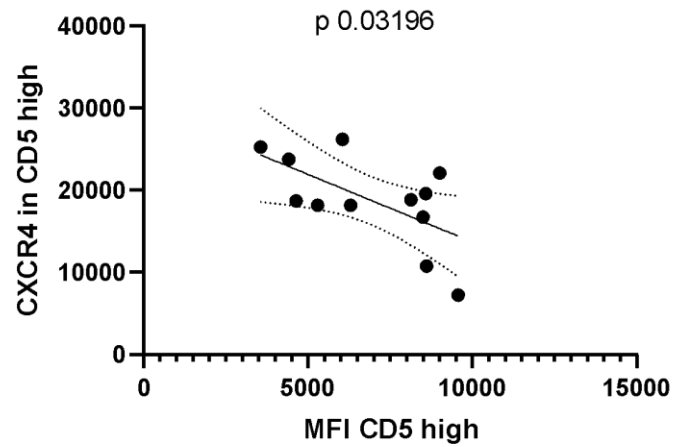
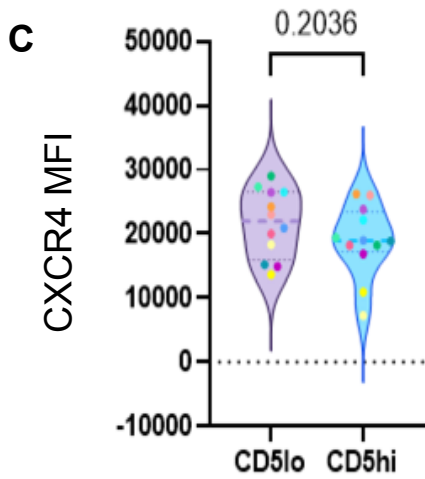
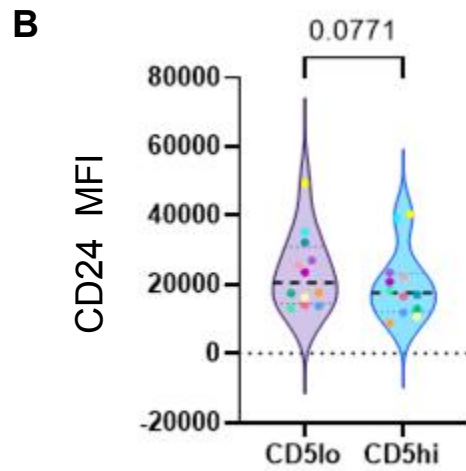
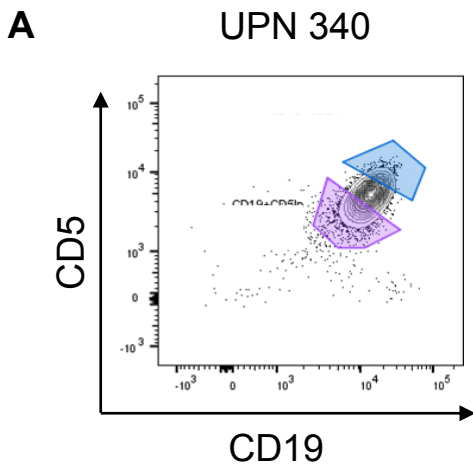
B



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Regulation of B cell receptor signaling pathway

Regulation of B cell activation

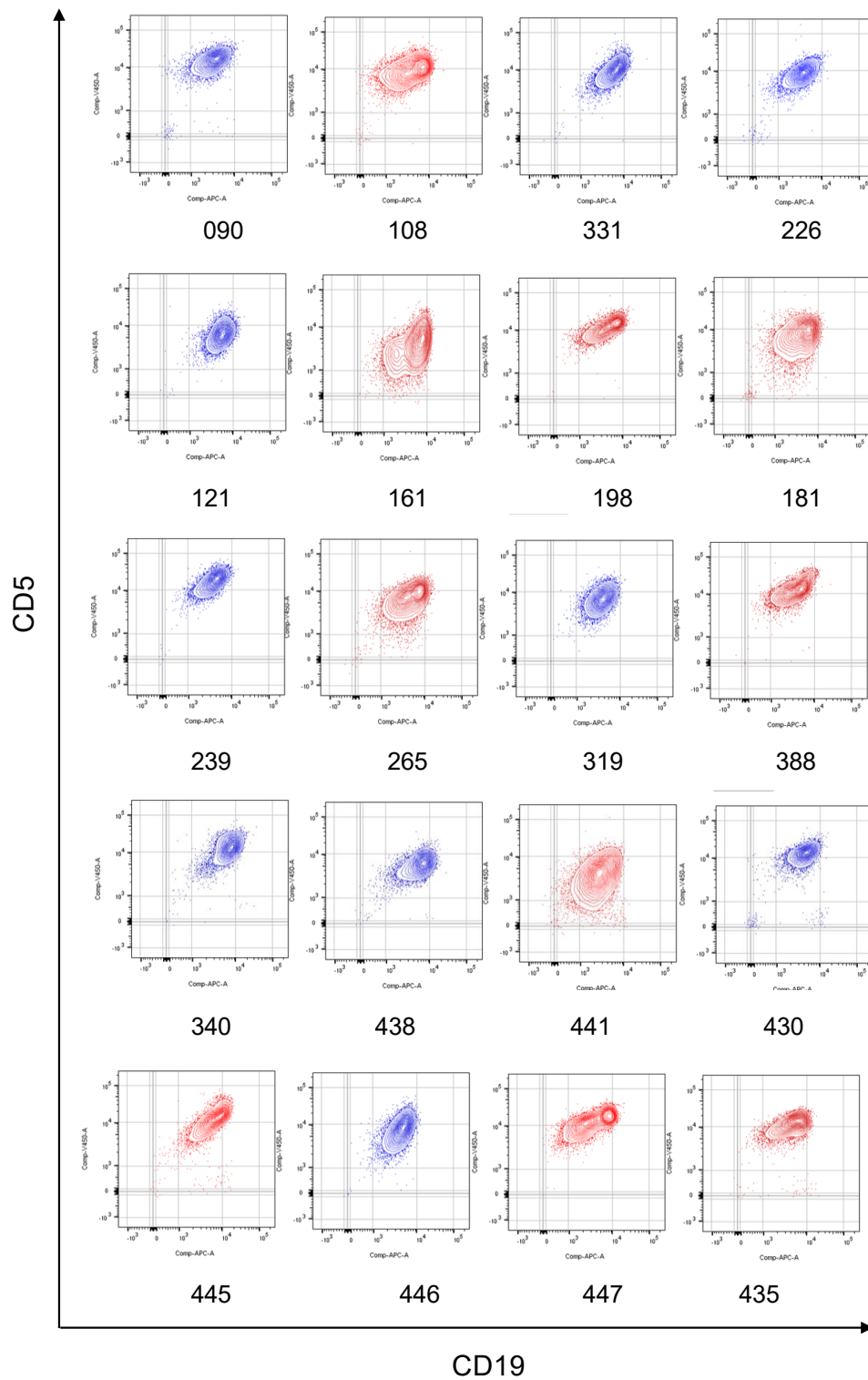
B cell activation

Regulation of lymphocyte activation

Regulation of cell adhesion

Cell surface receptor signaling pathway

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

GENESET	NAME	SIZE	NES	NOM p-val	FDR q-val	Rank in Geneset
REACTOME	REACTOME_INTERFERON_GAMMA_SIGNALING	83	1.56	0.05	1.0	8
REACTOME	REACTOME_INTERLEUKIN_20_FAMILY_SIGNALING	18	1.53	0.04	1.0	10
ONCOGENIC GENESET	PTEN_DN.V1_UP	84	1.59	0.004	0.54	1
ONCOGENIC GENESET	KRAS.300_UP.V1_DN	64	1.57	0.006	0.37	2
IMMUNOLOGIC SIGNATURE	GSE7218_UNSTIM_VS_ANTIGEN_STIM_THROUGH_IGG_BCELL_DN	118	1.58	0.009	1.0	14
IMMUNOLOGIC SIGNATURE	GSE5542_UNTREATED_VS_IFNG_TREATED_EPITHELIAL_CELLS_6H_UP	159	1.51	0.006	1.0	32
IMMUNOLOGIC SIGNATURE	GSE40274_CTRL_VS_FOXP3_AND_HELIOS_TRANSDUCED_ACTIVATED_CD4_TCELL_UP	185	1.49	0.01	1.0	38
IMMUNOLOGIC SIGNATURE	GSE6875_TCONV_VS_FOXP3_KO_TREG_DN	178	1.46	0.012	1.0	48
CELL TYPE GENESET	HE_LIM_SUN_FETAL_LUNG_C5_CD5_POS_CCL22_NEG_MATURE_B_CELL	160	1.91	0.0	0.11	1

Supplementary Table 1

Upstream regulator	Molecule type	Activation z-score	P-value	Target molecule (DEGs from GSEA analysis)
CEBPA	Transcription regulator	1.96	9.6 ^{E-04}	BIK, HNF1B, ITGAX, SFTPB, SFTPD
IFNG	cytokine	0.97	4.4 ^{E-03}	CD68, CHST3, ITGAX, IL18RAP, SMAD3, RRAGD
PRMD1 (BLIMP-1)	Transcription regulator	0.45	7.1 ^{E-04}	IL18RAP, MS4A4A, SLC2A5, SMAD3, SOX8
TGFB1	Growth factor	-0.52	1.9 ^{E-02}	CD101, CD68, CHST3, F13A1, FBLN5, ITGAX, SFTPB, SMAD3
Irf4	Transcription regulator		4.6 ^{E-03}	CD68, IL18RAP
FOXP3	Transcription regulator		3.7 ^{E-03}	CD101, IL18RAP
IKZF3	Transcription regulator		5.9 ^{E-03}	CD68, SMAD3
CD27	Transmembrane receptor		6.6 ^{E-03}	BIK
IL10RA	Transmembrane receptor		1.4 ^{E-02}	CST7, F13A1, P3H2

Supplementary Table 2

UPN	CD5 profile	Disease evolution	Sex	CD38	IGHV status
48	1	0	1	1	1
53	1	ND	1	2	0
55	1	0	1	1	1
61	1	1	1	1	1
90	0	0	1	1	1
108	1	0	1	2	1
113	0	0	1	1	ND
121	0	0	0	1	1
161	1	ND	1	1	1
181	1	1	1	2	0
187	1	1	1	1	1
198	1	1	1	2	0
213	1	0	1	1	1
215	1	0	1	1	1
239	0	0	1	1	1
265	1	0	1	1	1
266	0	1	0	1	1
319	0	0	0	2	0
331	0	1	0	1	1
340	0	1	1	1	1
367	1	1	1	1	1
388	1	1	0	1	1
426	1	1	1	1	1
430	0	0	0	1	1
433	0	1	1	1	1
435	1	1	0	1	0
438	0	1	1	ND	0
441	1	ND	1	2	0
445	1	ND	1	2	0
446	1	1	1	2	1
447	1	0	0	2	0
449	1	1	0	1	0
452	1	1	0	ND	ND
453	0	0	0	1	ND
455	1	1	0	ND	1
113	0	0	1	1	ND
121	0	0	0	1	1
430	0	0	0	1	1
433	0	1	1	1	1
438	0	1	1	ND	0
447	0	0	0	2	0

CD5 profiles: 0 homogeneous and 1 heterogeneous;

Disease evolution: 0 stable, 1 progressive,

Sex: 0 female and 1 male;

CD38: 1 negative and 2 positive;

IGHV status: 0 mutated and 1 unmutated;

ND not determined;

Supplementary Table 3

Antibodies for CD5^{High} and CD5^{Low} subpopulations characterization	Reference	Dilution	Clone
CD3	BD Biosciences, #612940	1/20	UCHT1
CD5	BD Biosciences, #562646	1/20	UCHT2
CD19	BD Biosciences, #345791	1/20	SJ25C1
CD22	BD Biosciences, #740396	1/20	HIB22
CD24	BD Biosciences, #566524	1/20	ML5
CD27	BD Biosciences, #560222	1/20	M-T271
IL10Ra	BD Biosciences, #556013	1/5	3F9
CXCR3	BD Biosciences, #565223	1/20	1C6/CXCR3
CXCR5	BD Biosciences, #564624	1/20	RF8B2
CXCR4	BD Biosciences, #741001	1/83	12G5
CD3	BD Biosciences, #570821	1/20	SK7
CD5	BD Biosciences, #562646	1/20	UCHT2
CD19	BD Biosciences, #345791	1/20	SJ25C1
Antibodies for identification and cell sorting of patient groups	Reference	Dilution	Clone
CD3	BD Biosciences, #570821	1/20	SK7
CD5	BD Biosciences, #562646	1/20	UCHT2
CD19	BD Biosciences, #345791	1/20	SJ25C1

Supplementary Table 4

gRNA sequences for the CD5 target sites	Sequence	Concentration
Hs.Cas9.CD5.1.AA	/AltR1/rCrG rUrUrC rCrArA rCrUrC rGrArA rGrUrG rCrCrA rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR2/	200uM
Hs.Cas9.CD5.1.AD	/AltR1/rArG rArCrU rUrUrU rGrArC rGrCrU rUrGrA rCrUrG rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR2/	200uM

Supplementary Table 5

DISCUSSION GENERALE

Dans la LLC, la plupart des indicateurs pronostiques actuels se concentrent sur les caractéristiques intrinsèques des cellules B leucémiques malignes, reléguant au second plan les défauts de surveillance antitumorale qui jouent pourtant un rôle essentiel dans la survie des cellules B de LLC, et qui sont considérés comme l'une des principales causes de la progression de cette hémopathie. Mon travail de doctorat a donc pour objectif d'identifier les mécanismes et les effecteurs cellulaires responsables de cet échappement tumoral, en étudiant les dialogues croisés qu'ils établissent avec les autres composantes du MET.

Les cellules B malignes immuno-régulatrices contribuent à la progression de la LLC

Les cellules B LLC et les autres cellules immunitaires

Les premiers résultats de notre article publié montrent, une diminution significative du pourcentage de lymphocytes T CD8⁺ après 48 heures de culture de PBMCs leucémiques. Cette diminution est accompagnée d'une réduction des différentes sous-populations monocytaires : non classiques, intermédiaires, et classiques, CD14⁻CD16⁺, CD14⁺CD16⁺ et CD14⁺CD16⁻ respectivement (Manuscrit 1 ; Figure 1A) (Mékinian et al. 2023). Par ailleurs, des travaux antérieurs, dont ceux de l'équipe (Cf. L'immunorégulation dans la LLC), ont décrit une différenciation des monocytes en macrophages de type M2 (Zaaboub et al. 2022; Dondi et Varin-Blank 2022) sous l'influence des cellules B de LLC. De manière intéressante, une forte corrélation positive entre le pourcentage des cellules M2 CD206⁺ et celui des cellules B1-a CD5⁺ a été mise en évidence par Suchanek et son équipe. Leurs résultats démontrent que les cellules B1-a, par leur production d'IL-10, favorisent une polarisation anti-inflammatoire des macrophages vers le phénotype M2 dans le tractus rénal modulant ainsi sa susceptibilité aux infections bactériennes (Suchanek et al. 2023).

Pour évaluer le rôle des cellules B leucémiques dans la modulation des populations lymphocytaires, des co-cultures autologues avec des cellules T CD4⁺ leucémiques ont été réalisées. Une augmentation de la proportion de lymphocytes Tregs a été observée ; augmentation qui est potentialisée suite à un engagement du BCR (Mauscrit 1 ; Figure 1B) (Mékinian et al. 2023). En parallèle, une activité suppressive sur la réponse cellulaire Th1 a été mise en évidence, confirmant la capacité régulatrice des cellules B leucémiques (Mauscrit 1 ; Figure 1D-1F) (Mékinian et al. 2023). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui rapportent que la fréquence des cellules Tregs est plus élevée dans le sang des patients atteints de LLC que dans celui des témoins sains, et que celle-ci est positivement corrélée au taux de cellules B malignes (Roessner et Seiffert 2020). Ces premières observations témoignent de la capacité régulatrice des cellules B leucémiques. L'effort de caractérisation de cette capacité régulatrice a permis d'identifier, au sein d'une cohorte de 28 patients, diverses

sous-populations de cellules B co-exprimant, ou -exprimant, de manière hétérogène des cytokines immunosuppressives majeures, telles que l'IL-10 ou le TGFβ1 (Mauscrit 1 ; Figure 2A-2B-2C) (Mékinian et al. 2023).

Les facteurs immunorégulateurs

L'IL-10

Des travaux récents ont mis en évidence une relation inattendue entre les niveaux d'IgM sécrétées (sIgM) et la « programmation » de l'IL-10 dans les cellules B (McGettigan et al. 2024). Dans leur étude, McGettigan et ses collaborateurs se sont intéressés à la corrélation inverse observée entre les niveaux de sIgM et les cellules B10 au cours de l'ontogenèse. Leurs résultats confirment que les sIgM modulent la taille du pool des cellules B IL-10⁺. En effet, ces cellules B10 sont jusqu'à 10 fois plus présentes chez les souris dépourvues d'IgM sécrétées (sIgM^{-/-}) par rapport aux souris sauvages, parmi les sous-ensembles majeurs de cellules B (B1, B2) et de cellules B régulatrices.

Comme mentionné précédemment (Cf. Développement des Lymphocytes B2), l'IgM est le premier isotype d'immunoglobuline exprimé au cours du développement. Pour la défense de l'hôte, les nouveaux-nés dépendent des IgG et IgA maternelles qui sont transmises passivement pendant la grossesse par la circulation (pour les IgG) et/ou par le lait maternel (pour les IgG et IgA). Quant aux sIgM, ils ne traversent ni la barrière placentaire ni le tube digestif néonatal murin. Pour compenser l'absence des sIgM maternelles, une production prénatale de sIgM est observée chez de nombreuses espèces y compris chez l'homme. Les nouveaux-nés, dont les fonctions homéostatiques des sIgM sont temporairement ou spatialement absentes, sont exposés à de nouveaux pathogènes, notamment lors des premières étapes de l'alimentation ou de l'allaitement. Ils mettent en place des mécanismes compensatoires pour limiter l'inflammation et prévenir l'immunopathologie. Ces mécanismes consistent en l'ajustement de la tolérance immunitaire par la sécrétion d'IL-10 par les cellules B dès le début de la vie, tandis que les niveaux de sIgM augmentent. Ces résultats expliquent la fréquence plus élevée de cellules B productrices d'IL-10 chez les souris néonatales par rapport aux souris adultes sauvages. De plus, ils sont en adéquation avec l'enrichissement des cellules B10 dans le sang du cordon ombilical et chez les jeunes enfants (atteignant un pic entre 5 et 11 ans), comparé à moins de 2 % de cellules B10 chez les adolescents et les adultes en bonne santé. De même, les personnes qui présentent une déficience sélective en IgM, montrent une augmentation faible mais significative de la fréquence des cellules Bregs, confirmant ainsi que les sIgM inhibent la programmation de l'IL-10. En outre, la différenciation très limitée des cellules B de LLC en cellules sécrétrices d'anticorps (ASC) *in vivo* (Ng et Chiorazzi 2021), pourrait expliquer l'élévation des taux sériques d'IL10 chez les patients atteints de LLC comparé aux témoins sains (Karmali et al. 2013; Mohr et al. 2016).

FOXP3

De manière intéressante, notre étude a identifié une sous-population de cellules leucémiques exprimant de manière hétérogène le facteur de transcription FOXP3, tant au niveau transcriptionnel que protéique (Mauscrit 1 ; Figure 5A-5B) (Mékinian et al. 2023). À l'instar de la régulation de FOXP3 par le TGF β 1 dans les cellules Tregs, son expression dans les cellules B leucémiques est également augmentée en réponse à une stimulation par ce facteur de croissance. Bien qu'une telle expression n'ait, à notre connaissance, jamais été rapportée dans la LLC, un nombre croissant d'études a récemment documenté l'expression de ce facteur de transcription dans les cellules B dans divers contextes physiologiques (Noh et al. 2012; Vadasz et al. 2015; Grubczak et al. 2021; Chao et al. 2023) ou pathologiques (Vadasz et al. 2015; Park et al. 2016). L'ensemble de nos résultats renforce la notion de diversité fonctionnelle de l'expansion clonale des cellules B de LLC.

De nombreux travaux, notamment ceux de EC. Rosser et C. Mauri, ont établi que les cellules B régulatrices ne sont pas spécifiques d'un lignage cellulaire mais se différencieraient en réponse à des stimuli environnementaux (Rosser et Mauri 2015; Mohd Jaya et al. 2019). Pareillement, l'expression de FOXP3 et son maintien sont soumis à des régulations transcriptionnelles et épigénétiques, ainsi qu'à des modifications post-traductionnelles qui sont elles aussi, fortement influencées par les facteurs environnementaux (Rough, Allard, et Bettini 2022). Il est donc envisageable que ces mêmes facteurs environnementaux puissent induire l'expression du facteur de transcription dans cette sous-population leucémique. Parmi ces facteurs, une diminution de la diversité du microbiote intestinal est couramment observée chez les patients LLC. Cette dysbiose se manifeste par la baisse du ratio Bacteroidetes/Firmicutes (Kawari et al. 2019). Ce déséquilibre est associé à une augmentation des concentrations d'acides gras à chaîne courte, tels que le butyrate et le propionate (Ríos-Covián et al. 2016). Ces acides gras sont connus pour augmenter l'expression du gène *foxp3* et pour favoriser la stabilisation de sa protéine dans les lymphocytes T CD4⁺ (Furusawa et al. 2013). De même, l'hypoxie pourrait être un autre facteur environnemental influençant l'expression de FOXP3. En effet, les lymphocytes B de LLC présentent une augmentation de l'expression de HIF-1 α et une stabilisation de sa protéine. Cette dernière oriente les lymphocytes T CD4⁺ vers un phénotype Treg en régulant positivement l'expression de FOXP3 (Arruga et al. 2020; De Rosa et al. 2015). De manière intéressante, les cellules B leucémiques cultivées en conditions hypoxiques ont montré une transcription fortement augmentée du gène *il10* par rapport aux mêmes cellules exposées à des conditions normoxiques, améliorant ainsi leurs propriétés régulatrices (Fillatreau 2019). Des recherches sont en cours au sein de notre équipe pour identifier les déterminants de l'expression ectopique de FOXP3 dans les cellules B de LLC en réponse à diverses stimulations (M. Ducroux, données non présentées). Ces recherches devraient mettre à jour le potentiel rôle régulateur de FOXP3 dans les cellules B pathologiques.

Les facteurs immunomodulateurs et la progression de la LLC

Une analyse hiérarchique non supervisée du taux d'expression des trois facteurs régulateurs, à savoir l'IL-10, le TGF- β 1 et FOXP3, a permis de définir deux groupes de patients. De manière intéressante, une proportion plus élevée des cellules Tregs est observée dans les échantillons des patients du groupe 2, suggérant une plus grande activité cellulaire régulatrice. De plus, les patients du groupe 2 présentent un délai plus court avant leur premier traitement, que les patients du groupe 1, indiquant que les taux d'expression des trois facteurs sont inversement corrélés au risque de progression de la LLC (Mauscrit 1 ; Figure 5D-5E-5F) (Mékinian et al. 2023). Ces résultats sont en adéquation avec la littérature actuelle, qui établit le nombre de Tregs comme un facteur prédictif indépendant du délai avant la première ligne de traitement (Roessner et Seiffert 2020). Ils suggèrent également que les taux d'expression de ces trois facteurs puissent être un indicateur de la progression de la maladie.

Le phénotype des cellules régulatrices de LLC

L'analyse de l'expression différentielle des marqueurs phénotypiques précédemment décrits dans diverses populations de Bregs (CD5, CD19, CD27, CD24, CD25 et CD38) (Cf. Phénotypes des lymphocytes B régulateurs) a permis d'affiner la signature phénotypique des sous-populations de cellules B de LLC productrices d'IL-10 et de TGF β 1. Ces cellules se distinguent par des niveaux d'expression plus élevés des marqueurs de surface CD5, CD19 et CD27 (Mauscrit 1 ; Figure 2D) (Mékinian et al. 2023). Le rôle du CD5 dans la régulation de la production de l'IL-10 par les cellules B leucémiques (Garaud et al. 2011) corrobore nos observations et renforce l'idée que les marqueurs CD5, CD19 et CD27 constituent des caractéristiques phénotypiques discriminantes de ce sous-ensemble cellulaire dans notre étude.

Les profils d'expression du CD5 modulent la réponse cellulaire

Comme mentionné précédemment, les Bregs ne sont pas spécifiques d'un lignage cellulaire mais se différencient en réponse à des stimuli locaux (Rosser et Mauri 2015). Il est donc peu probable que les caractéristiques fonctionnelles hétérogènes qui sont décrites dans la LLC soient réduites à un phénotype unique figé. Cette hétérogénéité découle très probablement de l'induction de programmes et de l'activation de voies de signalisation dans les cellules leucémiques par les cellules environnantes. En effet, de nombreuses études, dont les travaux de notre équipe, ont montré que des facteurs environnementaux modulent l'expression de nombreux marqueurs de surface, y compris ceux utilisés pour identifier les Bregs leucémiques. Parmi ces marqueurs, les CD19 et CD5 voient leur expression plus au moins

diminuer dans les cellules B de LLC stimulées en réponse à un engagement du BCR (Saint-Georges et al. 2106) ou co-stimulées en présence des ligands du BCR et CD40 (Mékinian A et al 2023). Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'expression ectopique du CD5 et de son hétérogénéité dans les cellules B de LLC. En effet, au-delà de sa contribution au profil régulateur de ces cellules tumorales, le CD5 a été décrit comme un modulateur direct de leur biologie. Il pourrait activer des voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale.

Il a été décrit que le CD5 engage un programme métabolique spécifique dans les cellules B1-a en se liant à la sous-unité p85 de PI3K et en activant la voie PI3K/Akt/mTOR (Taher et al. 2020; Bystrom et al. 2022; Clarke et al. 2018). Cette voie de signalisation favorise le « Wobble effect », une flexibilité dans l'appariement des anticodons des ARNt avec les codons correspondants dans l'ARNm, assurant ainsi une traduction efficace des protéines impliquées dans la pathogenèse de diverses maladies. L'activation de la voie PI3K-mTOR conduit à l'expression du « complexe élongator » ELP1 et ELP3, qui est nécessaire à la modification de l'uridine 34 (U34) des ARNts. Ce mécanisme moléculaire influence directement leur flexibilité et permet ainsi le décodage de protéines enrichies en codons qui nécessitent une modification de l'ARNt U34. Il assure une traduction robuste de leur ARNm, notamment pour des protéines telles que HIF1- α , et favorise ainsi la reprogrammation métabolique et une glycolyse accrue qui sous-tendent la progression tumorale (Rapino et al. 2018). Par ailleurs, un taux de traduction plus élevé a été observé dans la LLC. Les travaux de l'équipe de J. Paggetti ont démontré que les cellules de LLC et les Tregs présentent des taux de traduction *in vivo* plus élevés que ceux des cellules B normales et des cellules T CD4⁺ conventionnelles, respectivement. Cette dérégulation de la traduction favorise préférentiellement l'initiation de la traduction et la synthèse d'oncogènes, tels que Myc, et est corrélée à une survie plus courte des patients et à des paramètres cliniques défavorables (Largeot et al. 2023).

Les niveaux d'expression du CD5 régulent la signalisation du BCR

En dehors de ces effets sur la reprogrammation métabolique, nous nous sommes intéressés à la fonction la mieux documentée du CD5 dans les cellules B, à savoir son rôle de régulateur négatif de la signalisation du BCR. Nous avons donc orienté nos recherches bibliographiques vers la pertinence de ce rôle dans le contexte de la LLC. De manière intéressante, une substitution non synonyme de l'acide aminé Alanine en Valine en position 471 (A471V ; rs2229177) dans la région cytoplasmique du CD5, qui sous-tend une transduction du signal plus efficace, décrite précédemment en physiologie (Cf. Le gène CD5), dans le contexte de la LLC. En effet, l'homozygotie pour l'allèle dérivé V471, qui implique une meilleure fonction inhibitrice du CD5 (Cenit et al. 2014), est associée à un meilleur pronostic dans la LLC. Cet allèle dérivé A471V, résulte d'un balayage sélectif récent en Asie de l'Est et est inclus dans l'haplotype prédominant de cette population (Carnero-Montoro et al. 2012). Il est à noter que la LLC est une hémopathie rarement décrite chez les personnes asiatiques avec une incidence 5 à 10 fois moins élevée par rapport à celle décrite chez les personnes d'ascendance

européenne (S.-M. Yang et al. 2015). En revanche, ce rapport est débattu par l'étude de Delgado et al. (Delgado et al. 2017) qui montre une association entre ce variant A471V et une survie sans progression (PFS) plus courte de la LLC. Cependant, cette dernière étude a également pris en compte un deuxième polymorphisme du CD5, le rs2241002 (P224 > L), qui pourrait influencer les résultats. En somme, ce premier rapport (Cenit et al. 2014) est en concordance avec la compréhension actuelle qui associe la capacité de signalisation du BCR à la progression de la maladie, une PFS plus courte et une OS réduite (Le Roy et al. 2012).

Ce rapport fait également écho à l'étude de l'équipe de Tibaldi (Tibaldi et al. 2011), qui rapporte, dans les cellules de LLC, que le CD5 atténue la signalisation du BCR en s'associant à l'effecteur SHP-1 et en favorisant sa localisation membranaire. Leurs résultats *in vitro* suggèrent l'existence potentielle d'une corrélation négative entre l'expression du CD5 et la signalisation du BCR dans les cellules de LLC. Sur une large cohorte de patients LLC, une autre étude a démontré une association entre une expression plus élevée du CD5 et une survie globale augmentée, ainsi qu'un délai plus long avant un traitement (TTT) (D. R. Friedman et al. 2018). Dans cette cohorte, une faible MFI de CD5 et certains facteurs pronostiques (Stade de Rai, CD38, ZAP70, IGHV) sont associés à un pronostic plus sévère. De plus, les niveaux de CD5 ont permis de mieux définir les groupes de patients à risques. En effet, le faible niveau de CD5 améliore la stratification des patients appartenant à des groupes à risques favorables, notamment les patients avec une faible expression de ZAP70, des gènes IGHV mutés et, un profil cytogénétique favorable. Cette étude souligne donc l'apport important qu'offre la prise en compte des niveaux d'expression du CD5 pour la stratification de la maladie et suggère que le CD5 puisse moduler la progression de la pathologie, compte tenu de son rôle régulateur négatif dans la signalisation du BCR (D. R. Friedman et al. 2018). Cette même étude révèle que les cellules des patients afro-américains atteints de LLC présentent une expression de CD5 inférieure à celle des patients caucasiens. Ces résultats pourraient, au moins en partie, expliquer les observations cliniques du centre de cancérologie du MD Anderson et du Centre médical de l'Université Duke selon lesquelles les patients afro-américains ont des caractéristiques pronostiques défavorables et une survie plus courte par rapport à leurs homologues non afro-américains (Falchi et al. 2013).

Nos travaux ont permis d'identifier deux groupes de patients selon le spectre d'expression du CD5 retrouvé à la surface des cellules B de LLC fraîchement purifiées : un groupe au profil homogène et un autre groupe au profil hétérogène, qui est caractérisé par des niveaux d'expression différentiels du CD5 distinguant deux sous-populations, les cellules B CD19⁺CD5^{high} et CD19⁺CD5^{low}. Ces observations sont soutenues par les travaux de Bashford-Rogers et al. qui rapportent une hétérogénéité d'expression du CD5 intra-clonale dans la LLC (Bashford-Rogers et al. 2017). Ils mettent en évidence ces deux sous-populations leucémiques CD5^{high} et CD5^{low}, qui présentent des structures très similaires, comme le détermine la phylogénie de leurs répertoires du BCR (Bashford-Rogers et al. 2017). Le chevauchement des

répertoires du BCR entre ces sous-populations CD5^{high} et CD5^{low} dans le sang des patients montre que la LLC englobe un continuum de niveaux d'expression du CD5 avec des commutations continues de l'état CD5. Ceci indique que celui-ci est sujet à des variations dans l'expression de CD5, et que la dominance observée des cellules CD5^{high} représente un flux équilibré plutôt qu'un état fixe. De manière intéressante, ces travaux ont également révélé que la diminution de l'expression du CD5 est associée à des différences d'expression membranaire des CD81 et CD45. L'analyse comparative des données normalisées de notre étude transcriptomique entre les populations CD5^{high} et CD5^{low} montre des tendances similaires (données non présentées), avec une tendance à la diminution de l'expression en ARNm de CD81 dans les populations CD5^{low} et une diminution significative de l'expression du CD45 dans les populations CD5^{high} ($p = 0,0039$).

Les niveaux d'expression du CD5 au cœur des modèles de cinétique des cellules leucémiques

La littérature actuelle suggère que la pathogenèse de la LLC est associée à une hématopoïèse clonale B CD5⁺ liée à l'âge (ARCH), maintenue par l'engagement du BCR et par l'accumulation d'évènements oncogéniques (Kikushige 2020). Les infections et les réponses inflammatoires associées sont, de ce fait, souvent considérées comme jouant un rôle dans la pathogenèse de certains cas de LLC (Hoogeboom et al. 2013; Andrea Nicola Mazzarello et al. 2023), notamment en augmentant le risque de nouvelles mutations génétiques lors de l'activation des cellules B néoplasiques CD5⁺. Ces infections pourraient ainsi exacerber une leucémie sous-jacente, jusque-là inférieure aux seuils cliniques d'un diagnostic positif (Andrea Nicola Mazzarello et al. 2023). C'est ce que suggèrent de nombreux rapports, en particulier ceux concernant la découverte fortuite d'une LLC chez des patients hospitalisés suite à une infection par le SARS-CoV-2. En effet, les patients affectés par la COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), avaient à leur admission, une numération sanguine normale et aucune expansion de cellules B monoclonales. En revanche, deux jours post-admission, ces patients présentaient une augmentation de leur lymphocytose. Cette dernière se traduisait par l'expansion de cellules B monoclonales CD5⁺ et a conduit à un nouveau diagnostic, à savoir celui d'une LLC. L'augmentation rapide et substantielle du nombre de cellules B de LLC dans le sang de ces patients exclut une (hyper)lymphocytose causée par une prolifération cellulaire. Elle favorise plutôt l'hypothèse d'un trafic augmenté des cellules B de LLC depuis les organes lymphoïdes secondaires (OL-II) où elles composent des populations cellulaires actives (PFs). En effet, les modèles de cinétique *in vivo* de la LLC (Cf. Activation et trafic des cellules B malignes) proposent que, dans les OL-II, les cellules leucémiques récemment activées internalisent leur CXCR4 et migrent vers la circulation sanguine où elles acquièrent un phénotype quiescent, révélant une population de cellules B monoclonales CD5⁺ qui conduit au diagnostic de la LLC (Andrea Nicola Mazzarello et al. 2023; D. Friedman et al. 2023). Une fois dans le flux sanguin et en l'absence de stimulation, une fraction de ces cellules B CD5⁺ de LLC régulerait à la hausse un nouvel ensemble de molécules d'adhésion pour assurer leur réintégration dans les tissus lymphoïdes et initier un nouveau cycle de prolifération. Si les taux de survie/prolifération

dépassent ceux de l'apoptose, alors la progression de la LLC serait favorisée. Dans notre travail sur le CD5, nous avons tenté de comprendre la relation complexe entre l'activation et le potentiel de migration, en tenant compte de la dynamique d'expression du CD5. Pour ce faire, nous avons mesuré les niveaux d'expression de divers marqueurs d'activation ainsi que de certains récepteurs aux chimiokines dans les deux sous-populations CD5^{high} et CD5^{low} (Manuscrit 2 ; Figure 1C). Nos analyses de corrélation ont mis en évidence une tendance vers une corrélation inverse entre l'expression du CD5 et celle de CXCR4 (en termes de MFI) dans les cellules de LLC, en accord avec les travaux de G. Manukyan et al. (Manukyan et al. 2020). Par ailleurs, nos résultats montrent que cette corrélation inverse est significative ($p = 0.0319$) dans la sous-population CD5^{high} (Manuscrit 2 ; Supplementary Figure 5D), suggérant que cette dernière appartiendrait à la fraction circulante selon les modèles cinétiques de la LLC (Cuthill et al. 2022; 2022; D. Friedman et al. 2023). La mesure des niveaux d'expression des différents récepteurs aux chimiokines corrobore les travaux de G. Manukyan et al., et montre que les cellules CD5^{high} expriment des niveaux plus élevés de CXCR3 ($p = 0,0005$) (Manuscrit 2 ; Figure 1C) et des niveaux plus bas de CXCR4 (Manuscrit 2 ; Supplementary Figure 5C), bien que ces derniers ne montrent pas de différence significative entre les deux groupes de notre cohorte (Manukyan et al. 2020). De manière intéressante, G. Manukyan et son équipe ont rapporté une corrélation inverse entre l'expression de ces deux récepteurs (MFI), qui pourrait s'expliquer par l'influence régulatrice du CXCR3 sur la distribution du CXCR4 à la surface de la membrane cellulaire, comme le suggèrent les travaux de S. Ganghammer (Ganghammer et al. 2016). Nos résultats n'ont pas permis de confirmer cette observation. Toutefois, il est possible que des expériences complémentaires avec un nombre d'échantillons plus élevé puissent corroborer ces conclusions. Par ailleurs, S. Ganghammer et ses collaborateurs ont rapporté qu'une forte expression du CXCR3, associée à une faible expression du CXCR4, caractéristiques de la sous-population CD5^{high}, sont liées à un pronostic favorable de la LLC (Ganghammer et al. 2016; Manukyan et al. 2020). En effet, ces deux récepteurs forment des complexes hétéromériques qui entraînent leur inhibition croisée par une contrainte conformationnelle du CXCR4 dont l'affinité est réduite pour CXCL12, altérant ainsi sa fonctionnalité. A l'inverse, dans les cellules CD5^{low}, les faibles niveaux de CXCR3 réduiraient la formation des hétérodimères CXCR3-CXCR4, augmentant ainsi la fonctionnalité de CXCR4. Cela permettrait une migration efficace des cellules B de LLC vers les sites sanctuaires de prolifération. En effet, il a été démontré que les cellules des patients présentant un phénotype CXCR3^{dim}/CXCR4^{bright} affichent une évolution clinique plus agressive que ceux avec un phénotype CXCR3^{bright}/CXCR4^{dim} (Ganghammer et al. 2016). Ces observations sont cohérentes avec les conclusions de Xue et al. qui identifient la surexpression de CXCR4 comme un marqueur pronostique défavorable dans la LLC (Xue et al. 2024). Ils renforcent également les travaux de D. Friedman et al. qui mettent en évidence une augmentation du potentiel de prolifération des fractions PF et QF dans des échantillons de LLC issus du sang périphérique de patients en rechute par rapport aux échantillons correspondants prélevés avant traitement (D. Friedman et al. 2023). Par ailleurs, les recherches menées par A.N. Mazzarello et son équipe montrent que ces mêmes fractions PF et QF sont les moins sensibles à un traitement par de l'ibrutinib,

ce qui suggère qu'elles pourraient constituer un réservoir de cellules leucémiques prêtes à initier un nouveau cycle de prolifération si des signaux stimulants appropriés sont délivrés par le MET (Andrea N. Mazzarello et al. 2023).

Les niveaux d'expression du CD5 influencent la survie des cellules B malignes

Pour approfondir notre étude de l'impact fonctionnel du CD5, nous avons utilisé une lignée cellulaire B de LLC, appelée HG3 comme modèle d'étude. A notre connaissance, les HG3 sont les seules cellules B de LLC immortalisées par l'EBV qui expriment le marqueur clé de la LLC, le CD5. Cependant, l'expression de ce dernier est bimodale, distinguant deux sous-populations CD19⁺/CD5⁺ et CD19⁺/CD5⁻, avec une prédominance de la sous-population CD19⁺/CD5⁺ (Rosén 2012) (Manuscrit 2 ; Figure 1D). Dans leur analyse de séquençage de l'exome entier (WES), Quentmeir et al. décrivent en détail la composition clonale des cellules HG3 et attribuent la présence de ces deux sous-populations CD5⁺ et CD5⁻ à l'existence de sous-clones leucémiques distincts, plutôt qu'à des artefacts de culture. Cette distinction est essentielle, car elle écarte l'hypothèse souvent évoquée d'une activation *in vitro* entraînant l'expression du marqueur dans un sous-ensemble de cellules, ou celle d'une contamination croisée avec une seconde lignée exprimant des marqueurs de surface discordants (Quentmeier et al. 2016). Il a aussi été rapporté que la lignée cellulaire HG3 comprend trois lignées clonales, à savoir une première qui est CD5⁻, une seconde qui est CD5⁺, et une troisième qui contient à la fois des clones CD5⁺ et CD5⁻. Au sein de cette troisième lignée clonale, les clones « précoces » sont caractérisés par un nombre réduit de mutations et expriment le CD5 (CD5⁺). A l'inverse les clones « tardifs » accumulent un nombre plus élevé de mutations et perdent l'expression du CD5 pour constituer un pool cellulaire CD5⁻. Les résultats de cette étude suggèrent également que le CD5 est régulé au niveau épigénétique/transcriptionnel, indépendamment de l'épissage alternatif décrit précédemment (Renaudineau et al. 2005; Burgueño-Bucio, Mier-Aguilar, et Soldevila 2019) (Cf. Le gène CD5). Grâce à ses sous-clones isogéniques, la lignée cellulaire HG3 émerge comme un modèle pertinent pour explorer la diversité génétique des tumeurs et évaluer l'impact fonctionnel de l'hétérogénéité d'expression du CD5 sur la réponse à une stimulation du BCR. Notamment, la mesure de l'activité métabolique des deux sous-populations CD5⁺ et CD5⁻ triées montre que la sous-population CD5⁻ répond avec plus d'intensité à une stimulation antigénique et présente ainsi un avantage de survie supérieur à celui de la sous-population CD5⁺ (Manuscrit 2 ; Figure 2A). Ces résultats confirment notre hypothèse basée sur le rôle régulateur négatif du CD5 dans la signalisation du BCR (Tibaldi et al. 2011). De plus, ces résultats révèlent une hétérogénéité de la réponse à l'engagement du BCR au sein des populations, avec une variabilité plus marquée dans la population CD5⁺. Cette hétérogénéité de réponse pourrait en partie être expliquée par la variation d'expression du CD5 et la perte progressive de son expression au cours du développement de la sous-population CD5⁺

« précoce », appartenant à la troisième lignée clonale, vers la population « tardive » CD5⁻ (Quentmeier et al. 2016).

Dans un second temps, une mesure de l'activité métabolique des cellules HG3 sauvages et des cellules HG3 CD5 knock-out, générées par des approches séquentielles CRISPR du CD5 (Manuscrit 2 ; Figure 1D) a été faite. Elle semble révéler une levée progressive de l'inhibition de la signalisation du BCR à mesure que l'expression du CD5 est diminuée (Manuscrit 2 ; Figure 2B), renforçant ainsi le rôle répressif du CD5. En effet, les résultats montrent que l'inversion de l'expression bimodale du CD5 dans les cellules HG3 CD5 knock-out entraîne une augmentation significative de l'activité métabolique, suggérant l'impact fonctionnel de l'expression dynamique du CD5 sur la réponse cellulaire. Pour mieux décortiquer les mécanismes moléculaires, nous nous sommes basés sur les travaux de Tibaldi et son équipe, qui relatent le rôle du CD5 dans la modulation de la signalisation du BCR par son association avec l'effecteur de signalisation SHP-1 (Tibaldi et al. 2011). Pour cela, nous avons mesuré l'activité phosphatase dans les cellules HG3 sauvages et les cellules HG3 « RNP3 » ; ces dernières présentant la plus grande inversion bimodale observée du CD5 (Manuscrit 2 ; Figure 1D). L'approche de cytométrie intracellulaire « Phosflow » s'est concentrée sur un site de phosphorylation, considéré comme un site activateur de SHP-1 (Tyr536). Nos résultats préliminaires, non inclus dans le manuscrit CD5, tendent à montrer une diminution de l'activité phosphatase dans la condition HG3 « RNP3 » par rapport aux cellules sauvages. Cette observation corrobore nos résultats sur l'activité métabolique qui suggèrent une levée d'inhibition de la signalisation du BCR quand le CD5 est invalidé. Elle renforce l'importance de la dynamique d'expression du CD5 sur la réponse cellulaire. L'absence de significativité statistique des niveaux d'expression de pSHP-1 (Tyr536) entre les deux populations cellulaires (sauvages et RNP3) nécessitent d'augmenter le nombre d'expériences.

Les niveaux d'expression du CD5 modulent le sécrétome des cellules B leucémiques

L'impact fonctionnel du changement d'expression du CD5 a également été démontré sur la capacité sécrétoire des cellules HG3. En effet, la réversion de l'expression du CD5 (Manuscrit 2 ; Figure 1D) modifie le sécrétome de la lignée cellulaire HG3 (Manuscrit 2 ; Figure 1D, à droite) en le faisant basculer d'un profil à dominance anti-inflammatoire à pro-inflammatoire. Ce changement de facteurs solubles est caractérisé majoritairement par une diminution significative du taux d'IL-10 et s'accompagne d'une augmentation marquée de la sécrétion d'IFN- γ au cours de l'invalidation séquentielle du CD5. Ces résultats corroborent nos travaux publiés sur les facteurs immuno-modulateurs exprimés par les cellules leucémiques, qui montrent qu'une expression élevée du CD5 par les cellules B de LLC est associée à l'expression intracellulaire d'IL-10 et de TGF β 1 ; deux cytokines anti-inflammatoires impliquées dans le défaut de surveillance anti-tumorale. Ce défaut de surveillance se traduit par la réduction des cellules Th1 IFN- γ ⁺ (Mékinian et al. 2023) et contribue à la progression de

l'hémopathie (Mékinian et al. 2023). Ainsi, les niveaux d'expression du CD5 dans les cellules B leucémiques seraient liés à leurs fonctions immuno-régulatrices. Par conséquent l'invalidation de ce marqueur pourrait expliquer la transition d'un secretome à dominante IL-10 vers un secretome à dominante IFN- γ dans notre modèle de cellules leucémiques (Manuscrit 2 ; Figure 1D, à droite). Nos observations sont en accord avec différents travaux publiés, notamment ceux de H. Gary-Gouy et al., qui démontrent que la transfection du gène CD5 dans des cellules de la lignée B, Daudi entraînent la production d'IL-10 (Gary-Gouy, Harriague, Bismuth, et al. 2002; Gary-Gouy et al. 2007). Ils corroborent encore l'étude de S. Garaud et al., qui rapporte que le CD5 contrôle la production de l'IL-10 dans les cellules B de LLC par une activation des facteurs de transcription STAT3 et NFAT2 (Garaud et al. 2011). Par ailleurs, notre étude phénotypique des sous-populations CD5^{high} et CD5^{low} issus de patients LLC montre que des niveaux élevés de CD5 sont également associés à une expression plus élevée du récepteur de l'IL-10 (CD210a) (Manuscrit 2 ; Figure 1C). Mes résultats suggèrent que ces cellules leucémiques pourraient répondre non seulement à une sécrétion autocrine d'IL-10, comme le montrent les données non publiées de l'équipe (Mhibik M) mais également à une sécrétion paracrine comme le démontrent mes données publiées (Manuscrit 1 ; Mékinian et al. 2023), renforçant la notion que des niveaux élevés de CD5 sont liés aux fonctions Bregs dans la LLC.

La dynamique d'expression du CD5 dans la physiopathologie de la LLC

Nos travaux révèlent la complexité de l'impact fonctionnel des niveaux d'expression du CD5 sur la réponse des cellules B de LLC et sur le devenir des patients. Des niveaux d'expression élevés du CD5 semblent favoriser une production de cytokines immuno-régulatrices telles que l'IL-10, qui confèrent un avantage de survie (Gary-Gouy, Harriague, Bismuth, et al. 2002) et favorisent la progression de la pathologie (Mékinian et al. 2023). Des niveaux d'expression plus faibles du CD5 semblent, quant à eux, moduler moins efficacement la signalisation du BCR, compromettant ainsi le maintien de son équilibre et l'établissement de seuils d'activation (Manuscrit 2 ; Figure 2B). Cette activation non-modulée se traduit également par un avantage de survie cellulaire (Manuscrit 2 ; Figure 2B) (Le Roy et al. 2012; D. R. Friedman et al. 2018). Selon leur profil d'expression du CD5, nous avons distingué deux groupes de patients. Nous proposons que les patients au profil d'expression hétérogène du CD5, qui sont caractérisés par la présence de deux sous-populations aux MFI les plus extrêmes, bénéficient d'un avantage de survie cellulaire en réponse à une stimulation du BCR et semblent avoir un plus grand risque de progression de la LLC. Cet effet résulte probablement de l'action conjointe de leur deux sous-populations High et Low. A l'inverse, les patients au profil d'expression homogène, dont les MFI du CD5 sont moins dispersées et reflètent probablement un flux équilibré avec une dominance CD5^{High}, ont des cellules qui répondent modérément ou pas à un engagement du BCR et proviennent de patients ayant un moins grand risque de développer une forme progressive de la maladie (Manuscrit 2 ; Table 1). Il est à noter que nous avons exclu six patients de notre étude transcriptomique en raison d'un traitement antérieur du patient ou de la présence de mutations des gènes ATM, P53, RPS15, IKZF3 et SFRB1 dans les cellules B leucémiques. La quasi-totalité d'entre eux présentaient des profils d'expression hétérogènes

(Dotplots non présentés), indiquant une possible association entre un profil d'expression du CD5 hétérogène et des caractéristiques pronostiques défavorables. Ce lien ne sera possible que par l'analyse de plus d'échantillons LLC.

CONCLUSIONS

Mes travaux de thèse ont principalement examiné la dynamique et l'hétérogénéité d'expression du CD5 à la surface des cellules B leucémiques, tout en étudiant les profils transcriptomiques associés à l'expression de ce marqueur clé de la LLC. Dans ce contexte, notre approche a visé à élucider les mécanismes moléculaires par lesquels le CD5 module les réponses des cellules leucémiques, tout en ouvrant de nouvelles perspectives pour une compréhension plus fine de l'évolution clinique hétérogène de cette pathologie.

Par la démonstration d'un lien entre l'hétérogénéité d'expression du CD5 à la surface des cellules B de LLC et leurs profils transcriptomiques et fonctionnels, mes travaux fournissent de nouveaux arguments à la contribution du CD5 au phénotype régulateur leucémique et à son implication fonctionnelle dans le processus d'échappement à l'immunité anti-tumorale.

D'un point de vue translationnel, l'examen des profils d'expression du CD5 dans 3 cohortes indépendantes a mis en évidence l'existence d'une sous-population de cellules leucémiques, la CD5^{Low} au sein de la masse tumorale. Cette sous-population apporte un avantage de survie en réponse à un engagement du BCR, en accord avec l'avantage de survie observé dans une lignée B de LLC, suite à l'invalidation du CD5. il serait intéressant de vérifier l'activité enzymatique de la phosphatase SHP1 dans cette sous-population cellulaire CD5^{Low}, pour y compléter les caractéristiques intrinsèques fonctionnelles. A l'image de la corrélation inverse entre l'avantage de survie cellulaire et la survie globale des patients LLC (Le Roy et al. 2012), cette sous-population CD5^{low} tend à être plus fréquente chez les patients développant une forme progressive de la maladie (Manuscrit 2 ; Table 1). Même si d'autres paramètres clinico-biologiques, comme le sexe, le CD38 et le statut mutationnel des IGHV, n'ont pas montré de liens significatifs avec la présence de cette sous-population dans notre cohorte de 41 patients, il serait intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons LLC pour l'inclure comme un éventuel paramètre de stratification des patients.

BIBLIOGRAPHIE

- Agathangelidis, Andreas, Anastasia Chatzidimitriou, Katerina Gemenetzi, Veronique Giudicelli, Maria Karypidou, Karla Plevova, Zadie Davis, et al. 2021. « Higher-order connections between stereotyped subsets: implications for improved patient classification in CLL ». *Blood* 137 (10): 1365-76. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007039>.
- Agathangelidis, Andreas, Viktor Ljungström, Lydia Scarfò, Claudia Fazi, Maria Gounari, Tatjana Pandzic, Lesley-Ann Sutton, et al. 2018. « Highly Similar Genomic Landscapes in Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Ultra-Stable Chronic Lymphocytic Leukemia with Low Frequency of Driver Mutations ». *Haematologica* 103 (5): 865-73. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.177212>.
- Ahmed, Rizwan, Zahra Omidian, Thomas Donner, et Abdel Rahiam A. Hamad. 2018. « Hiding in Plain Sight: Time to Unlock Autoimmune Clues in Human CD5+ B Cells by Using NextGen Technology ». *Discovery medicine* 26 (142): 79-83.
- Aira, Lazaro Emilio, et Gudrun Fiona Debes. 2021. « Skin-Homing Regulatory B Cells Required for Suppression of Cutaneous Inflammation ». *The Journal of Investigative Dermatology* 141 (8): 1995-2005.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.01.013>.
- Alhakeem, Sara S., Vishal J. Sindhava, Mary K. McKenna, Beth W. Gachuki, John C. Byrd, Natarajan Muthusamy, et Subbarao Bondada. 2015. « Role of B cell receptor signaling in IL-10 production by normal and malignant B-1 cells ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1362 (1): 239-49. <https://doi.org/10.1111/nyas.12802>.
- Apostoli, Anthony J, Graham EA Skelthorne-Gross, Rachel E Rubino, Nichole T Peterson, Michael A Di Lena, Mark M Schneider, Sandip K SenGupta, et Christopher JB Nicol. 2014. « Loss of PPAR γ expression in mammary secretory epithelial cells creates a pro-breast tumorigenic environment ». *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer* 134 (5): 1055-66. <https://doi.org/10.1002/ijc.28432>.
- Arruga, Francesca, Benjamin Baffour Gyau, Andrea Iannello, Nicoletta Vitale, Tiziana Vaisitti, et Silvia Deaglio. 2020. « Immune Response Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia: Dissecting Molecular Mechanisms and Microenvironmental Conditions ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (5): 1825. <https://doi.org/10.3390/ijms21051825>.
- Aruffo, A., M. A. Bowen, D. D. Patel, B. F. Haynes, G. C. Starling, J. A. Gebe, et J. Bajorath. 1997. « CD6-Ligand Interactions: A Paradigm for SRCR Domain Function? » *Immunology Today* 18 (10): 498-504. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(97\)01130-4](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(97)01130-4).
- Avgerinos, Konstantinos I., Nikolaos Spyrou, Christos S. Mantzoros, et Maria Dalamaga. 2019. « Obesity and Cancer Risk: Emerging Biological Mechanisms and Perspectives ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 92 (mars):121-35. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.001>.
- Bagnara, Davide, Andrea Nicola Mazzeo, Fabio Ghiotto, Monica Colombo, Giovanna Cutrona, Franco Fais, et Manlio Ferrarini. 2022. « Old and New Facts and Speculations on the Role of the B Cell Receptor in the Origin of Chronic Lymphocytic Leukemia ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (22): 14249. <https://doi.org/10.3390/ijms232214249>.
- Bartholdy, Boris A., Xiahoua Wang, Xiao-Jie Yan, Marién Pascual, Manxia Fan, Jacqueline Barrientos, Steven L. Allen, et al. 2020. « CLL intraclonal fractions exhibit established and recently acquired patterns of DNA methylation ». *Blood Advances* 4 (5): 893-905. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000817>.
- Bashford-Rogers, Rachael J.M., Anne L. Palser, Clare Hodgkinson, Joanna Baxter, George A. Follows, George S. Vassiliou, et Paul Kellam. 2017. « Dynamic variation of CD5 surface

- expression levels within individual chronic lymphocytic leukemia clones ». *Experimental Hematology* 46 (février):31-37.e10. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.09.010>.
- Berland, Robert, et Henry H. Wortis. 2002. « Origins and Functions of B-1 Cells with Notes on the Role of CD5 ». *Annual Review of Immunology* 20:253-300. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833>.
- Beyer, Marc, Matthias Kochanek, Kamruz Darabi, Alexey Popov, Markus Jensen, Elmar Endl, Percy A. Knolle, 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 (6): 2018-25. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0642>.
- Binder, Mascha, Fabian Müller, Mareike Frick, Claudia Wehr, Frédéric Simon, Bernd Leistler, Hendrik Veelken, Roland Mertelsmann, et Martin Trepel. 2013. « CLL B-cell receptors can recognize themselves: alternative epitopes and structural clues for autostimulatory mechanisms in CLL ». *Blood* 121 (1): 239-41. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-454439>.
- Bjarnadóttir, Kristbjörg, Mahdia Benkhoucha, Doron Merkler, Martin S. Weber, Natalie L. Payne, Claude C. A. Bernard, Nicolas Molnarfi, et Patrice H. Lalive. 2016. « B Cell-Derived Transforming Growth Factor-B1 Expression Limits the Induction Phase of Autoimmune Neuroinflammation ». *Scientific Reports* 6 (1): 34594. <https://doi.org/10.1038/srep34594>.
- Blair, Paul A., Lina Yassin Noreña, Fabian Flores-Borja, David J. Rawlings, David A. Isenberg, Michael R. Ehrenstein, et Claudia Mauri. 2010. « CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients ». *Immunity* 32 (1): 129-40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>.
- Blumenfeld-Kan, Shiri, Elsebeth Staun-Ram, et Ariel Miller. 2019. « Fingolimod Reduces CXCR4-Mediated B Cell Migration and Induces Regulatory B Cells-Mediated Anti-Inflammatory Immune Repertoire ». *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 34 (septembre):29-37. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.06.016>.
- Bonovas, Stefanos, Georgios Nikolopoulos, et Nikolaos M. Sitaras. 2013. « Statins and Reduced Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis C Virus Infection: Further Evidence Is Warranted ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (32): 4160. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9208>.
- Borche, L, A Lim, JL Binet, et G Dighiero. 1990. « Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies ». *Blood* 76 (3): 562-69. <https://doi.org/10.1182/blood.V76.3.562.562>.
- Bozkurt, Biykem, Douglas L. Mann, et Anita Deswal. 2010. « Biomarkers of Inflammation in Heart Failure ». *Heart Failure Reviews* 15 (4): 331-41. <https://doi.org/10.1007/s10741-009-9140-3>.
- Brändlein, Stephanie, Tina Pohle, Nele Ruoff, Ewa Wozniak, Hans-Konrad Müller-Hermelink, et H. Peter Vollmers. 2003. « Natural IgM Antibodies and Immunosurveillance Mechanisms against Epithelial Cancer Cells in Humans ». *Cancer Research* 63 (22): 7995-8005.
- Burger, Jan A., et Thomas J. Kipps. 2006. « CXCR4: A Key Receptor in the Crosstalk between Tumor Cells and Their Microenvironment ». *Blood* 107 (5): 1761-67. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3182>.
- Burger, Jan A., Maite P. Quiroga, Elena Hartmann, Andrea Bürkle, William G. Wierda, Michael J. Keating, et Andreas Rosenwald. 2009. « High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation ». *Blood* 113 (13): 3050-58. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170415>.

- Burger, Jan A., et Adrian Wiestner. 2018. « Targeting B Cell Receptor Signalling in Cancer: Preclinical and Clinical Advances ». *Nature Reviews Cancer* 18 (3): 148-67. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.121>.
- Burgueño-Bucio, Erica, Carlos A Mier-Aguilar, et Gloria Soldevila. 2019. « The Multiple Faces of CD5 ». *Journal of Leukocyte Biology* 105 (5): 891-904. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0618-226R>.
- Bystrom, Jonas, Taher E. Taher, Sian M. Henson, David J. Gould, et Rizgar A. Mageed. 2022. « Metabolic requirements of Th17 cells and of B cells: Regulation and defects in health and in inflammatory diseases ». *Frontiers in Immunology* 13 (octobre):990794. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.990794>.
- Calin, George Adrian, Calin Dan Dumitru, Masayoshi Shimizu, Roberta Bichi, Simona Zupo, Evan Noch, Hansjuerg Aldler, et al. 2002. « Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (24): 15524-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>.
- Calissano, Carlo, Rajendra N. Damle, Sonia Marsilio, Xiao-Jie Yan, Sophia Yancopoulos, Gregory Hayes, Claire Emson, et al. 2011. « Intracloal Complexity in Chronic Lymphocytic Leukemia: Fractions Enriched in Recently Born/Divided and Older/Quiescent Cells ». *Molecular Medicine* 17 (11): 1374-82. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00360>.
- Carnero-Montoro, E., L. Bonet, J. Engelken, T. Bielig, M. Martinez-Florensa, F. Lozano, et E. Bosch. 2012. « Evolutionary and Functional Evidence for Positive Selection at the Human CD5 Immune Receptor Gene ». *Molecular Biology and Evolution* 29 (2): 811-23. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr251>.
- Cenit, Maria Carmen, Mario Martínez-Florensa, Marta Consuegra, Lizette Bonet, Elena Carnero-Montoro, Noelia Armiger, Miguel Caballero-Baños, et al. 2014. « Analysis of Ancestral and Functionally Relevant CD5 Variants in Systemic Lupus Erythematosus Patients ». *PLOS ONE* 9 (11): e113090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113090>.
- Chao, Yangfa, Wenting Huang, Zhiheng Xu, Ping Li, et Shaodong Gu. 2023. « Effect of RUNX1/FOXP3 Axis on Apoptosis of T and B Lymphocytes and Immunosuppression in Sepsis ». *Open Medicine* 18 (1). <https://doi.org/10.1515/med-2023-0728>.
- Chen, Shih-Shih, Franak Batliwalla, Nichol E. Holodick, Xiao-Jie Yan, Sophia Yancopoulos, Carlo M. Croce, Thomas L. Rothstein, et Nicholas Chiorazzi. 2013. « Autoantigen Can Promote Progression to a More Aggressive TCL1 Leukemia by Selecting Variants with Enhanced B-Cell Receptor Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (16): E1500-1507. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300616110>.
- Chen, Zhifang, Yuejie Zhu, Rong Du, Nannan Pang, Fengbo Zhang, Di Dong, Jianbing Ding, et Yan Ding. 2019. « Role of Regulatory B Cells in the Progression of Cervical Cancer ». *Mediators of Inflammation* 2019 (juin):e6519427. <https://doi.org/10.1155/2019/6519427>.
- Chi, Xiyang, Yue Li, et Xiaoyan Qiu. 2020. « V(D)J Recombination, Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination of Immunoglobulins: Mechanism and Regulation ». *Immunology* 160 (3): 233-47. <https://doi.org/10.1111/imm.13176>.
- Chiorazzi, Nicholas, et Freda K. Stevenson. 2020. « Celebrating 20 Years of IGHV Mutation Analysis in CLL ». *HemaSphere* 4 (1): e334. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000334>.
- Clarke, Alexander J., Thomas Riffelmacher, Daniel Braas, Richard J. Cornall, et Anna Katharina Simon. 2018. « B1a B Cells Require Autophagy for Metabolic Homeostasis and Self-Renewal ». *Journal of Experimental Medicine* 215 (2): 399-413. <https://doi.org/10.1084/jem.20170771>.

- Côrte-Real, J., N. Duarte, L. Tavares, et C. Penha-Gonçalves. 2012. « Innate Stimulation of B1a Cells Enhances the Autoreactive IgM Repertoire in the NOD Mouse: Implications for Type 1 Diabetes ». *Diabetologia* 55 (6): 1761-72. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2498-0>.
- Coussens, Lisa M., et Zena Werb. 2002. « Inflammation and Cancer ». *Nature* 420 (6917): 860-67. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.
- Crusz, Shanthini M., et Frances R. Balkwill. 2015. « Inflammation and Cancer: Advances and New Agents ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 12 (10): 584-96. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.105>.
- Cuthill, Kirsty M., Yan Zhang, Andrea Pepper, Lies Boelen, Eve Coulter, Becca Asquith, Stephen Devereux, et Derek C. Macallan. 2022. « Identification of Proliferative and Non-Proliferative Subpopulations of Leukemic Cells in CLL ». *Leukemia* 36 (9): 2233-41. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01656-4>.
- Cutrona, G., S. Matis, M. Colombo, C. Massucco, G. Baio, F. Valdora, L. Emionite, et al. 2017. « Effects of MiRNA-15 and MiRNA-16 Expression Replacement in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implication for Therapy ». *Leukemia* 31 (9): 1894-1904. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.394>.
- Cuzick, Jack, Florian Otto, John A. Baron, Powel H. Brown, John Burn, Peter Greenwald, Janusz Jankowski, et al. 2009. « Aspirin and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs for Cancer Prevention: An International Consensus Statement ». *The Lancet. Oncology* 10 (5): 501-7. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70035-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70035-X).
- Daïen, Claire I., Sarah Gailhac, Thibault Mura, Rachel Audo, Bernard Combe, Michael Hahne, et Jacques Morel. 2014. « Regulatory B10 Cells Are Decreased in Patients With Rheumatoid Arthritis and Are Inversely Correlated With Disease Activity ». *Arthritis & Rheumatology* 66 (8): 2037-46. <https://doi.org/10.1002/art.38666>.
- Dalloul, Ali. 2009. « CD5: A Safeguard against Autoimmunity and a Shield for Cancer Cells ». *Autoimmunity Reviews* 8 (4): 349-53. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.11.007>.
- Damm, Frederik, Elena Mylonas, Adrien Cosson, Kenichi Yoshida, Véronique Della Valle, Enguerran Mouly, M'boyba Diop, et al. 2014. « Acquired Initiating Mutations in Early Hematopoietic Cells of CLL Patients ». *Cancer Discovery* 4 (9): 1088-1101. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0104>.
- Das, Shipra, et Dafna Bar-Sagi. 2019. « BTK Signaling Drives CD1dhiCD5+ Regulatory B-Cell Differentiation to Promote Pancreatic Carcinogenesis ». *Oncogene* 38 (17): 3316-24. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0668-3>.
- Datta, Moumita, et Hassan Jumaa. 2022. « Immunoglobulin Gene Sequence as an Inherited and Acquired Risk Factor for Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Cancers* 14 (13): 3045. <https://doi.org/10.3390/cancers14133045>.
- De Rosa, Veronica, Mario Galgani, Antonio Porcellini, Alessandra Colamatteo, Marianna Santopaolo, Candida Zuchegna, Antonella Romano, et al. 2015. « Glycolysis Controls the Induction of Human Regulatory T Cells by Modulating the Expression of FOXP3 Exon 2 Splicing Variants ». *Nature Immunology* 16 (11): 1174-84. <https://doi.org/10.1038/ni.3269>.
- Delgado, Julio, Torsten Biebig, Lizette Bonet, Elena Carnero-Montoro, Xose S. Puente, Dolors Colomer, Elena Bosch, Elias Campo, et Francisco Lozano. 2017. « Impact of the Functional CD5 Polymorphism A471V on the Response of Chronic Lymphocytic Leukaemia to Conventional Chemotherapy Regimens ». *British Journal of Haematology* 177 (1): 147-50. <https://doi.org/10.1111/bjh.14037>.
- DeMaio, Alexa, Shikhar Mehrotra, Kumar Sambamurti, et Shahid Husain. 2022. « The role of the adaptive immune system and T cell dysfunction in neurodegenerative diseases ». *Journal of Neuroinflammation* 19 (1): 251. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02605-9>.
- Descatoire, Marc, Sandra Weller, Sabine Irtan, Sabine Sarnacki, Jean Feuillard, Sébastien Storck, Anne Guiochon-Mantel, et al. 2014. « Identification of a human splenic marginal

- zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties ». *Journal of Experimental Medicine* 211 (5): 987-1000. <https://doi.org/10.1084/jem.20132203>.
- Ding, Yun-Gang, Guo Chen, Qian Li, Xiao-Feng Wen, Lai Wei, et Hua-Sheng Yang. 2018. « Frequency of IL-10-Producing Regulatory B Cells Associated with Disease Activity in Thyroid-Associated Orbitopathy ». *International Journal of Ophthalmology* 11 (9): 1458. <https://doi.org/10.18240/ijo.2018.09.05>.
- Dobrzanski, Mark J. 2013. « Expanding Roles for CD4 T Cells and Their Subpopulations in Tumor Immunity and Therapy ». *Frontiers in Oncology* 3 (mars):63. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00063>.
- Dondi, Elisabetta, et Nadine Varin-Blank. 2022. « The strange case of nurse cells: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? » *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, novembre, 48-58.
- Efremov, Dimitar G., Stefania Gobessi, et Pablo G. Longo. 2007. « Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells ». *Autoimmunity Reviews*, B Cell Targeted Therapies, 7 (2): 102-8. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2007.02.021>.
- Fabbri, Giulia, et Riccardo Dalla-Favera. 2016. « The Molecular Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukaemia ». *Nature Reviews. Cancer* 16 (3): 145-62. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.8>.
- Fais, F., F. Ghiotto, S. Hashimoto, B. Sellars, A. Valetto, S. L. Allen, P. Schulman, et al. 1998. « Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Express Restricted Sets of Mutated and Unmutated Antigen Receptors ». *The Journal of Clinical Investigation* 102 (8): 1515-25. <https://doi.org/10.1172/JCI3009>.
- Falchi, Lorenzo, Michael J. Keating, Xuemei Wang, Catherine C. Coombs, Mark C. Lanasa, Sara Strom, William G. Wierda, et Alessandra Ferrajoli. 2013. « Clinical Characteristics, Response to Therapy, and Survival of African American Patients Diagnosed With Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Cancer* 119 (17): 3177-85. <https://doi.org/10.1002/cncr.28030>.
- Farmer, Jocelyn R., Hugues Allard-Chamard, Na Sun, Maimuna Ahmad, Alice Bertocchi, Vinay S. Mahajan, Toby Aicher, et al. 2019. « Induction of Metabolic Quiescence Defines the Transitional to Follicular B Cell Switch ». *Science Signaling* 12 (604): eaaw5573. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw5573>.
- Fazi, Claudia, Lydia Scarfò, Lorenza Pecciarini, Francesca Cottini, Antonis Dagklis, Agnieszka Janus, Anna Talarico, et al. 2011. « General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL ». *Blood* 118 (25): 6618-25. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-357251>.
- Filip, Agata A, Bogumiła Ciseł, Dorota Koczkodaj, Ewa Wąsik-Szczepanek, Tomasz Piersiak, et Anna Dmoszyńska. 2013. « Circulating Microenvironment of CLL: Are Nurse-like Cells Related to Tumor-Associated Macrophages ». *Blood Cells, Molecules & Diseases* 50 (4): 263-70. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.12.003>.
- Fillatreau, Simon. 2019. « Regulatory Functions of B Cells and Regulatory Plasma Cells ». *Biomedical Journal* 42 (4): 233-42. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.05.008>.
- Fischer Kirsten, Al-Sawaf Othman, Bahlo Jasmin, Fink Anna-Maria, Tandon Maneesh, Dixon Mark, Robrecht Sandra, et al. 2019. « Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions ». *New England Journal of Medicine* 380 (23): 2225-36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1815281>.
- Förster, Irmgard, et Klaus Rajewsky. 1987. « Expansion and Functional Activity of Ly-1+ B Cells upon Transfer of Peritoneal Cells into Allotype-Congenic, Newborn Mice ». *European Journal of Immunology* 17 (4): 521-28. <https://doi.org/10.1002/eji.1830170414>.
- Freff, Jana, Kathrin Schwarte, Lisa Bröker, Judith Bühlmeier, Isabelle Kraft, Dana Öztürk, Anke Hinney, et al. 2021. « Alterations in B Cell Subsets Correlate with Body Composition

- Parameters in Female Adolescents with Anorexia Nervosa ». *Scientific Reports* 11 (1): 1125. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80693-4>.
- Friedman, Daniel, Drshika P Mehtani, Jennifer B Vidler, Piers Em Patten, et Robbert Hoogeboom. 2023. « Proliferating CLL Cells Express High Levels of CXCR4 and CD5 ». Preprint. *Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.12.27.573410>.
- Friedman, Daphne R., Eross Guadalupe, Alicia Volkheimer, Joseph O. Moore, et J. Brice Weinberg. 2018. « Clinical outcomes in chronic lymphocytic leukaemia associated with expression of CD5, a negative regulator of B-cell receptor signalling ». *British journal of haematology* 183 (5): 747-54. <https://doi.org/10.1111/bjh.15632>.
- Furusawa, Yukihiro, Yuuki Obata, Shinji Fukuda, Takaho A. Endo, Gaku Nakato, Daisuke Takahashi, Yumiko Nakanishi, et al. 2013. « Commensal Microbe-Derived Butyrate Induces the Differentiation of Colonic Regulatory T Cells ». *Nature* 504 (7480): 446-50. <https://doi.org/10.1038/nature12721>.
- Futei, Yuko, Masayuki Amagai, Takashi Hashimoto, et Takeji Nishikawa. 2003. « Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 49 (6): 1023-28. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(03\)02160-1](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(03)02160-1).
- Fuxa, Martin, Jane Skok, Abdallah Souabni, Giorgia Salvagiotto, Esther Roldan, et Meinrad Busslinger. 2004. « Pax5 Induces V-to-DJ Rearrangements and Locus Contraction of the Immunoglobulin Heavy-Chain Gene ». *Genes & Development* 18 (4): 411-22. <https://doi.org/10.1101/gad.291504>.
- Ganghammer, Sylvia, Julia Gutjahr, Evelyn Hutterer, Peter W. Krenn, Susanne Pucher, Claudia Zelle-Rieser, Karin Jöhrer, et al. 2016. « Combined CXCR3/CXCR4 Measurements Are of High Prognostic Value in Chronic Lymphocytic Leukemia Due to Negative Co-Operativity of the Receptors ». *Haematologica* 101 (3): e99-102. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.133470>.
- Garaud, Soizic, Ahsen Morva, Sébastien Lemoine, Sophie Hillion, Anne Bordron, Jacques-Olivier Pers, Christian Berthou, Rizgar A. Mageed, Yves Renaudineau, et Pierre Youinou. 2011. « CD5 Promotes IL-10 Production in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells through STAT3 and NFAT2 Activation ». *The Journal of Immunology* 186 (8): 4835-44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003050>.
- Garaud, Soizic, Taher E Taher, Marjolaine Debant, Miguel Burgos, Sarra Melayah, Christian Berthou, Kaushal Parikh, et al. 2018. « CD5 expression promotes IL-10 production through activation of the MAPK/Erk pathway and upregulation of TRPC1 channels in B lymphocytes ». *Cellular and Molecular Immunology* 15 (2): 158-70. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.42>.
- Gargiulo, Ernesto, Elodie Viry, Pablo Elías Morande, Anne Largeot, Susanne Gonder, Feng Xian, Nikolaos Ioannou, et al. 2023. « Extracellular Vesicle Secretion by Leukemia Cells In Vivo Promotes CLL Progression by Hampering Antitumor T-Cell Responses ». *Blood Cancer Discovery* 4 (1): 54-77. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-22-0029>.
- Gary-Gouy, Hélène, Julie Harriague, Georges Bismuth, Cornelia Platzer, Christian Schmitt, et Ali H. Dalloul. 2002. « Human CD5 Promotes B-Cell Survival through Stimulation of Autocrine IL-10 Production ». *Blood* 100 (13): 4537-43. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1525>.
- Gary-Gouy, Hélène, Julie Harriague, Ali Dalloul, Emmanuel Donnadieu, et Georges Bismuth. 2002. « CD5-Negative Regulation of B Cell Receptor Signaling Pathways Originates from Tyrosine Residue Y429 Outside an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (1): 232-39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.232>.
- Gary-Gouy, Hélène, Alexander Sainz-Perez, Jean-Brice Marteau, Anne Marfaing-Koka, Jozo Delic, Hélène Merle-Beral, Pierre Galanaud, et Ali Dalloul. 2007. « Natural Phosphorylation of CD5 in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells and Analysis of CD5-

- Regulated Genes in a B Cell Line Suggest a Role for CD5 in Malignant Phenotype1 ». *The Journal of Immunology* 179 (7): 4335-44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4335>.
- Georgiev, Peter, Louis-Marie Charbonnier, et Talal A. Chatila. 2019. « Regulatory T Cells: The Many Faces of Foxp3 ». *Journal of Clinical Immunology* 39 (7): 623-40. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00684-7>.
- Ghosn, Eliver Eid Bou, et Yang Yang. 2015. « Hematopoietic Stem Cell-Independent B-1a Lineage ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1362 (décembre):23-38. <https://doi.org/10.1111/nyas.12881>.
- Giannoni, Paolo, Gabriella Pietra, Giorgia Travaini, Rodolfo Quarto, Genti Shyti, Roberto Benelli, Laura Ottaggio, 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 (6): 1078-87. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.091405>.
- Glass, Christopher K., Kaoru Saijo, Beate Winner, Maria Carolina Marchetto, et Fred H. Gage. 2010. « Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration ». *Cell* 140 (6): 918-34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>.
- Gomes, Ana Cordeiro, Takahiro Hara, Vivian Y. Lim, Dietmar Herndler-Brandstetter, Erin Nevius, Tatsuki Sugiyama, Shizue Tani-ichi, et al. 2016. « Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation ». *Immunity* 45 (6): 1219-31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.11.004>.
- Gomes de Castro, Maria Angela, Hanna Wildhagen, Shama Sograte-Idrissi, Christoffer Hitzing, Mascha Binder, Martin Trepel, Niklas Engels, et Felipe Opazo. 2019. « Differential Organization of Tonic and Chronic B Cell Antigen Receptors in the Plasma Membrane ». *Nature Communications* 10 (1): 820. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08677-1>.
- Goral, Agnieszka, Marta Sledz, Aneta Manda-Handzlik, Adrianna Cieloch, Alicja Wojciechowska, Mieszko Lachota, Agnieszka Mroczek, et al. 2023. « Regulatory T cells contribute to the immunosuppressive phenotype of neutrophils in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia ». *Experimental Hematology & Oncology* 12 (1): 89. <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00452-9>.
- Graf, Robin, Jane Seagal, Kevin L. Otipoby, Kong-Peng Lam, Salah Ayoub, Baochun Zhang, Sandrine Sander, Van Trung Chu, et Klaus Rajewsky. 2019. « BCR-Dependent Lineage Plasticity in Mature B Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 363 (6428): 748-53. <https://doi.org/10.1126/science.aau8475>.
- Gray, M., K. Miles, D. Salter, D. Gray, et J. Savill. 2007. « Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (35): 14080-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700326104>.
- Griffin, Daniel O., Nichol E. Holodick, et Thomas L. Rothstein. 2011. « Human B1 Cells in Umbilical Cord and Adult Peripheral Blood Express the Novel Phenotype CD20+CD27+CD43+CD70- ». *Journal of Experimental Medicine* 208 (1): 67-80. <https://doi.org/10.1084/jem.20101499>.
- Grubczak, Kamil, Aleksandra Starosz, Karolina Stożek, Filip Bossowski, Marcin Moniuszko, et Artur Bossowski. 2021. « Regulatory B Cells Involvement in Autoimmune Phenomena Occurring in Pediatric Graves' Disease Patients ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (20): 10926. <https://doi.org/10.3390/ijms222010926>.
- Guan, Honggeng, Yang Lan, Yuqiu Wan, Qin Wang, Cheng Wang, Longjiang Xu, Yongjing Chen, et al. 2016. « PD-L1 mediated the differentiation of tumor-infiltrating CD19+ B lymphocytes and T cells in Invasive breast cancer ». *Oncolmmunology* 5 (2): e1075112. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1075112>.
- Gupta, Sanjeev Kumar, David S. Viswanatha, et Keyur P. Patel. 2020. « Evaluation of Somatic Hypermutation Status in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) in the Era of Next

- Generation Sequencing ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00357>.
- Haderk, Franziska, Ralph Schulz, Murat Iskar, Laura Llaó Cid, Thomas Worst, Karolin V. Willmund, Angela Schulz, et al. 2017. « Tumor-Derived Exosomes Modulate PD-L1 Expression in Monocytes ». *Science Immunology* 2 (13): eaah5509. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aah5509>.
- Hamblin, T. J., Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier, et F. K. Stevenson. 1999. « Unmutated Ig V(H) Genes Are Associated with a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Blood* 94 (6): 1848-54.
- Hardy, R. R., et K. Hayakawa. 1994. « CD5 B Cells, a Fetal B Cell Lineage ». *Advances in Immunology* 55:297-339. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60512-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60512-x).
- Hasan, Md Mahmudul, LuAnn Thompson-Snipes, Goran Klintmalm, Anthony J. Demetris, Jacqueline O'Leary, SangKon Oh, et HyeMee Joo. 2019. « CD24hiCD38hi and CD24hiCD27+ Human Regulatory B Cells Display Common and Distinct Functional Characteristics ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 203 (8): 2110-20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900488>.
- Hayakawa, K, A M Formica, M J Colombo, S A Shinton, J Brill-Dashoff, H C Morse Iii, Y-S Li, et R R Hardy. 2016. « Loss of a Chromosomal Region with Synteny to Human 13q14 Occurs in Mouse Chronic Lymphocytic Leukemia That Originates from Early-Generated B-1 B Cells ». *Leukemia* 30 (7): 1510-19. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.61>.
- Hayakawa, K., R. R. Hardy, L. A. Herzenberg, et L. A. Herzenberg. 1985. « Progenitors for Ly-1 B Cells Are Distinct from Progenitors for Other B Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 161 (6): 1554-68. <https://doi.org/10.1084/jem.161.6.1554>.
- Hayakawa, K., R. R. Hardy, M. Honda, L. A. Herzenberg, A. D. Steinberg, et L. A. Herzenberg. 1984. « Ly-1 B Cells: Functionally Distinct Lymphocytes That Secrete IgM Autoantibodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (8): 2494-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.8.2494>.
- Hayakawa, Kyoko, Anthony M. Formica, Joni Brill-Dashoff, Susan A. Shinton, Daiju Ichikawa, Yan Zhou, Herbert C. Morse III, et Richard R. Hardy. 2016. « Early generated B1 B cells with restricted BCRs become chronic lymphocytic leukemia with continued c-Myc and low Bmf expression ». *Journal of Experimental Medicine* 213 (13): 3007-24. <https://doi.org/10.1084/jem.20160712>.
- He, Mingyu, Kate Roussak, Feiyang Ma, Nicholas Borchering, Vince Garin, Mike White, Charles Schutt, et al. 2023. « CD5 expression by dendritic cells directs T cell immunity and sustains immunotherapy responses ». *Science (New York, N.Y.)* 379 (6633): eabg2752. <https://doi.org/10.1126/science.abg2752>.
- Hébert, Vivien, Marie Petit, Maud Maho-Vaillant, Marie-Laure Golinski, Gaëtan Riou, Céline Derambure, Olivier Boyer, Pascal Joly, et Sébastien Calbo. 2019. « Modifications of the Transcriptomic Profile of Autoreactive B Cells From Pemphigus Patients After Treatment With Rituximab or a Standard Corticosteroid Regimen ». *Frontiers in Immunology* 10:1794. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01794>.
- Hengeveld, Paul J., Mark-David Levin, P. Martijn Klijn, et Anton W. Langerak. 2021. « Reading the B-cell receptor immunome in chronic lymphocytic leukemia: revelations and applications ». *Experimental Hematology* 93 (janvier):14-24. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.09.194>.
- Herishanu, Yair, Patricia Pérez-Galán, Delong Liu, Angélique Biancotto, Stefania Pittaluga, Berengere Vire, Federica Gibellini, et al. 2011. « The Lymph Node Microenvironment Promotes B-Cell Receptor Signaling, NF-KappaB Activation, and Tumor Proliferation in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Blood* 117 (2): 563-74. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284984>.
- Hoogeboom, Robbert, Kok P.M. van Kessel, Frans Hochstenbach, Thera A. Wormhoudt, Roy J.A. Reinten, Koen Wagner, Arnon P. Kater, Jeroen E.J. Guikema, Richard J. Bende, et Carel

- J.M. van Noesel. 2013. « A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi ». *Journal of Experimental Medicine* 210 (1): 59-70. <https://doi.org/10.1084/jem.20121801>.
- Horii, Motoki, et Takashi Matsushita. 2021. « Regulatory B Cells and T Cell Regulation in Cancer ». *Journal of Molecular Biology*, B cell subsets and mechanisms involved in immune regulation in health and disease, 433 (1): 166685. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.019>.
- Horikawa, Mayuka, Veronique Minard-Colin, Takashi Matsushita, et Thomas F. Tedder. 2011. « Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (11): 4268-80. <https://doi.org/10.1172/JCI59266>.
- Howe, Louise R., Kotha Subbaramaiah, Clifford A. Hudis, et Andrew J. Dannenberg. 2013. « Molecular Pathways: Adipose Inflammation as a Mediator of Obesity-Associated Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (22): 6074-83. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2603>.
- Hwang, Eun Sook, Susanne J. Szabo, Pamela L. Schwartzberg, et Laurie H. Glimcher. 2005. « T Helper Cell Fate Specified by Kinase-Mediated Interaction of T-Bet with GATA-3 ». *Science* 307 (5708): 430-33. <https://doi.org/10.1126/science.1103336>.
- Hystad, Marit E., June H. Myklebust, Trond H. Bø, Einar A. Sivertsen, Edith Rian, Lise Forfang, Else Munthe, et al. 2007. « Characterization of Early Stages of Human B Cell Development by Gene Expression Profiling ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (6): 3662-71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3662>.
- Igarashi, Hideya, Sophia C. Gregory, Takafumi Yokota, Nobuo Sakaguchi, et Paul W. Kincade. 2002. « Transcription from the RAG1 Locus Marks the Earliest Lymphocyte Progenitors in Bone Marrow ». *Immunity* 17 (2): 117-30. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00366-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00366-7).
- Jackson-Jones, Lucy H, et Cécile Bénézech. 2018. « Control of innate-like B cell location for compartmentalised IgM production ». *Current Opinion in Immunology*, Innate immunity 2018, 50 (février):9-13. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.10.006>.
- Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. 2014. « Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes ». *The New England Journal of Medicine* 371 (26): 2488-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>.
- Jebaraj, Billy Michael Chelliah, et Stephan Stilgenbauer. 2021. « Telomere Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Frontiers in Oncology* 10 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.612665>.
- Jeske, Sandra S., Matthias Brand, Andreas Ziebart, Simon Laban, Johannes Doescher, Jens Greve, Edwin K. Jackson, Thomas K. Hoffmann, Cornelia Brunner, et Patrick J. Schuler. 2020. « Adenosine-Producing Regulatory B Cells in Head and Neck Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 69 (7): 1205-16. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02535-6>.
- Jiricny, J. 2013. « Postreplicative Mismatch Repair ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): a012633-a012633. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012633>.
- Jones, Katelyn, Anca F. Savulescu, Frank Brombacher, et Sabelo Hadebe. 2020. « Immunoglobulin M in Health and Diseases: How Far Have We Come and What Next? ». *Frontiers in Immunology* 11 (octobre):595535. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.595535>.
- Karmali, Reem, Laura A Paganessi, Robin R Frank, Sucheta Jagan, Melissa L Larson, Parameswaran Venugopal, Stephanie A Gregory, et Kent W Christopherson. 2013. « Aggressive Disease Defined by Cytogenetics Is Associated with Cytokine Dysregulation in CLL/SLL Patients ». *Journal of Leukocyte Biology* 93 (1): 161-70. <https://doi.org/10.1189/jlb.0612301>.

- Kawanishi, Shosuke, Shiho Ohnishi, Ning Ma, Yusuke Hiraku, et Mariko Murata. 2017. « Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (8): 1808. <https://doi.org/10.3390/ijms18081808>.
- Kawari, Mohammed, Mahmood Akhtar, Mohamed Sager, Zakaria Basbous, Ibrahim Baydoun, Juma Kabanja, Mohammed Darweesh, et al. 2019. « Alterations of Gut Microbiome in Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL); Future Therapeutic Potentials ». *Blood* 134 (novembre):5455. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-121643>.
- Kerfoot, Steven M., Gur Yaari, Jaymin R. Patel, Kody L. Johnson, David G. Gonzalez, Steven H. Kleinstein, et Ann M. Haberman. 2011. « Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Development Initiates in the Interfollicular Zone ». *Immunity* 34 (6): 947-60. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.024>.
- Kersh, Anna E., et Ron J. Feldman. 2018. « Autoimmune Sequelae Following Rituximab Therapy: A Review of the Literature and Potential Immunologic Mechanisms ». *Journal of Clinical Rheumatology: Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases* 24 (8): 427-35. <https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000000756>.
- Kikushige, Yoshikane. 2020. « Pathophysiology of Chronic Lymphocytic Leukemia and Human B1 Cell Development ». *International Journal of Hematology* 111 (5): 634-41. <https://doi.org/10.1007/s12185-019-02788-7>.
- Kikushige, Yoshikane, Fumihiko Ishikawa, Toshihiro Miyamoto, Takahiro Shima, Shingo Urata, Goichi Yoshimoto, Yasuo Mori, et al. 2011. « Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Cancer Cell* 20 (2): 246-59. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.029>.
- Kikushige, Yoshikane, et Toshihiro Miyamoto. 2014. « Hematopoietic Stem Cell Aging and Chronic Lymphocytic Leukemia Pathogenesis ». *International Journal of Hematology* 100 (4): 335-40. <https://doi.org/10.1007/s12185-014-1651-6>.
- Kipps, Thomas J., Freda K. Stevenson, Catherine J. Wu, Carlo M. Croce, Graham Packham, William G. Wierda, Susan O'Brien, John Gribben, et Kanti Rai. 2017. « Chronic Lymphocytic Leukaemia ». *Nature Reviews Disease Primers* 3 (1): 16096. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.96>.
- Klinger, M., J. Zheng, K. S. J. Elenitoba-Johnson, S. L. Perkins, M. Faham, et D. W. Bahler. 2016. « Next-Generation IgVH Sequencing CLL-like Monoclonal B-Cell Lymphocytosis Reveals Frequent Oligoclonality and Ongoing Hypermutation ». *Leukemia* 30 (5): 1055-61. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.351>.
- Knippenberg, Stephanie, Evelyn Peelen, Joost Smolders, Mariëlle Thewissen, Paul Menheere, Jan Willem Cohen Tervaert, Raymond Hupperts, et Jan Damoiseaux. 2011. « Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission ». *Journal of Neuroimmunology* 239 (1): 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.08.019>.
- Kotb, Attia, Samia Ismail, Itoh Kimito, Waghi Mohamed, Alamery Salman, et Arif A. Mohammed. 2019. « Increased CD5+ B-cells are associated with autoimmune phenomena in lepromatous leprosy patients ». *Journal of Infection and Public Health* 12 (5): 656-59. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.03.001>.
- Kristiansen, Trine A., Elin Jaensson Gyllenbäck, Alya Zriwil, Tomas Björklund, Jeremy A. Daniel, Ewa Sitnicka, Shamit Soneji, David Bryder, et Joan Yuan. 2016. « Cellular Barcoding Links B-1a B Cell Potential to a Fetal Hematopoietic Stem Cell State at the Single-Cell Level ». *Immunity* 45 (2): 346-57. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.014>.
- Krokan, Hans E., et Magnar Bjørås. 2013. « Base Excision Repair ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>.
- Laissue, Paul. 2019. « The forkhead-box family of transcription factors: key molecular players in colorectal cancer pathogenesis ». *Molecular Cancer* 18 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0938-x>.

- Lam, Eric W.-F., Jan J. Brosens, Ana R. Gomes, et Chuay-Yeng Koo. 2013. « Forkhead Box Proteins: Tuning Forks for Transcriptional Harmony ». *Nature Reviews. Cancer* 13 (7): 482-95. <https://doi.org/10.1038/nrc3539>.
- Lanasa, M. C., S. D. Allgood, A. D. Volkheimer, J. P. Gockerman, J. F. Whitesides, B. K. Goodman, J. O. Moore, J. B. Weinberg, et M. C. Levesque. 2010. « Single-Cell Analysis Reveals Oligoclonality among 'Low-Count' Monoclonal B-Cell Lymphocytosis ». *Leukemia* 24 (1): 133-40. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.192>.
- Lanemo Myhrinder, Anna, Eva Hellqvist, Ekaterina Sidorova, Anita Söderberg, Helen Baxendale, Charlotte Dahle, Kerstin Willander, et al. 2008. « A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies ». *Blood* 111 (7): 3838-48. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-125450>.
- Lanham, Stuart, Terry Hamblin, David Oscier, Rachel Ibbotson, Freda Stevenson, et Graham Packham. 2003. « Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia ». *Blood* 101 (3): 1087-93. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1822>.
- Largeot, Anne, Vanessa Klapp, Elodie Viry, Susanne Gonder, Iria Fernandez Botana, Arnaud Blomme, Mohaned Benzarti, et al. 2023. « Inhibition of MYC translation through targeting of the newly identified PHB-eIF4F complex as a therapeutic strategy in CLL ». *Blood* 141 (26): 3166-83. <https://doi.org/10.1182/blood.2022017839>.
- Le Roy, Christine, Pierre-Antoine Deglesne, Nathalie Chevallier, Taoufik Beitar, Virginie Eclache, Maude Quettier, Marouane Boubaya, et al. 2012. « The Degree of BCR and NFAT Activation Predicts Clinical Outcomes in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Blood* 120 (2): 356-65. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-397158>.
- Lea, Nicholas C., Stephen J. Orr, Kai Stoeber, Gareth H. Williams, Eric W.-F. Lam, Mohammad A. Ibrahim, Ghulam J. Mufti, et N. Shaun B. Thomas. 2003. « Commitment Point during G0-->G1 That Controls Entry into the Cell Cycle ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (7): 2351-61. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.7.2351-2361.2003>.
- Lecomte, O., J. B. Bock, B. W. Birren, D. Vollrath, et J. R. Parnes. 1996. « Molecular Linkage of the Mouse CD5 and CD6 Genes ». *Immunogenetics* 44 (5): 385-90. <https://doi.org/10.1007/BF02602784>.
- Lee, Jisoo, Stefan Kuchen, Randy Fischer, Sooghee Chang, et Peter E. Lipsky. 2009. « Identification and Characterization of a Human CD5+ Pre-Naive B Cell Population1 ». *The Journal of Immunology* 182 (7): 4116-26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803391>.
- Lee, Robin D., Sarah A. Munro, Todd P. Knutson, Rebecca S. LaRue, Lynn M. Heltemes-Harris, et Michael A. Farrar. 2021. « Single-Cell Analysis Identifies Dynamic Gene Expression Networks That Govern B Cell Development and Transformation ». *Nature Communications* 12 (1): 6843. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27232-5>.
- Li, Wenli, Xiaolan Tian, Xin Lu, Qinglin Peng, Xiaoming Shu, Hanbo Yang, Yuanli Li, et al. 2016. « Significant Decrease in Peripheral Regulatory B Cells Is an Immunopathogenic Feature of Dermatomyositis ». *Scientific Reports* 6 (1): 27479. <https://doi.org/10.1038/srep27479>.
- Lin, Jiunn-Chang, Yung-Luen Shih, Pei-Ju Chien, Chien-Liang Liu, Jie-Jen Lee, Tsan-Pai Liu, Wen-Ching Ko, et Chwen-Ming Shih. 2010. « Increased percentage of B cells in patients with more advanced hepatocellular carcinoma* ». *Human Immunology* 71 (1): 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.10.003>.
- Lin, Wei, Lixia Jin, Hua Chen, Qingjun Wu, Yunyun Fei, Wenjie Zheng, Qian Wang, et al. 2014. « B cell subsets and dysfunction of regulatory B cells in IgG4-related diseases and primary Sjögren's syndrome: the similarities and differences ». *Arthritis Research & Therapy* 16 (3): R118. <https://doi.org/10.1186/ar4571>.
- Lindner, Stefanie, Karen Dahlke, Kai Sontheimer, Magdalena Hagn, Christof Kaltenmeier, Thomas F.E. Barth, Tamara Beyer, et al. 2013. « Interleukin 21-Induced Granzyme B-

- Expressing B Cells Infiltrate Tumors and Regulate T Cells ». *Cancer Research* 73 (8): 2468-79. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3450>.
- Liu, Zhi, Dong-Sung Lee, Yuqiong Liang, Ye Zheng, et Jesse R. Dixon. 2023. « Foxp3 Orchestrates Reorganization of Chromatin Architecture to Establish Regulatory T Cell Identity ». *Nature Communications* 14 (1): 6943. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42647-y>.
- Lu, Ling, Joseph Barbi, et Fan Pan. 2017. « The Regulation of Immune Tolerance by FOXP3 ». *Nature Reviews. Immunology* 17 (11): 703-17. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.75>.
- Lv, Ying, Hongtao Wang, et Zhuogang Liu. 2019. « The Role of Regulatory B Cells in Patients with Acute Myeloid Leukemia ». *Medical Science Monitor* 25 (avril):3026-31. <https://doi.org/10.12659/MSM.915556>.
- M, Di Ianni, Baldoni S, Del Papa B, Aureli P, Dorillo E, De Falco F, Albi E, et al. 2018. « NOTCH1 Is Aberrantly Activated in Chronic Lymphocytic Leukemia Hematopoietic Stem Cells ». *Frontiers in Oncology* 8 (avril). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00105>.
- Ma, Kongyang, Wenhan Du, Shiyun Wang, Fan Xiao, Jingyi Li, Jie Tian, Yida Xing, et al. 2023. « B1-Cell-Produced Anti-Phosphatidylserine Antibodies Contribute to Lupus Nephritis Development via TLR-Mediated Syk Activation ». *Cellular & Molecular Immunology* 20 (8): 881-94. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01049-2>.
- Mageed, Rizgar A., Soizic Garaud, Taher E. Taher, Kaushal Parikh, Jacques-Olivier Pers, Christophe Jamin, Yves Renaudineau, et Pierre Youinou. 2012. « CD5 Expression Promotes Multiple Intracellular Signaling Pathways in B Lymphocyte ». *Autoimmunity Reviews* 11 (11): 795-98. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.02.007>.
- Maity, Palash C., Mayas Bilal, Marvyn T. Koning, Marc Young, Cornelis A. M. van Bergen, Valerio Renna, Antonella Nicolò, et al. 2020. « IGLV3-21*01 is an inherited risk factor for CLL through the acquisition of a single-point mutation enabling autonomous BCR signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (8): 4320-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913810117>.
- Mantovani, Alberto, Paola Allavena, Antonio Sica, et Frances Balkwill. 2008. « Cancer-Related Inflammation ». *Nature* 454 (7203): 436-44. <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
- Manukyan, Gayane, Tomas Papajik, Zuzana Mikulkova, Renata Urbanova, Veronika Smotkova Kraiczova, Jakub Savara, Milos Kudelka, Peter Turcsanyi, et Eva Kriegova. 2020. « High CXCR3 on Leukemic Cells Distinguishes IgHV Mut from IgHV Unmut in Chronic Lymphocytic Leukemia: Evidence from CD5high and CD5low Clones ». *Journal of Immunology Research* 2020:7084268. <https://doi.org/10.1155/2020/7084268>.
- Märkl, Florian, Christoph Schultheiß, Murtaza Ali, Shih-Shih Chen, Marina Zintchenko, Lukas Egli, Juliane Mietz, et al. 2024. « Mutation-Specific CAR T Cells as Precision Therapy for IGLV3-21R110 Expressing High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Nature Communications* 15 (1): 993. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45378-w>.
- Marti, Gerald E., Andy C. Rawstron, Paolo Ghia, Peter Hillmen, Richard S. Houlston, Neil Kay, Thérèse A. Schleinitz, Neil Caporaso, et The International Familial CLL Consortium. 2005. « Diagnostic Criteria for Monoclonal B-Cell Lymphocytosis ». *British Journal of Haematology* 130 (3): 325-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x>.
- Maslanka, Jeffrey, Gretel Torres, Jennifer Londregan, Naomi Goldman, Daniel Silberman, John Somerville, et James E. Riggs. 2024. « Loss of B1 and Marginal Zone B Cells during Ovarian Cancer ». *Cellular Immunology* 395-396:104788. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2023.104788>.
- Matsumoto, Masanori, Akemi Baba, Takafumi Yokota, Hiroyoshi Nishikawa, Yasuyuki Ohkawa, Hisako Kayama, Axel Kallies, et al. 2014. « Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation ». *Immunity* 41 (6): 1040-51. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.016>.
- Matsumura, Yutaka, Rei Watanabe, et Manabu Fujimoto. 2023. « Suppressive mechanisms of regulatory B cells in mice and humans ». *International Immunology* 35 (2): 55-65. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxac048>.

- Matsushita, Takashi, Yasuhito Hamaguchi, Minoru Hasegawa, Kazuhiko Takehara, et Manabu Fujimoto. 2016. « Decreased Levels of Regulatory B Cells in Patients with Systemic Sclerosis: Association with Autoantibody Production and Disease Activity ». *Rheumatology (Oxford, England)* 55 (2): 263-67. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev331>.
- Matsushita, Takashi, Tadahiro Kobayashi, Kie Mizumaki, Miyu Kano, Tomoyo Sawada, Momoko Tennichi, Ai Okamura, et al. 2018. « BAFF inhibition attenuates fibrosis in scleroderma by modulating the regulatory and effector B cell balance ». *Science Advances* 4 (7): eaas9944. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aas9944>.
- Mavropoulos, Athanasios, Areti Varna, Efterpi Zafiriou, Christos Liaskos, Ioannis Alexiou, Aggeliki Roussaki-Schulze, Marianna Vlychou, Christina Katsiari, Dimitrios P. Bogdanos, et Lazaros I. Sakkas. 2017. « IL-10 producing Bregs are impaired in psoriatic arthritis and psoriasis and inversely correlate with IL-17- and IFN γ -producing T cells ». *Clinical Immunology*, Special issue: Immune regulation, 184 (novembre):33-41. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.04.010>.
- Mazzarello, Andrea N., Mark Fitch, Martina Cardillo, Anita Ng, Sabreen Bhuiya, Esha Sharma, Davide Bagnara, et al. 2023. « Characterization of the Intracloal Complexity of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells: Potential Influences of B-Cell Receptor Crosstalk with Other Stimuli ». *Cancers* 15 (19): 4706. <https://doi.org/10.3390/cancers15194706>.
- Mazzarello, Andrea Nicola, Brisejda Korovesi, Daniela Guardo, Lorella Lanza, Fabio Ghiotto, Silvia Bruno, et Enrico Cappelli. 2023. « Unexpected CD5+ B Cell Lymphocytosis during SARS-CoV-2 Infection: Relevance for the Pathophysiology of Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Journal of Clinical Medicine* 12 (3): 998. <https://doi.org/10.3390/jcm12030998>.
- McCaw, Tyler R., Serena Y. Lofftus, et Joseph G. Crompton. 2023. « Clonal Redemption of B Cells in Cancer ». *Frontiers in Immunology* 14 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1277597>.
- McGettigan, Shannon Eileen, Lazaro Emilio Aira, Gaurav Kumar, Romain Ballet, Eugene C. Butcher, Nicole Baumgarth, et Gudrun F. Debes. 2024. « Secreted IgM Modulates IL-10 Expression in B Cells ». *Nature Communications* 15 (1): 324. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44382-w>.
- Mékinian, Arsène, Anne Quinquenel, Koceïla Ait Belkacem, Feriel Kanoun, Elisabetta Dondi, Emilie Franck, Marouane Boubaya, et al. 2023. « Immuno-Regulatory Malignant B Cells Contribute to Chronic Lymphocytic Leukemia Progression ». *Cancer Gene Therapy* 30 (7): 1018-28. <https://doi.org/10.1038/s41417-023-00602-5>.
- Méndez-Flores, Silvia, Gabriela Hernández-Molina, Ana Bety Enríquez, David Faz-Muñoz, Yeraldin Esquivel, Carlos Pacheco-Molina, et Janette Furuzawa-Carballeda. 2016. « Cytokines and Effector/Regulatory Cells Characterization in the Physiopathology of Cutaneous Lupus Erythematosus: A Cross-Sectional Study ». *Mediators of Inflammation* 2016 (mars):e7074829. <https://doi.org/10.1155/2016/7074829>.
- Mendez-Frausto, G., G. Romero-Aguilera, R. Sanchez-Gutierrez, R. E. García-Jacobo, E. E. Lara-Ramírez, E. E. Uresti-Rivera, R. Gonzalez-Amaro, J. A. Enciso-Moreno, et M. H. García-Hernández. 2021. « B Regulatory Cells Associated with Changes in Biochemical and Inflammatory Parameters in Normal-Glycemic Individuals, Pre-Diabetes and T2DM Patients ». *Diabetes Research and Clinical Practice* 173 (mars). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.108692>.
- Menon, Madhvi, Paul A. Blair, David A. Isenberg, et Claudia Mauri. 2016. « A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus ». *Immunity* 44 (3): 683-97. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.012>.
- Mertowska, Paulina, Sebastian Mertowski, Martyna Podgajna, et Ewelina Grywalska. 2022. « The Importance of the Transcription Factor Foxp3 in the Development of Primary

- Immunodeficiencies ». *Journal of Clinical Medicine* 11 (4): 947.
<https://doi.org/10.3390/jcm11040947>.
- Michaud, Daniel, Colleen R Steward, Bhalchandra Mirlekar, et Yuliya Pylyayeva-Gupta. 2021. « Regulatory B cells in cancer ». *Immunological reviews* 299 (1): 74-92.
<https://doi.org/10.1111/imr.12939>.
- Minden, Marcus Dühren-von, Rudolf Übelhart, Dunja Schneider, Thomas Wossning, Martina P. Bach, Maike Buchner, Daniel Hofmann, et al. 2012. « Chronic Lymphocytic Leukaemia Is Driven by Antigen-Independent Cell-Autonomous Signalling ». *Nature* 489 (7415): 309-12. <https://doi.org/10.1038/nature11309>.
- Mirlekar, Bhalchandra, Daniel Michaud, Samuel J. Lee, Nancy P. Kren, Cameron Harris, Kevin Greene, Emily C. Goldman, et al. 2020. « B Cell-Derived IL35 Drives STAT3-Dependent CD8+ T-Cell Exclusion in Pancreatic Cancer ». *Cancer Immunology Research* 8 (3): 292-308. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0349>.
- Mohd Jaya, Fatin N., Sergio G. Garcia, Francesc E. Borràs, Godfrey C. F. Chan, et Marcella Franquesa. 2019. « Paradoxical Role of Breg-Inducing Cytokines in Autoimmune Diseases ». *Journal of Translational Autoimmunity* 2 (décembre):100011.
<https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2019.100011>.
- Mohr, Audrey, Yves Renaudineau, Cristina Bagacean, Jacques-Olivier Pers, Christophe Jamin, et Anne Bordron. 2016. « Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia ». *Oncoimmunology* 5 (5): e1132977.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1132977>.
- Morgan, Dhakshayani, et Vinay Tergaonkar. 2022. « Unraveling B cell trajectories at single cell resolution ». *Trends in Immunology* 43 (3): 210-29.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2022.01.003>.
- Muri, Jonathan, Helen Thut, Georg W. Bornkamm, et Manfred Kopf. 2019. « B1 and Marginal Zone B Cells but Not Follicular B2 Cells Require Gpx4 to Prevent Lipid Peroxidation and Ferroptosis ». *Cell Reports* 29 (9): 2731-2744.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.070>.
- Müschen, Markus. 2019. « Metabolic Gatekeepers to Safeguard against Autoimmunity and Oncogenic B Cell Transformation ». *Nature Reviews Immunology* 19 (5): 337-48.
<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0154-3>.
- Neu, Savannah D., et Bonnie N. Dittel. 2021. « Characterization of Definitive Regulatory B Cell Subsets by Cell Surface Phenotype, Function and Context ». *Frontiers in Immunology* 12.
<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.787464>.
- Neves, Patricia, Vicky Lampropoulou, Elisabeth Calderon-Gomez, Toralf Roch, Ulrik Stervbo, Ping Shen, Anja A. Köhl, et al. 2010. « Signaling via the MyD88 Adaptor Protein in B Cells Suppresses Protective Immunity during Salmonella Typhimurium Infection ». *Immunity* 33 (5): 777-90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.016>.
- Ng, Anita, et Nicholas Chiorazzi. 2021. « Potential Relevance of B-cell Maturation Pathways in Defining the Cell(s) of Origin for Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Hematology/Oncology Clinics of North America*, Chronic Lymphocytic Leukemia, 35 (4): 665-85. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.03.002>.
- Nh, Jones, Clabby ML, Dialynas Dp, Huang Hj, Herzenberg La, et Strominger JL. 1986. « Isolation of Complementary DNA Clones Encoding the Human Lymphocyte Glycoprotein T1/Leu-1 ». *Nature* 323 (6086). <https://doi.org/10.1038/323346a0>.
- Nieto, Wendy G., Julia Almeida, Alfonso Romero, Cristina Teodosio, Antonio López, Ana F. Henriques, Maria Luz Sánchez, et al. 2009. « Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach ». *Blood* 114 (1): 33-37.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-197368>.

- Noh, Joonyong, Geunwoong Noh, Hyuk Soon Kim, A. -Ram Kim, et Wahn Soo Choi. 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 (1): 109-14. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.01.005>.
- Nouël, A., P. Pochard, Q. Simon, I. Ségalen, Y. Le Meur, J. O. Pers, et S. Hillion. 2015. « B-Cells Induce Regulatory T Cells through TGF- β /IDO Production in A CTLA-4 Dependent Manner ». *Journal of Autoimmunity* 59 (mai):53-60. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.02.004>.
- Packham, Graham, Serge Krysov, Alex Allen, Natalia Savelyeva, Andrew J. Steele, Francesco Forconi, et Freda K. Stevenson. 2014. « The Outcome of B-Cell Receptor Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Proliferation or Anergy ». *Haematologica* 99 (7): 1138-48. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.098384>.
- Paggetti, Jerome, Franziska Haderk, Martina Seiffert, Bassam Janji, Ute Distler, Wim Ammerlaan, Yeoun Jin Kim, et al. 2015. « Exosomes Released by Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Induce the Transition of Stromal Cells into Cancer-Associated Fibroblasts ». *Blood* 126 (9): 1106-17. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-618025>.
- Parekh, Vrajesh V., Durbaka V. R. Prasad, Pinaki P. Banerjee, Bimba N. Joshi, Anil Kumar, et Gyan C. Mishra. 2003. « B Cells Activated by Lipopolysaccharide, But Not By Anti-Ig and Anti-CD40 Antibody, Induce Anergy in CD8+ T Cells: Role of TGF- β 11 ». *The Journal of Immunology* 170 (12): 5897-5911. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.5897>.
- Park, Mi Kyung, Young Ok Jung, Seon-Yeong Lee, Seung Hoon Lee, Yu Jung Heo, Eun Kyung Kim, Hye Jwa Oh, et al. 2016. « Amelioration of autoimmune arthritis by adoptive transfer of Foxp3-expressing regulatory B cells is associated with the Treg/Th17 cell balance ». *Journal of Translational Medicine* 14 (1): 191. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0940-7>.
- Ponzoni, Maurilio, Claudio Doglioni, et Federico Caligaris-Cappio. 2011. « Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment ». *Seminars in Diagnostic Pathology, Seminars on Lymphomas, Part I*, 28 (2): 161-66. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2011.02.014>.
- Potter, Kathleen N., Paul Hobby, Susanne Klijn, Freda K. Stevenson, et Brian J. Sutton. 2002. « Evidence for Involvement of a Hydrophobic Patch in Framework Region 1 of Human V4-34-Encoded Igs in Recognition of the Red Blood Cell I Antigen ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (7): 3777-82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3777>.
- Poynter Jenny N., Gruber Stephen B., Higgins Peter D.R., Almog Ronit, Bonner Joseph D., Rennert Hedy S., Low Marcelo, Greenson Joel K., et Rennert Gad. 2005. « Statins and the Risk of Colorectal Cancer ». *New England Journal of Medicine* 352 (21): 2184-92. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043792>.
- Pozzo, Federico, Gabriela Forestieri, Giulia Ianna, Filippo Vit, Erika Tissino, Tamara Bittolo, Lodovico Terzi Di Bergamo, et al. 2022. « The CXCR4dim/CD5bright Proliferative Fraction Reappears in Relapsed CLL Under Ibrutinib, Enriched in BTK Mutations ». *Blood* 140 (Supplement 1): 4103-4. <https://doi.org/10.1182/blood-2022-159947>.
- Profyris, Christos, Christos Tziotziou, et Isabel Do Vale. 2012. « Cutaneous Scarring: Pathophysiology, Molecular Mechanisms, and Scar Reduction Therapeutics Part I. The Molecular Basis of Scar Formation ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 66 (1): 1-10; quiz 11-12. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.05.055>.
- Pylayeva-Gupta, Yuliya, Shipra Das, Jesse S. Handler, Cristina H. Hajdu, Maryaline Coffre, Sergei B. Koralov, et Dafna Bar-Sagi. 2016. « IL35-Producing B Cells Promote the Development of Pancreatic Neoplasia ». *Cancer Discovery* 6 (3): 247-55. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0843>.
- Qian, Li, Guang-Rong Bian, Yan Zhou, Yan Wang, Juan Hu, Xia Liu, et Yan Xu. 2015. « Short Communication
Clinical Significance of Regulatory B Cells in the Peripheral Blood of

- Patients with Oesophageal Cancer ». *Central European Journal of Immunology* 40 (2): 263-65. <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.52840>.
- Quentmeier, Hilmar, Claudia Pommerenke, Ole Ammerpohl, Robert Geffers, Vivien Hauer, Roderick AF MacLeod, Stefan Nagel, et al. 2016. « Subclones in B-Lymphoma Cell Lines: Isogenic Models for the Study of Gene Regulation ». *Oncotarget* 7 (39): 63456-65. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11524>.
- Quijada-Álamo, Miguel, María Hernández-Sánchez, Cristina Robledo, Jesús-María Hernández-Sánchez, Rocío Benito, Adrián Montaña, Ana E. Rodríguez-Vicente, et al. 2017. « Next-generation sequencing and FISH studies reveal the appearance of gene mutations and chromosomal abnormalities in hematopoietic progenitors in chronic lymphocytic leukemia ». *Journal of Hematology & Oncology* 10 (1): 83. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0450-y>.
- Rapino, Francesca, Sylvain Delaunay, Florian Rambow, Zhaoli Zhou, Lars Tharun, Pascal De Tullio, Olga Sin, et al. 2018. « Codon-Specific Translation Reprogramming Promotes Resistance to Targeted Therapy ». *Nature* 558 (7711): 605-9. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0243-7>.
- Raugh, Arielle, Denise Allard, et Maria Bettini. 2022. « Nature vs. nurture: FOXP3, genetics, and tissue environment shape Treg function ». *Frontiers in Immunology* 13. <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.911151>.
- Rawstron, Andy C., Aloysius Ssemaganda, Ruth de Tute, Chi Doughty, Darren Newton, Anna Vardi, Paul A. S. Evans, et al. 2017. « Monoclonal B-Cell Lymphocytosis in a Hospital-Based UK Population and a Rural Ugandan Population: A Cross-Sectional Study ». *The Lancet Haematology* 4 (7): e334-40. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(16\)30192-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(16)30192-2).
- Reiche, Edna Maria Vissoci, Sandra Odebrecht Vargas Nunes, et Helena Kaminami Morimoto. 2004. « Stress, Depression, the Immune System, and Cancer ». *The Lancet. Oncology* 5 (10): 617-25. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01597-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01597-9).
- Renaudineau, Yves, Sophie Hillion, Alain Saraux, Rizgar A. Mageed, et Pierre Youinou. 2005. « An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes ». *Blood* 106 (8): 2781-89. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0597>.
- Resnick, D., A. Pearson, et M. Krieger. 1994. « The SRCR Superfamily: A Family Reminiscent of the Ig Superfamily ». *Trends in Biochemical Sciences* 19 (1): 5-8. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90165-1).
- Ríos-Covián, David, Patricia Ruas-Madiedo, Abelardo Margolles, Miguel Gueimonde, Clara G. de Los Reyes-Gavilán, et Nuria Salazar. 2016. « Intestinal Short Chain Fatty Acids and Their Link with Diet and Human Health ». *Frontiers in Microbiology* 7:185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>.
- Roberts, Andrew W. 2020. « Therapeutic Development and Current Uses of BCL-2 Inhibition ». *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2020 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1182/hematology.2020000154>.
- Roessner, Philipp M., et Martina Seiffert. 2020. « T-cells in chronic lymphocytic leukemia: Guardians or drivers of disease? ». *Leukemia* 34 (8): 2012-24. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0873-2>.
- Rosén, Anders, Ann-Charlotte Bergh, Peter Gogok, Chamilly Evaldsson, Anna Lanemo Myhrinder, Eva Hellqvist, Abu Rasul, et al. 2012. « Lymphoblastoid cell line with B1 cell characteristics established from a chronic lymphocytic leukemia clone by in vitro EBV infection ». *Oncoimmunology* 1 (1): 18-27. <https://doi.org/10.4161/onci.1.1.18400>.
- Rosén, Anders, Fiona Murray, Chamilly Evaldsson, et Richard Rosenquist. 2010. « Antigens in Chronic Lymphocytic Leukemia--Implications for Cell Origin and Leukemogenesis ». *Seminars in Cancer Biology* 20 (6): 400-409. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.09.004>.

- Rosenquist, R., P. Ghia, A. Hadzidimitriou, L.-A. Sutton, A. Agathangelidis, P. Baliakas, N. Darzentas, et al. 2017. « Immunoglobulin Gene Sequence Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia: Updated ERIC Recommendations ». *Leukemia* 31 (7): 1477-81. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.125>.
- Rosser, Elizabeth C., et Claudia Mauri. 2015. « Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function ». *Immunity* 42 (4): 607-12. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>.
- Roychoudhuri, Rahul, David Clever, Peng Li, Yoshiyuki Wakabayashi, Kylie M. Quinn, Christopher A. Klebanoff, Yun Ji, et al. 2016. « BACH2 Regulates CD8+ T Cell Differentiation by Controlling Access of AP-1 Factors to Enhancers ». *Nature Immunology* 17 (7): 851-60. <https://doi.org/10.1038/ni.3441>.
- Russi, Sabino, Alessandra Vincenti, Angela Vinella, Maria Addolorata Marigliò, Fabio Pavone, Franco Dammacco, et Gianfranco Lauletta. 2019. « CD5/CD20 expression on circulating B cells in HCV-related chronic hepatitis and mixed cryoglobulinemia ». *European Journal of Internal Medicine* 66 (août):48-56. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.05.016>.
- Saint-Georges, Stéphane, Maude Quettier, Marouane Bouyaba, Stéphanie Le Coquil, Vanessa Laurienté, Lionel Guittat, Vincent Lévy, et al. 2016. « Protein Kinase D-Dependent CXCR4 down-Regulation upon BCR Triggering Is Linked to Lymphadenopathy in Chronic Lymphocytic Leukaemia ». *Oncotarget* 7 (27): 41031-46. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9031>.
- Sanchez, Maria-Luz, Julia Almeida, David Gonzalez, Marcos Gonzalez, Maria-Antonia Garcia-Marcos, Ana Balanzategui, Maria-Consuelo Lopez-Berges, et al. 2003. « Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone ». *Blood* 102 (8): 2994-3002. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0045>.
- Saulep-Easton, Damien, Fabien B. Vincent, Pin Shie Quah, Andrew Wei, Stephen B. Ting, Carlo M. Croce, Constantine Tam, et Fabienne Mackay. 2016. « The BAFF Receptor TACI Controls IL-10 Production by Regulatory B Cells and CLL B Cells ». *Leukemia* 30 (1): 163. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.174>.
- Saxena, Ankit, Hideo Yagita, Thomas W. Donner, et Abdel Rahim A. Hamad. 2017. « Expansion of FasL-Expressing CD5+ B Cells in Type 1 Diabetes Patients ». *Frontiers in Immunology* 8 (avril):402. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00402>.
- Schioppa, Tiziana, Robert Moore, Richard G. Thompson, Elizabeth C. Rosser, Hagen Kulbe, Sergei Nedospasov, Claudia Mauri, Lisa M. Coussens, et Frances R. Balkwill. 2011. « B Regulatory Cells and the Tumor-Promoting Actions of TNF- α during Squamous Carcinogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (26): 10662-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100994108>.
- Schmid, Vera Kristin, Ahmad Khadour, Nabil Ahmed, Carolin Brandl, Lars Nitschke, Klaus Rajewsky, Hassan Jumaa, et Elias Hobeika. 2022. « B-Cell Antigen Receptor Expression and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Regulate Genesis and Maintenance of Mouse Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Haematologica* 107 (8): 1796-1814. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279924>.
- Sen, Goutam, Gabriel Bikah, Chandrasekar Venkataraman, et Subbarao Bondada. 1999. « Negative Regulation of Antigen Receptor-Mediated Signaling by Constitutive Association of CD5 with the SHP-1 Protein Tyrosine Phosphatase in B-1 B Cells ». *European Journal of Immunology* 29 (10): 3319-28. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199910\)29:10<3319::AID-IMMU3319>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3319::AID-IMMU3319>3.0.CO;2-9).
- Shalapour, Shabnam, Joan Font-Burgada, Giuseppe Di Caro, Zhenyu Zhong, Elsa Sanchez-Lopez, Debanjan Dhar, Gerald Willmsky, et al. 2015. « Immunosuppressive plasma cells impede T cell-dependent immunogenic chemotherapy ». *Nature* 521 (7550): 94-98. <https://doi.org/10.1038/nature14395>.
- Shang, Jin, Haoran Zha, et Yufa Sun. 2020. « Phenotypes, Functions, and Clinical Relevance of Regulatory B Cells in Cancer ». *Frontiers in Immunology* 11.

- Shao, Yan, Chung Mau Lo, Chang Chun Ling, Xiao Bing Liu, Kevin Tak-Pan Ng, Andrew Chi Yuen Chu, Yuen Yuen Ma, Chang Xian Li, Sheung Tat Fan, et Kwan Man. 2014. « Regulatory B cells accelerate hepatocellular carcinoma progression via CD40/CD154 signaling pathway ». *Cancer Letters* 355 (2): 264-72. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.026>.
- Sidwell, Tom, Yang Liao, Alexandra L. Garnham, Ajithkumar Vasanthakumar, Renee Gloury, Jonas Blume, Peggy P. Teh, et al. 2020. « Attenuation of TCR-Induced Transcription by Bach2 Controls Regulatory T Cell Differentiation and Homeostasis ». *Nature Communications* 11 (1): 252. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14112-2>.
- Sigvardsson, M., M. O'Riordan, et R. Grosschedl. 1997. « EBF and E47 Collaborate to Induce Expression of the Endogenous Immunoglobulin Surrogate Light Chain Genes ». *Immunity* 7 (1): 25-36. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80507-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80507-5).
- Sîrbulescu, Ruxandra F., Chloe K. Boehm, Erin Soon, Moses Q. Wilks, Iulian Ilieș, Hushan Yuan, Ben Maxner, et al. 2017. « Mature B Cells Accelerate Wound Healing after Acute and Chronic Diabetic Skin Lesions ». *Wound Repair and Regeneration* 25 (5): 774-91. <https://doi.org/10.1111/wrr.12584>.
- Sitnicka, Ewa, Natalija Buza-Vidas, Henrik Ahlenius, Corrado M. Cilio, Christos Gekas, Jens M. Nygren, Robert Månsson, et al. 2007. « Critical role of FLT3 ligand in IL-7 receptor-independent T lymphopoiesis and regulation of lymphoid-primed multipotent progenitors ». *Blood* 110 (8): 2955-64. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-054726>.
- Slager, Susan L., Mark C. Lanasa, Gerald E. Marti, Sara J. Achenbach, Nicola J. Camp, Fatima Abbasi, Neil E. Kay, et al. 2021. « Natural history of monoclonal B-cell lymphocytosis among relatives in CLL families ». *Blood* 137 (15): 2046-56. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006322>.
- Srinivasan, Lakshmi, Yoshiteru Sasaki, Dinis Pedro Calado, Baochun Zhang, Ji Hye Paik, Ronald A. DePinho, Jeffrey L. Kutok, John F. Kearney, Kevin L. Otipoby, et Klaus Rajewsky. 2009. « PI3 Kinase Signals BCR-Dependent Mature B Cell Survival ». *Cell* 139 (3): 573-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.041>.
- Stamatopoulos, Kostas, Chrysoula Belessi, Carol Moreno, Myriam Boudjograh, Giuseppe Guida, Tatjana Smilevska, Lynda Belhoul, et al. 2006. « Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations ». *Blood* 109 (1): 259-70. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-012948>.
- Stein, Alexander F. vom, Michael Hallek, et Phuong-Hien Nguyen. 2023. « Role of the Tumor Microenvironment in CLL Pathogenesis ». *Seminars in Hematology*, décembre, S0037196323000987. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2023.12.004>.
- Stevenson, F. K., G. J. Smith J. North, T. J. Hamblin, et M. J. Glennie. 1989. « Identification of Normal B-Cell Counterparts of Neoplastic Cells Which Secrete Cold Agglutinins of Anti-I and Anti-i Specificity ». *British Journal of Haematology* 72 (1): 9-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1989.tb07643.x>.
- Stewart, Isabelle, Daniel Radtke, Bethan Phillips, Simon J. McGowan, et Oliver Bannard. 2018. « Germinal Center B Cells Replace Their Antigen Receptors in Dark Zones and Fail Light Zone Entry When Immunoglobulin Gene Mutations Are Damaging ». *Immunity* 49 (3): 477-489.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.025>.
- Stożek, Karolina, Kamil Grubczak, Viviana Marolda, Andrzej Eljaszewicz, Marcin Moniuszko, et Artur Bossowski. 2020. « Lower proportion of CD19+IL-10+ and CD19+CD24+CD27+ but not CD1d+CD5+CD19+CD24+CD27+ IL-10+ B cells in children with autoimmune thyroid diseases ». *Autoimmunity* 53 (1): 46-55. <https://doi.org/10.1080/08916934.2019.1697690>.

- Strati, Paolo, et Tait D. Shanafelt. 2015. « Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification ». *Blood* 126 (4): 454-62. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-585059>.
- Suchanek, Ondrej, et Menna R. Clatworthy. 2023. « Homeostatic role of B-1 cells in tissue immunity ». *Frontiers in Immunology* 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1106294>.
- Suchanek, Ondrej, John R. Ferdinand, Zewen K. Tuong, Sathi Wijeyesinghe, Anita Chandra, Ann-Katrin Clauder, Larissa N. Almeida, et al. 2023. « Tissue-Resident B Cells Orchestrate Macrophage Polarisation and Function ». *Nature Communications* 14 (1): 7081. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42625-4>.
- Sun, Lina, Yanhong Su, Anjun Jiao, Xin Wang, et Baojun Zhang. 2023. « T Cells in Health and Disease ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 1-50. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>.
- Suo, Chenqu, Emma Dann, Issac Goh, Laura Jardine, Vitalii Kleshchevnikov, Jong-Eun Park, Rachel A. Botting, et al. 2022. « Mapping the developing human immune system across organs ». *Science (New York, N.Y.)* 376 (6597): science.abo0510. <https://doi.org/10.1126/science.abo0510>.
- Taghiloo, Saeid, et Hossein Asgarian-Omran. 2024. « Cross-Talk between Leukemic and Immune Cells at the Tumor Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia: An Update Review ». *European Journal of Haematology*, mai. <https://doi.org/10.1111/ejh.14224>.
- Taher, Taher E., Jonas Bystrom, Olivier Mignen, Jacques-Olivier Pers, Yves Renaudineau, et Rizgar A. Mageed. 2020. « CD5 and B lymphocyte responses: multifaceted effects through multitudes of pathways and channels ». *Cellular and Molecular Immunology* 17 (11): 1201-3. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0490-z>.
- Taniguchi, Koji, et Michael Karin. 2018. « NF- κ B, Inflammation, Immunity and Cancer: Coming of Age ». *Nature Reviews. Immunology* 18 (5): 309-24. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>.
- Tedder, Thomas F. 2015. « B10 Cells: A Functionally Defined Regulatory B Cell Subset ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (4): 1395-1401. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401329>.
- Ten Hacken, Elisa, Maria Gounari, Paolo Ghia, et Jan A. Burger. 2019. « The Importance of B Cell Receptor Isotypes and Stereotypes in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Leukemia* 33 (2): 287-98. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0303-x>.
- Tian, Jide, Dan Zekzer, Lorraine Hanssen, Yuxin Lu, Angelica Olcott, et Daniel L. Kaufman. 2001. « Lipopolysaccharide-Activated B Cells Down-Regulate Th1 Immunity and Prevent Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice¹ ». *The Journal of Immunology* 167 (2): 1081-89. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.1081>.
- Tibaldi, E., A. M. Brunati, F. Zonta, F. Frezzato, C. Gattazzo, R. Zambello, E. Gringeri, G. Semenzato, M. A. Pagano, et L. Trentin. 2011. « Lyn-Mediated SHP-1 Recruitment to CD5 Contributes to Resistance to Apoptosis of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells ». *Leukemia* 25 (11): 1768-81. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.152>.
- Tiegs, S. L., D. M. Russell, et D. Nemazee. 1993. « Receptor Editing in Self-Reactive Bone Marrow B Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 177 (4): 1009-20. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.1009>.
- Tobin, Gerard, Ulf Thunberg, Karin Karlsson, Fiona Murray, Anna Laurell, Kerstin Willander, Gunilla Enblad, et al. 2004. « Subsets with Restricted Immunoglobulin Gene Rearrangement Features Indicate a Role for Antigen Selection in the Development of Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Blood* 104 (9): 2879-85. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0132>.
- Tornberg, U. C., et D. Holmberg. 1995. « B-1a, B-1b and B-2 B Cells Display Unique VHDJH Repertoires Formed at Different Stages of Ontogeny and under Different Selection

- Pressures ». *The EMBO Journal* 14 (8): 1680-89. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07157.x>.
- Tsukada, Nobuhiro, Jan A. Burger, Nathan J. Zvaifler, et Thomas J. Kipps. 2002. « Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia ». *Blood* 99 (3): 1030-37. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.3.1030>.
- Tute, R. de, M. Yuille, D. Catovsky, R. S. Houlston, P. Hillmen, et A. C. Rawstron. 2006. « Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) in CLL Families: Substantial Increase in Relative Risk for Young Adults ». *Leukemia* 20 (4): 728-29. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404116>.
- Vadasz, Zahava, Regina Peri, Nasren Eiza, Gleb Slobodin, Alexandra Balbir-Gurman, et Elias Toubi. 2015. « 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>.
- Vettermann, Christian, et Mark S. Schlissel. 2010. « Allelic Exclusion of Immunoglobulin Genes: Models and Mechanisms ». *Immunological Reviews* 237 (1): 22-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00935.x>.
- Victoria, Gabriel D., et Michel C. Nussenzweig. 2022. « Germinal Centers ». *Annual Review of Immunology* 40 (avril):413-42. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-120419-022408>.
- Vlachonikola, Elisavet, Kostas Stamatopoulos, et Anastasia Chatzidimitriou. 2021. « T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Two-Edged Sword ». *Frontiers in Immunology* 11 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.612244>.
- Vlad, Amalia, Pierre-Antoine Deglesne, Rémi Letestu, Stéphane Saint-Georges, Nathalie Chevallier, Fanny Baran-Marszak, Nadine Varin-Blank, Florence Ajchenbaum-Cymbalista, et Dominique Ledoux. 2009. « Down-Regulation of CXCR4 and CD62L in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Triggered by B-Cell Receptor Ligation and Associated with Progressive Disease ». *Cancer Research* 69 (16): 6387-95. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4750>.
- Wang, Ji-Yang, éd. 2020. *B Cells in Immunity and Tolerance*. Vol. 1254. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1>.
- Wang, Weiwei, Xiangliang Yuan, Hui Chen, Guohua Xie, Yanhui Ma, Yingxia Zheng, Yunlan Zhou, et Lisong Shen. 2015. « CD19 + CD24^{hi} CD38^{hi} Bregs Involved in Downregulate Helper T Cells and Upregulate Regulatory T Cells in Gastric Cancer ». *Oncotarget* 6 (32): 33486-99. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5588>.
- Wang, Xiaobo, Shuang Geng, Junchen Meng, Ning Kang, Xinyi Liu, Yanni Xu, Huiyun Lyu, et al. 2023. « Foxp3-Mediated Blockage of Ryanodine Receptor 2 Underlies Contact-Based Suppression by Regulatory T Cells ». *Journal of Clinical Investigation* 133 (24): e163470. <https://doi.org/10.1172/JCI163470>.
- Wang, Y, Y Qin, X Wang, L Zhang, J Wang, X Xu, H Chen, H-T Hsu, et M Zhang. 2020. « Decrease in the proportion of CD24^{hi}CD38^{hi} B cells and impairment of their regulatory capacity in type 1 diabetes patients ». *Clinical and Experimental Immunology* 200 (1): 22-32. <https://doi.org/10.1111/cei.13408>.
- Wei, Xin, Yangqiu Jin, Yinpu Tian, Huiyuan Zhang, Jie Wu, Wei Lu, et Xiaofen Lu. 2016. « Regulatory B Cells Contribute to the Impaired Antitumor Immunity in Ovarian Cancer Patients ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (5): 6581-88. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4538-0>.
- Wei, Yuan, Chun-Xiang Huang, Xiao Xiao, Dong-Ping Chen, Hong Shan, Huanhuan He, et Dong-Ming Kuang. 2021. « B Cell Heterogeneity, Plasticity, and Functional Diversity in Cancer Microenvironments ». *Oncogene* 40 (29): 4737-45. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01918-y>.

- Wejksza, Katarzyna, Catalina Lee-Chang, Monica Bodogai, Jessica Bonzo, Frank J. Gonzalez, Elin Lehrmann, Kevin Becker, et Arya Biragyn. 2013. « Cancer-Produced Metabolites of 5-Lipoxygenase Induce Tumor-Evoked Regulatory B Cells via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α ». *The Journal of Immunology* 190 (6): 2575-84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201920>.
- Widhopf, George F., II, et Thomas J. Kipps. 2001. « Normal B Cells Express 51p1-Encoded Ig Heavy Chains That Are Distinct From Those Expressed by Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells1 ». *The Journal of Immunology* 166 (1): 95-102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.95>.
- Winkler, Thomas H., et Inga-Lill Mårtensson. 2018. « The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance ». *Frontiers in Immunology* 9 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02423>.
- Wong, Jason B., Susannah L. Hewitt, Lynn M. Heltemes-Harris, Malay Mandal, Kristen Johnson, Klaus Rajewsky, Sergei B. Koralov, Marcus R. Clark, Michael A. Farrar, et Jane A. Skok. 2019. « B-1a Cells Acquire Their Unique Characteristics by Bypassing the Pre-BCR Selection Stage ». *Nature Communications* 10 (1): 4768. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12824-z>.
- Woyach, Jennifer A., Engin Bojnik, Amy S. Ruppert, Matthew R. Stefanovski, Virginia M. Goettl, Kelly A. Smucker, Lisa L. Smith, et al. 2014. « Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL) ». *Blood* 123 (8): 1207-13. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515361>.
- Wu, Qi, Elizabeth A. Mills, Qin Wang, Catherine A. Dowling, Caitlyn Fisher, Britany Kirch, Steven K. Lundy, David A. Fox, et Yang Mao-Draayer. 2020. « Siponimod Enriches Regulatory T and B Lymphocytes in Secondary Progressive Multiple Sclerosis ». *JCI Insight* 5 (3). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134251>.
- Wu, Shaoxuan, Yang Zhang, Yajuan Li, Huilan Wei, Zhenyi Guo, Shi Wang, Lingling Zhang, et Zhenmin Bao. 2020. « Identification and expression profiles of Fox transcription factors in the Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) ». *Gene* 733 (avril):144387. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144387>.
- Xochelli, Aiki, Panagiotis Baliakas, Ioannis Kavakiotis, Andreas Agathangelidis, Lesley-Ann Sutton, Eva Minga, Stavroula Ntoufa, et al. 2017. « Chronic Lymphocytic Leukemia with Mutated IGHV4-34 Receptors: Shared and Distinct Immunogenetic Features and Clinical Outcomes ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 23 (17): 5292-5301. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3100>.
- Xue, Xinran, Zhihao Wen, Xin Zhang, Ying Yang, Yifei Li, Ruoxi Liao, Qin Zheng, Yang Fu, Yu Liu, et Hongyan Liao. 2024. « CXCR4 Overexpression in Chronic Lymphocytic Leukemia Associates with Poorer Prognosis: A Prospective, Single-Center, Observational Study ». *Genes & Immunity* 25 (2): 117-23. <https://doi.org/10.1038/s41435-024-00258-7>.
- Yan, Xiao-jie, Emilia Albesiano, Nicola Zanesi, Sophia Yancopoulos, Alan Sawyer, Egidio Romano, Aleksandar Petlickovski, Dimitar G. Efremov, Carlo M. Croce, et Nicholas Chiorazzi. 2006. « B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (31): 11713-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604564103>.
- Yanaba, Koichi, Jean-David Bouaziz, Karen M. Haas, Jonathan C. Poe, Manabu Fujimoto, et Thomas F. Tedder. 2008. « A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses ». *Immunity* 28 (5): 639-50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.017>.
- Yang, Heng, Lin Xia, Jian Chen, Shuqing Zhang, Vincent Martin, Qingqing Li, Shangqing Lin, et al. 2019. « Stress-Glucocorticoid-TSC22D3 Axis Compromises Therapy-Induced Antitumor

- Immunity ». *Nature Medicine* 25 (9): 1428-41. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0566-4>.
- Yang, Shen-Miao, Jian-Yong Li, Robert Peter Gale, et Xiao-Jun Huang. 2015. « The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology? » *Blood Reviews* 29 (3): 205-13. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.12.001>.
- Yang, Si-Yu, Jie Long, Meng-Xing Huang, Pan-Yue Luo, Zhen-Hua Bian, Ya-Fei Xu, Cheng-Bo Wang, et al. 2021. « Characterization of Organ-Specific Regulatory B Cells Using Single-Cell RNA Sequencing ». *Frontiers in Immunology* 12 (septembre):711980. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711980>.
- Young, Ryan M., et Louis M. Staudt. 2013. « Targeting Pathological B Cell Receptor Signalling in Lymphoid Malignancies ». *Nature Reviews Drug Discovery* 12 (3): 229-43. <https://doi.org/10.1038/nrd3937>.
- Yousefi, Meysam, Sadegh Dehghani, Rahim Nosrati, Mahmoud Ghanei, Arash Salmaninejad, Sara Rajaie, Malihe Hasanzadeh, et Alireza Pasdar. 2020. « Current Insights into the Metastasis of Epithelial Ovarian Cancer - Hopes and Hurdles ». *Cellular Oncology (Dordrecht)* 43 (4): 515-38. <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00513-9>.
- Ysebaert, Loic, et Jean-Jacques Fournié. 2011. « Genomic and Phenotypic Characterization of Nurse-like Cells That Promote Drug Resistance in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Leukemia & Lymphoma* 52 (7): 1404-6. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.568078>.
- Zaaboub, Rim, Lene Vimeux, Vincent Contremoulins, Florence Cymbalista, Vincent Lévy, Emmanuel Donnadieu, Nadine Varin-Blank, Antoine Martin, et Elisabetta Dondi. 2022. « Nurselike Cells Sequester B Cells in Disorganized Lymph Nodes in Chronic Lymphocytic Leukemia via Alternative Production of CCL21 ». *Blood Advances* 6 (16): 4691-4704. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006169>.
- Zacca, Estefanía R., Luisina I. Onofrio, Cristina D. V. Acosta, Paola V. Ferrero, Sergio M. Alonso, María C. Ramello, Eduardo Mussano, et al. 2018. « PD-L1+ Regulatory B Cells Are Significantly Decreased in Rheumatoid Arthritis Patients and Increase After Successful Treatment ». *Frontiers in Immunology* 9 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02241>.
- Zhang, Huajia, et A. McGarry Houghton. 2021. « Good cops turn bad: The contribution of neutrophils to immune-checkpoint inhibitor treatment failures in cancer ». *Pharmacology & Therapeutics* 217 (janvier):107662. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107662>.
- Zhang, L., Y.-T. Tai, M. Ho, L. Xing, D. Chauhan, A. Gang, L. Qiu, et K. C. Anderson. 2017. « Regulatory B Cell-Myeloma Cell Interaction Confers Immunosuppression and Promotes Their Survival in the Bone Marrow Milieu ». *Blood Cancer Journal* 7 (3): e547-e547. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.24>.
- Zhao, Huakan, Lei Wu, Guifang Yan, Yu Chen, Mingyue Zhou, Yongzhong Wu, et Yongsheng Li. 2021. « Inflammation and Tumor Progression: Signaling Pathways and Targeted Intervention ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 1-46. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>.
- Zheremyan, Elina A., Alina S. Ustiugova, Nina M. Karamushka, Aksinya N. Uvarova, Ekaterina M. Stasevich, Apollinariya V. Bogolyubova, Dmitry V. Kuprash, et Kirill V. Korneev. 2024. « Breg-Mediated Immunoregulation in the Skin ». *International Journal of Molecular Sciences* 25 (1): 583. <https://doi.org/10.3390/ijms25010583>.
- Zhong, Wenqun, et Wei Guo. 2023. « Immunosuppressive Extracellular Vesicles in CLL ». *Blood Cancer Discovery* 4 (1): 5-7. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-22-0161>.
- Zhou, Xi, Yu-Xiong Su, Xiao-Mei Lao, Yu-Jie Liang, et Gui-Qing Liao. 2016. « CD19+IL-10+ regulatory B cells affect survival of tongue squamous cell carcinoma patients and induce resting CD4+ T cells to CD4+Foxp3+ regulatory T cells ». *Oral Oncology* 53 (février):27-35. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.11.003>.

Zhu, Qiugang, Ke Rui, Shengjun Wang, et Jie Tian. 2021. « Advances of Regulatory B Cells in Autoimmune Diseases ». *Frontiers in Immunology* 12 (avril):592914.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.592914>.

Annexe

Article n° 3 :

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

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est un néoplasme de lymphocytes B matures CD5⁺. Les patients atteints présentent une évolution clinique hétérogène, allant d'une maladie indolente à une maladie progressive. Cette dernière est souvent associée à une susceptibilité accrue aux infections et aux cancers secondaires en raison de défauts dans la reconnaissance tumorale. Cette déficience immunitaire est en partie attribuée à l'expansion clonale de sous-populations leucémiques aux propriétés immuno-régulatrices. Bien que ces fonctions régulatrices soient couramment étudiées dans les tumeurs solides, leur évaluation dans les néoplasmes hématopoïétiques reste un défi majeur.

Nos résultats publiés (Cf. Manuscrit n°1) (Mékinian et al. 2023) ont mis en évidence une diversité fonctionnelle de l'expansion clonale des cellules B leucémiques en identifiant des sous-populations exprimant de manière hétérogène les facteurs régulateurs IL-10, TGF β 1 ou FOXP3. Ces sous-populations exercent des fonctions immunorégulatrices et sont impliquées dans la progression de la LLC. Pour approfondir l'analyse de l'hétérogénéité fonctionnelle des sous-clones leucémiques, l'objectif de ce travail consiste à explorer l'expression d'un autre facteur régulateur, à savoir l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme clé dans le catabolisme du tryptophane (Trp) qui soutient le métabolisme cellulaire et contribue à l'établissement d'un environnement toléroène.

Nos résultats indiquent que l'IFN- γ est présent en quantités élevées dans le sérum des patients LLC suite à un dosage par une approche ELISA-like et qu'il pourrait représenter un inducteur majeur de l'expression d'IDO dans ce modèle pathologique. L'étude de l'expression protéique d'IDO montre qu'elle est hétérogène dans les cellules tumorales et fortement augmentée par une stimulation avec de l'IFN γ exogène. Une analyse approfondie du mécanisme d'induction par l'IFN γ révèle une cinétique en deux vagues successives, observées aux niveaux transcriptionnel (RT-qPCR) et protéique (Western Blot). La première vague est caractérisée par le recrutement du facteur de transcription STAT1 au récepteur de l'IFN- γ (IFN γ R), suivi de l'activation par phosphorylation du FT puis sa translocation dans le noyau, ce qui conduit à l'induction d'IRF1. La seconde vague, quant à elle, est marquée par une expression maximale d'IRF1 qui induit l'expression d'IDO ainsi que celle d'un autre gène cible d'IRF1, PD-L1.

De manière intéressante, une quantification cytokinique montre des profils d'expression hétérogènes, qui sont caractérisés par des taux circulants élevés d'IFN γ et réduits de TGF β 1 par rapport aux donneurs sains. Les effets opposés de ces cytokines sur l'orientation régulatrice dans l'immunité anti-tumorale, ainsi que leurs rôles bien établis dans l'expression d'IDO dans différents contextes cellulaires, ont soulevé des questions quant à leurs impacts relatifs sur la régulation de l'expression d'IDO. Pour y répondre, des stimulations isolées ou combinées ont été

réalisées sur des échantillons de patients afin d'évaluer l'activation des effecteurs dépendants de l'IFN γ et du TGF β 1, ainsi que l'induction de l'IRF1 et d'IDO. Les résultats ont mis en exergue un mécanisme de compétition entre l'activation cellulaire par l'IFN γ et le TGF β 1 dans les cellules B leucémiques. Ce modèle suggère qu'un microenvironnement dominé par l'IFN γ favoriserait l'expression d'IDO pour maintenir la tolérance, ce qui serait compatible avec une lymphocytose stable. A l'inverse, une expression dominante de TGF β 1 inhiberait l'expression d'IDO et favoriserait l'activation directe des voies régulatrices, sous-tendant la différenciation des Tregs et l'absence de reconnaissance tumorale.

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}, Laure Aubard^{1,2}, Ferial Kanoun^{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-first authors

\$ 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, TGFβ1 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. IFNγ 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 TGFβ1 inhibits the later phase of this IFNγ-dependent mechanism. Analysis of the expression of the two inflammatory or regulatory cytokines indicates a heterogeneous profile with IFNγ-mediated expression of IDO and TGFβ1-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 IFNγ 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 TGFβ1 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 StepOnePlus™ 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 IFN 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.

TGFβ1 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 TGFβ1 since patients' samples did not express Smad3. Interestingly, the HG3 CLL cell line was unable to respond to TGFβ1 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 TGFβ1 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 IFNγ we observed a significant decrease of the Trp/kin ratio. Our results also highlight a competitive mechanism between IFNγ- and TGFβ1- cellular activation in the leukemic cells probably depending on a IFNγ-oriented or TGFβ1-dominant microenvironment. Indeed, early effectors of IFNγ-mediated induction are not the direct target of this inhibitory effect of TGFβ1 since phosphorylation of STAT1 was not modified in the culture where both cytokines were present. The absence of an effect of TGFβ1 on IRF1 induction gives credit to a competitive mechanism taking place at the transcriptional level for the expression of IDO. Of note, TGFβ1 *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 TGFβ1 *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 IFNγ which also corresponded with lower levels of TGFβ1 (UPN 334). Altogether, our results give credit to a model in which a IFNγ dominant microenvironment would favor expression of IDO to maintain a tolerigenic response in frame with a stable lymphocytosis while dominant expression of TGFβ1 would inhibit IDO expression and favor the direct activation of regulatory pathways including differentiation of Tregs, self-induction of TGFβ1 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, Gatmaitan 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, *** $P \leq 0.00005$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.001$. **(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, **** $P \leq 0,0001$. **(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 $P \geq 0.05$, ** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0005$.

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 $P \geq 0.05$, * $P \leq 0.0312$

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- C3+ 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 phosphoY⁷⁰¹ 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 pT¹⁸⁰Y¹⁸⁷-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

Applicatio n	Antibody name	Clone	Fluorochrom e	Compagny
	p-Smad2 (Ser465/467) / Smad3 (Ser423/425)	D27F4	None	

Western Blot	Smad2/3	D7G7		Cell Signaling Technologies (CST)
	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

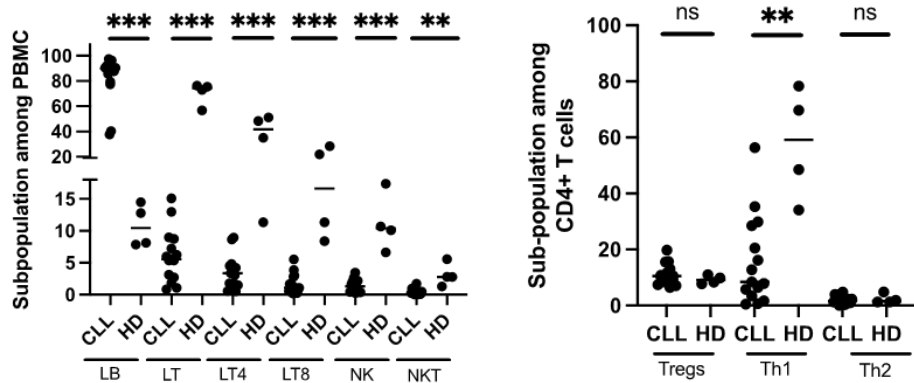
Table 3: Primers used in RT-PCR

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
IRF1	CTATGGAGACTTTAGCTGTAAGG	GCTGTAGACTCAGCCCAATAT
IDO	GGATCCTAATAAGCCCCTGAC	ACTGCAGTCTCCATCACGAAA

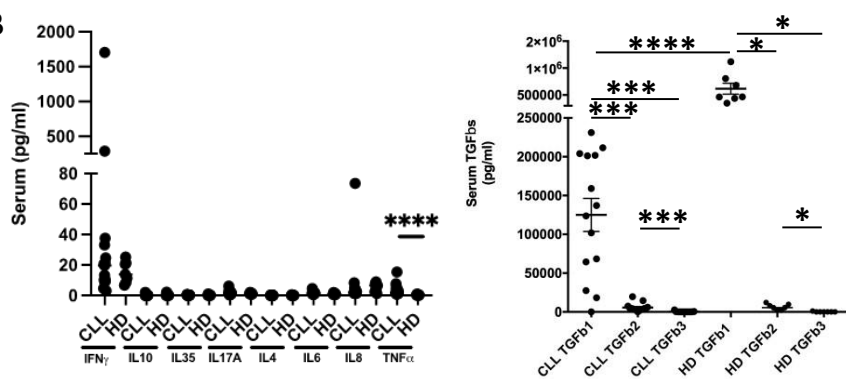
PDL1	GGTCATCCCAGAACTACCTC	TAAGATGGCTCCCAGAATTACC
STAT 1	AGATTTAATCAGGCTCAGTCGG	TACTGTCAAGCTCTTTCTGTTTGTCT
PP2A	GGATCCATGGACGAGAAGGTGTTCT AC	AAGCTTCAGGAAGTAGTCTGGGGGTACGAT CG

Figure 1

A



B



C

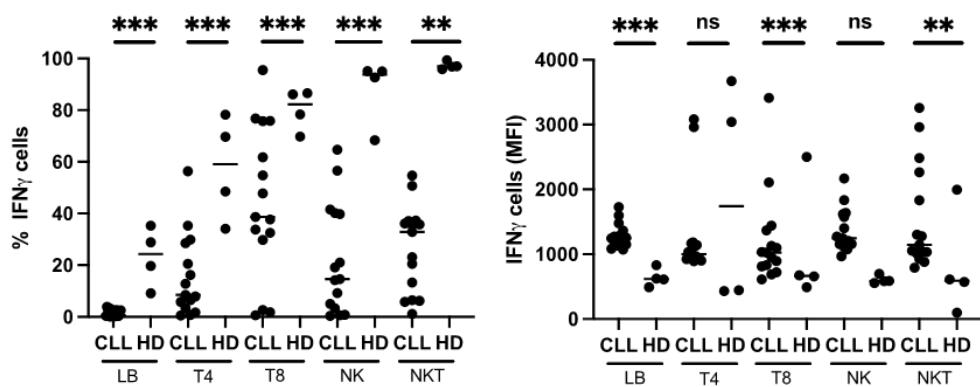
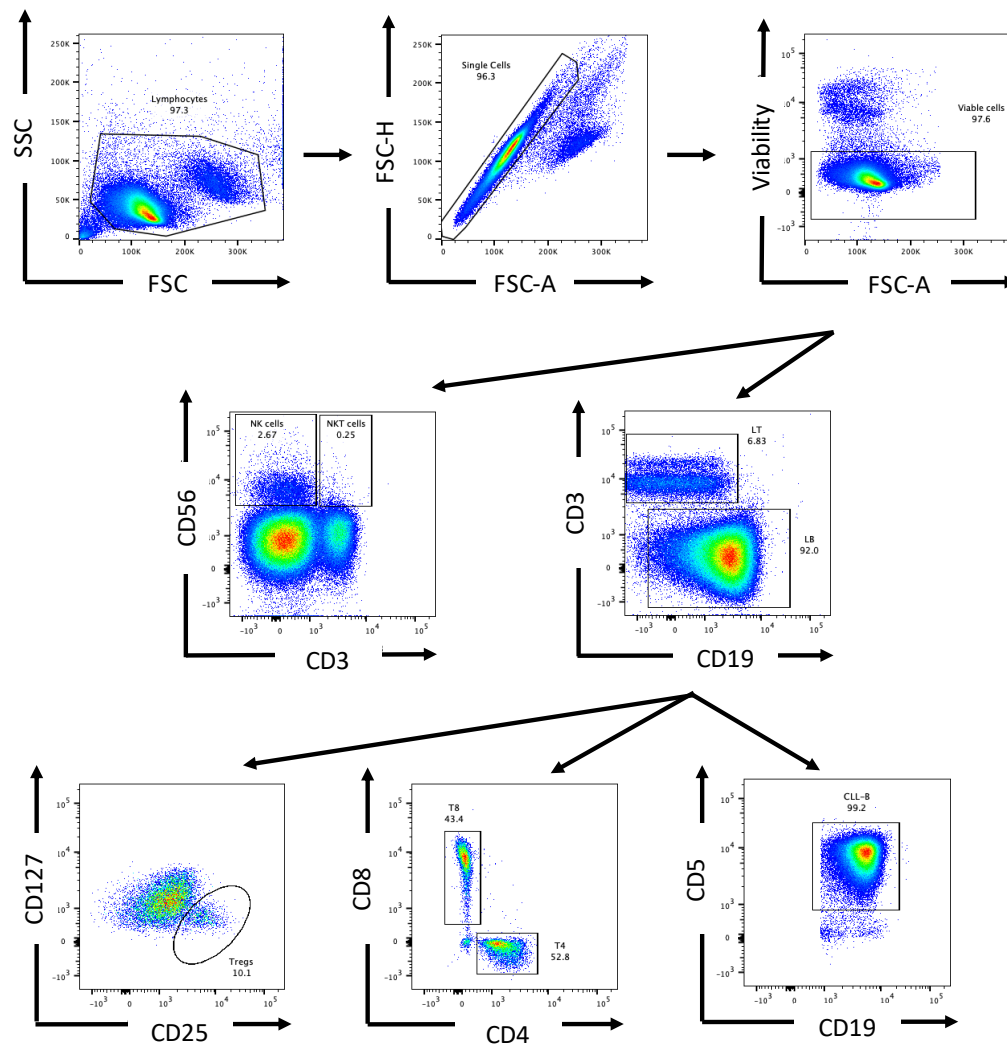


Figure S1

A



B

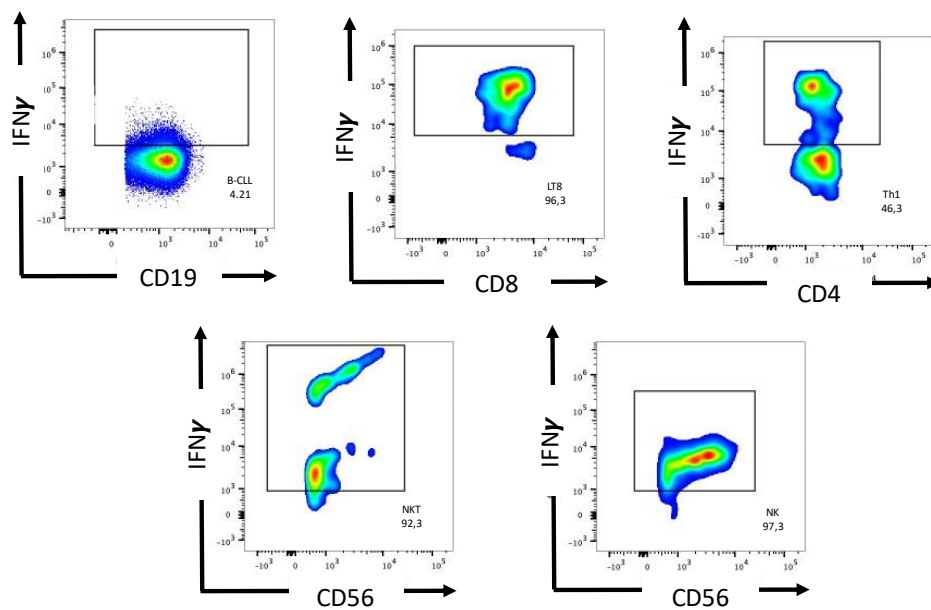


Figure 2

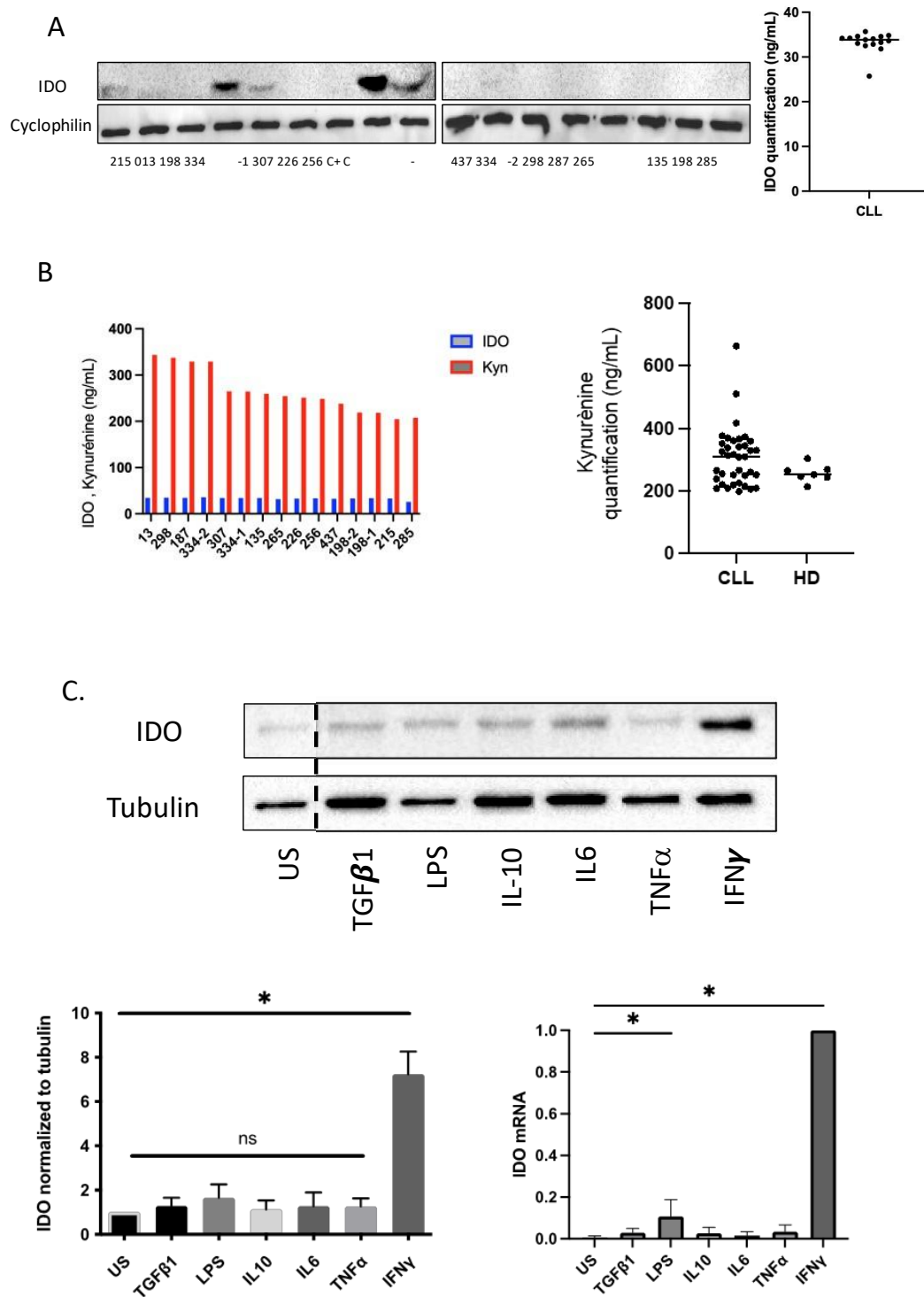
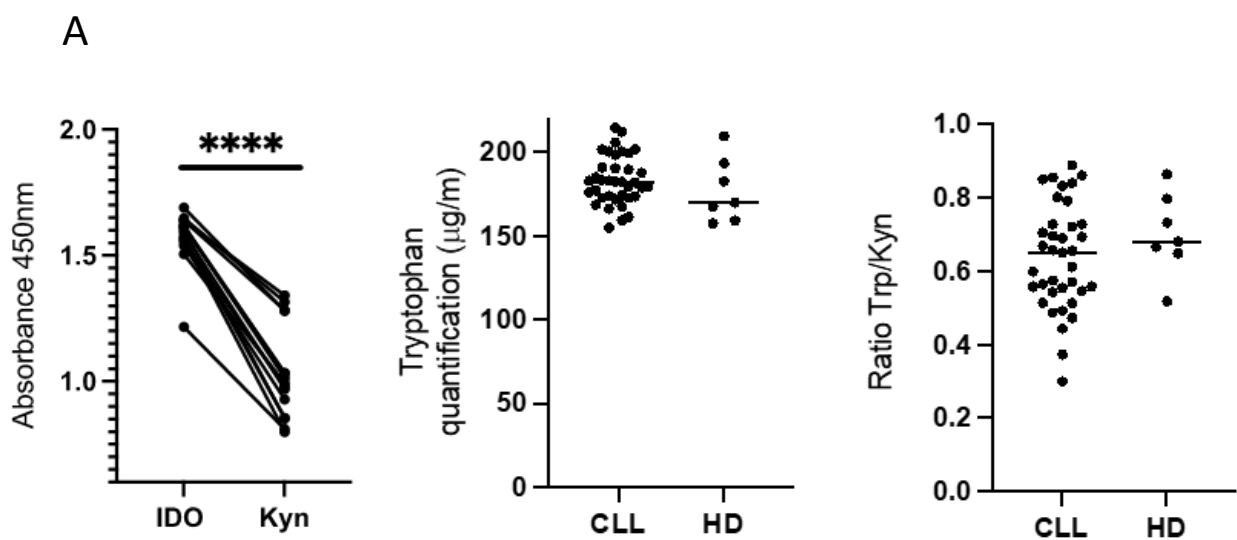


Figure S2



B

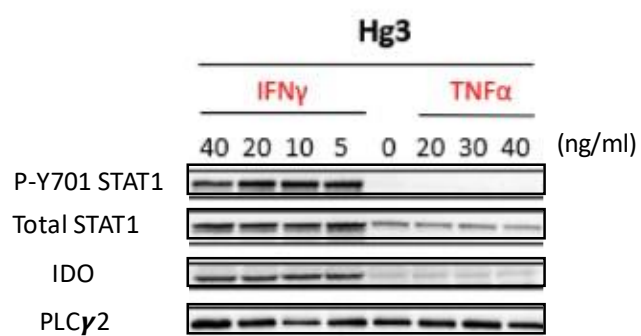


Figure 3:

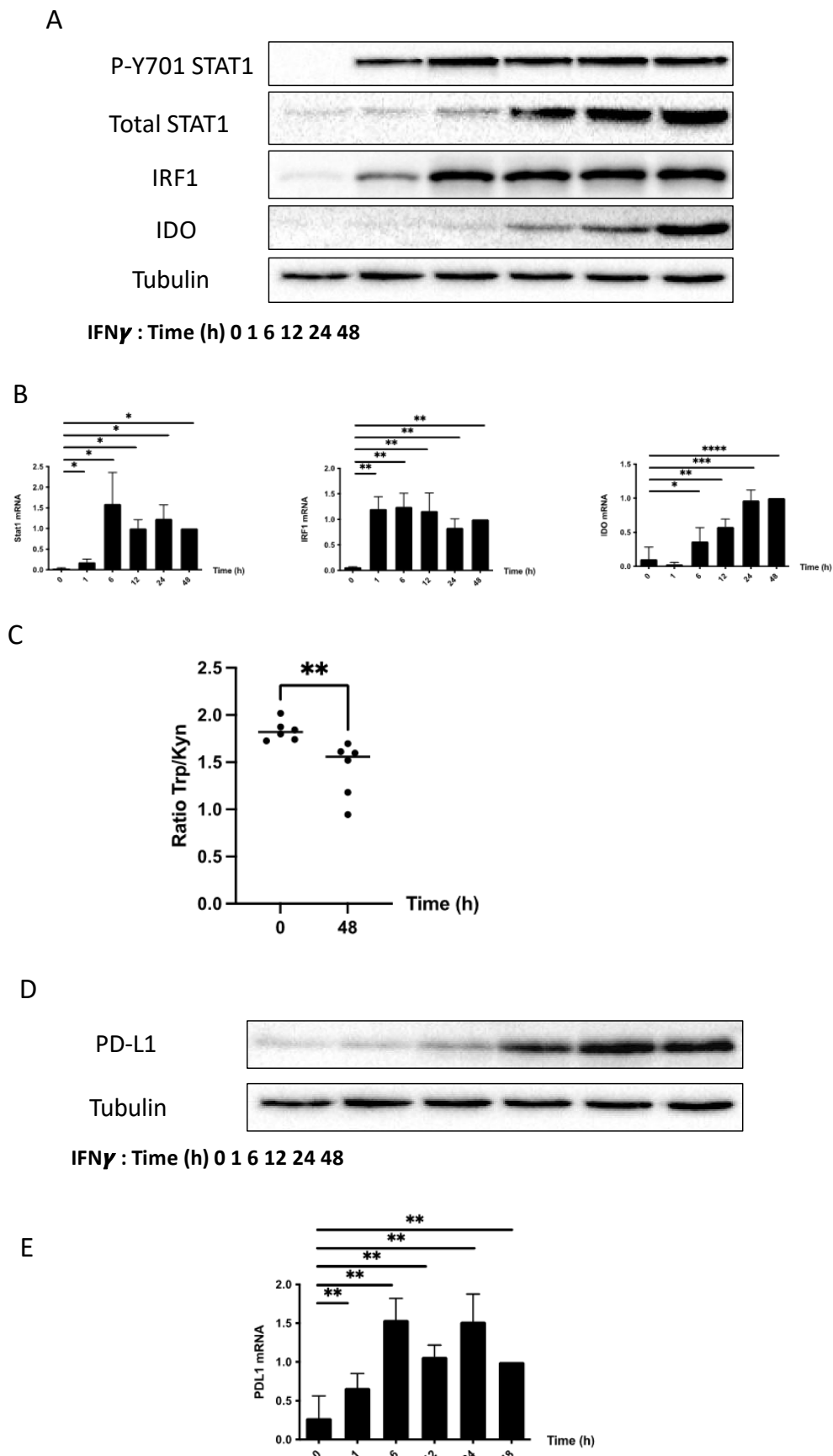


Figure S3

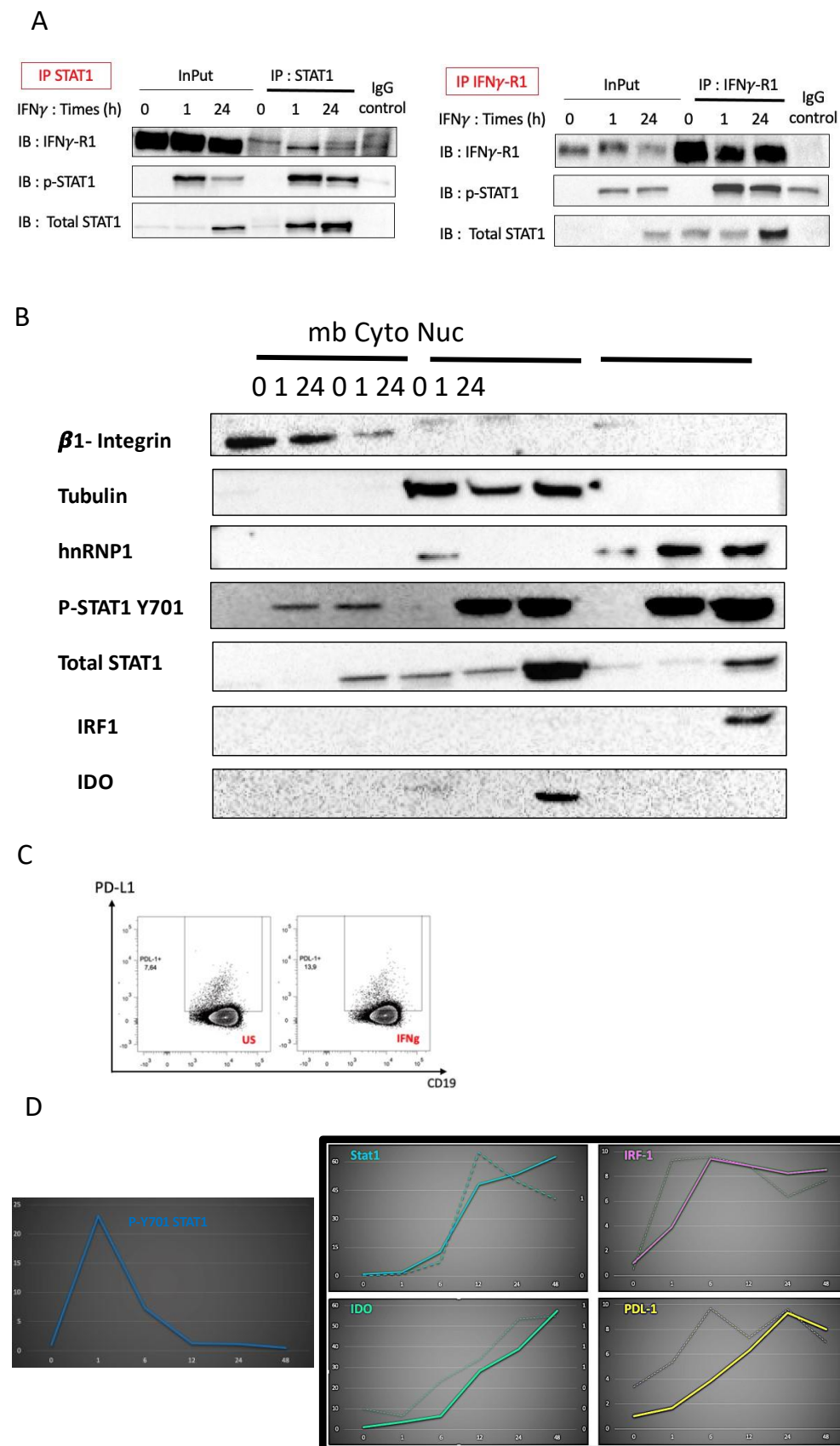


Figure 4

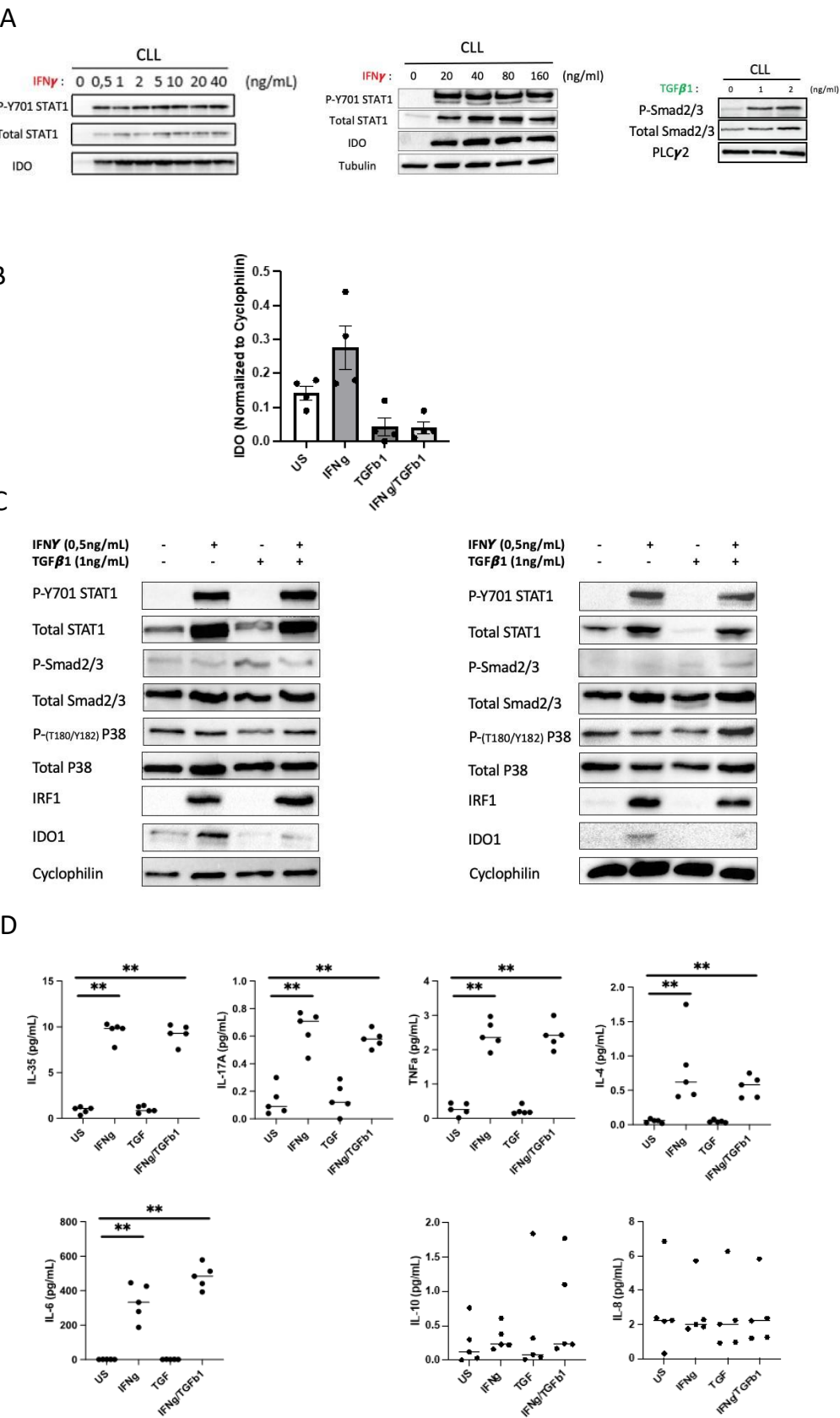
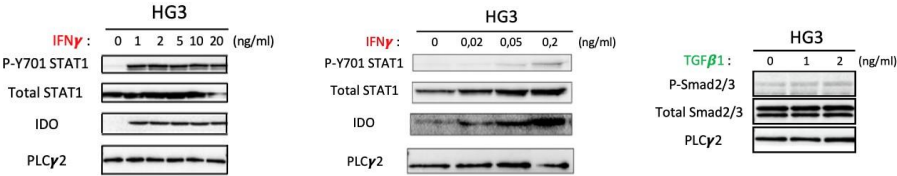


Figure S4

A



B

