

Caractérisation des lymphocytes B régulateurs dans la leucémie lymphoïde chronique

Audrey Mohr

▶ To cite this version:

Audrey Mohr. Caractérisation des lymphocytes B régulateurs dans la leucémie lymphoïde chronique. Immunologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2016. Français. NNT: 2016BRES0066 . tel-01647200

HAL Id: tel-01647200 https://theses.hal.science/tel-01647200

Submitted on 24 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE



université de bretagne occidentale

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE Mention : Biologie et Santé École Doctorale SICMA

Caractérisation des lymphocytes B régulateurs dans la Leucémie Lymphoïde Chronique

présentée par Audrey Mohr

Préparée au Laboratoire d'Immunothérapies et Pathologies Lymphocytaires B, EA2216, INSERM ESPRI ERI29 ,Brest, France

Thèse soutenue le 17 octobre 2016 devant le jury composé de :

Laurent Mauvieux

PU-PH, EA3430- Université de Strasbourg/ Rapporteur

Anne Quillet-Mary DR2, UMR1037 - CRCT - Université de Toulouse III / Rapporteur

Christian Berthou PU-PH,CHRU Morvan, Service Hématologie, Brest / Examinateur

Patrick Cormier PR, UMR8227, Université Pierre et Marie Curie / Examinateur

Christophe Jamin

MCU-PH, INSERM ESPRI ERI 29 - EA 2216 - Université de Bretagne Occidentale / Directeur de thèse

Anne Bordron

PR, INSERM ESPRI ERI 29 - EA 2216 - Université de Bretagne Occidentale / *Co-directeur de thèse* « Les défis vous font découvrir sur vous-même des choses que vous ne soupçonniez pas. C'est ce qui vous grandit et vous pousse au-delà des limites » D L Boren

Remerciements

Ce manuscrit vient clore une expérience enrichissante aussi bien d'un point de vue professionnel qu'humain. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation de près comme de loin.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Professeur Laurent Mauvieux, le Docteur Anne Quillet-Mary, le professeur Christian Berthou et le professeur Patrick Cormier pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'évaluer ce travail.

Un grand merci au Docteur Christophe Jamin et au Professeur Anne Bordron qui m'ont permis de réaliser cette thèse. Je voudrais les remercier tout particulièrement pour la confiance qu'ils m'ont accordé pour mener à bien ce projet ainsi que pour leur sympathie et leur accompagnement tout au long de ces trois années.

Je voudrais ensuite exprimer ma reconnaissance au Professeur Jacques-Olivier Pers pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du laboratoire d'immunologie mais aussi ceux qui l'ont quitté entre temps pour leur accueil, leurs conseils et leur bonne humeur. Merci aux chercheurs, Sophie Hillion, Laëtitia Le Pottier, Yves Renaudineau, Bendaoud Boutahar, mais également à Christelle Le Dantec et Patrice Hémon pour leurs conseils lors des séminaires. Merci aux techniciennes, Annie, Nelly, Christine, Sylvie, Carole et Christine pour leur gentillesse. Merci à Simone et Geneviève pour leur bienveillance ainsi que pour l'aide qu'elles m'ont apporté pour la mise en forme de ce manuscrit. Merci à Stéphanie et Charlotte pour leur contribution face à la réalisation parfois laborieuse des séquençages. Merci à Pierre pour son aide, ses conseils et son soutien tout au long de ces trois années.

Merci à toute l'équipe de doctorants, post-doctorants et étudiants: Amandine, Kahina, Yosra, Achouak, Marie, Thomas, Quentin, Marjolaine, Delphine, Lucas, Guillermo, Laure, Lenaïg, Ersie, Edwige, Cristina; pour leur bonne humeur, les fous rires, les bons moments passés aux laboratoires ainsi qu'à l'extérieur et pour leur soutien dans les moments de doute. Cette thèse m'a permis de faire de très belles rencontres. Merci à tous. Une petite pensée tout particulière pour Kahina et Edwige sans qui ces trois années sur Brest auraient été bien fades. Mes remerciements vont également à l'ensemble des cliniciens pour le recrutement des patients, aux ARC Catherine Riou et Valérie Olivier pour leur travail sur les données cliniques, mais également aux patients ayant consenti à cette étude.

Je remercie également les organismes qui ont apporté leur soutien financier afin de concrétiser ce projet : le LABEX IGO (Immunotherapy Graft-Oncology), la région Bretagne et la Ligue contre le cancer.

Enfin, je remercie tout spécialement ma famille et mes amis pour le soutien qu'ils ont pu m'apporter malgré la distance qui nous sépare. J'ai une pensée toute particulière pour mes parents et ma sœur, sans leur aide, leurs encouragements et leur appui tout au long de ces années d'étude, je n'aurais pas pu aller au bout de cette aventure.

<u>Liste des illustrations</u> <u>Liste des tableaux</u>		8
		11
Liste des	<u>abréviations</u>	12
INTRO	DUCTION	17
1 LAL	EUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE	18
1.1	L'épidémiologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique	18
1.2	Le diagnostic	18
1.3	Les facteurs pronostics	19
1.3.1	Les critères cliniques	20
1.3.2	Les critères cytogénétiques	22
1.3.2.1	Le statut mutationnel des gènes IGVH (Immunoglobulin variable heavy-chain)	22
1.3.2.2	Les mutations associées à un bon pronostic (pathologie modérée)	23
1.3.2.3	Les mutations associées à un mauvais pronostic (pathologie agressive)	23
1.3.2.4	Les mutations génomiques récurrentes	24
1.3.3	Les critères biologiques	25
1.3.3.1	CD38	25
1.3.3.2	ZAP70	25
1.3.3.3	La lipoprotéine lipase ou LPL	26
1.3.3.4	CD49d	26
1.3.3.5	CD26	26
1.3.3.6	Les facteurs solubles	27
1.3.3.7	La maladie résiduelle	28
1.4	L'évolution de la pathologie	28
1.4.1	Les complications infectieuses	29
1.4.2	Les complications auto-immunes	29
1.4.3	Les complications tumorales	29
1.4.4	Les évolutions clonales	30
1.5	Les traitements	30
1.5.1	Les premiers traitements	31
1.5.2	L'immunothérapie	31
1.5.2.1	Les anticorps monoclonaux	32
1.5.2.2	Les immunomodulateurs	33
1.5.3	La transplantation des cellules souches hématopoïétiques	35

Table des matières

1.6	La physiopathologie	
1.6.1	L'origine cellulaire du lymphocyte B de LLC	
1.6.2	Le phénotype des lymphocytes B de LLC	
1.6.3	Le rôle de la stimulation antigénique	
1.6.4	La déficience des processus apoptotiques	40
1.6.5	La prolifération du lymphocyte B de LLC	43
1.6.6	Le microenvironnement tumoral	44
1.6.7	Les perturbations du système immunitaire	46
1.6.7.1	Les perturbations du système immunitaire inné	47
1.6.7.2	Les perturbations du système immunitaire adaptatif	49
1.6.7.2.1	L'immunité cellulaire	49
1.6.7.2.2	L'immunité humorale	50
2 LES LY	MPHOCYTES B REGULATEURS	
2.1	L'ontogenèse les lymphocytes B	52
2.2	La découverte des LB régulateurs	53
2.2.1	Historique des LB régulateurs	54
2.2.2	Les différents types de LB régulateurs	55
2.2.2.1	Les premières caractérisations	56
2.2.2.2	Les LB régulateurs dits B10	56
2.2.2.3	L'émergence des populations LB régulatrices	57
2.2.3	Les mécanismes d'induction des LB régulateurs	60
2.2.3.1	Le signal CD40	60
2.2.3.2	Le signal du BCR	61
2.2.3.3	L'implication des récepteurs Toll-like	61
2.2.3.4	Les facteurs solubles	63
2.2.3.5	Les autres signaux	64
2.2.4	Les mécanismes d'action des LB régulateurs	64
2.2.4.1	Le contrôle de la réponse immunitaire adaptative	64
2.2.4.2	Le contrôle de la réponse immunitaire innée	67
2.3	Les LB régulateurs dans le cancer	69
2.3.1	Les mécanismes de suppression de la réponse anti-tumorale	69
2.3.2	Le rôle clé des cellules tumorales dans la génération des LB régulateurs	71
3 L'OBJI	ECTIF DE LA THESE	
A NINITAT	R 1	— 4
AININEA	E 1	

A	ANNEXE 2		
Μ	IATERIEL ET METHODES76		
4	LES PATIENTS ET CONTROLES77		
5	LA PURIFICATION CELLULAIRE77		
6	LA CULTURE CELLULAIRE78		
6.1	Analyse de la prolifération des LT		
6.2	2 Analyse de l'activation des LB		
7	LA CYTOMETRIE EN FLUX		
8	LE DOSAGE DES CYTOKINES PAR ELISA82		
9	L'ANALYSE QUANTITATIVE PAR RT-PCR		
9.1	L'extraction de l'ARN total		
9.2	2 La rétro-transcription		
9.3	3 La PCR quantitative		
10	LE STATUT MUTATIONNEL DES GENES <i>IGVH</i> 90		
11	LES STATISTIQUES		
R	ESULTATS		
12	CARACTERISATION DE LA FONCTION REGULATRICE DES LYMPHOCYTES B DE LLC94		
12	.1 Spontanément les LB de LLC sont incapables de réguler la prolifération des LT94		
12	.2 L'absence d'activité régulatrice des LB de LLC n'est pas due à un défaut de		
	prolifération ou de sensibilité de réponse des LT de LLC		
12	.3 Les LB de LLC présentent une faible densité de CD40 à leur surface en comparaison		
	aux LB de témoins		
12	.4 L'interaction CD40-CD40L joue un rôle primordial dans l'induction de la fonction		
	régulatrice des LB de témoins		
12	.5 La signalisation CD40 semble déficiente dans les LB de LLC101		
12	.6 L'induction de l'activité régulatrice par la stimulation TLR-9 permet de discriminer		
	deux groupes de patients102		
12	.7 Les facteurs sériques n'influencent pas l'activité régulatrice des LB de LLC		

12.8	Les LB de LLC reg faible et les LB de LLC reg neg présentent un phénotype identique.	
12.0		
12.9	L'activité régulatrice des LB de temoins est correlee à la secretion de TGF-p	
12.10	La stimulation ILR-9 par du CpG ODN permet d'activer les LB de LLC	reg faible et
10.11	les LB de LLC reg neg	
12.11	La signalisation IRL-9 diffère entre les LB de témoins et les deux groupes c	le patients
		113
12.12	L'expression des gènes de la voie TLR-9 suggère des disparités entre les des	ix groupes
		116
13 ETUI	DE DES CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTS EN FONCTION DE L	L'ACTIVITE
REGU	LATRICE DES LYMPHOCYTES B	
13.1	Les données cliniques des patients	119
13.2	Caractérisation du statut mutationnel des gènes IGVH	120
13.3	L'activité régulatrice des LB de LLC est corrélée au temps avant l'entrée d	lu patient en
	traitement et au temps de doublement lymphocytaire	123
14 ETU	DE LONGITUDINALE	124
DISCU	SSION	128
15 I A C	Α Β Α CTEDISATION DE LA FONCTION DECUI ATDICE	179
15 LAC.	Les indiges laissant présager une fonction régulatrice	120
15.1	Les indices laissant presager l'absonce de fonction régulatrice	129
15.2	Les multes faissant envisager l'absence de fonction regulatrice	130
15.5	Le choix du modele experimental	130
16 LE D	EFAUT DE REGULATION DES LYMPHOCYTES B DE LLC	
16.1	L'absence de fonction régulatrice spontanée	131
16.2	Discrimination de deux groupes de patients sous stimulation CpG-ODN	133
16.3	Disparités d'expression des gènes associés aux voies TLR	
17 L'EL	IMINATION DES FACTEURS EXTERIEURS POUVANT INFLUENCER LA	FONCTION
REGU	LATRICE	
17.1	L'impact de l'hyperlymphocytose	136
17.2	L'impact du microenvironnement	136
17.3	L'impact des LT	137
18 L'im	PLICATION CLINIQUE	138
19 Cond	CLUSION ET PERSPECTIVES	

ANNEXE 3	
ANNEXE 4	
BIBLIOGRAPHIE	

Liste des illustrations

Figure 1.	Les facteurs pronostics
Figure 2.	Les différentes molécules thérapeutiques
Figure 3.	La stimulation antigénique du BCR chez les patients atteints de LLC40
Figure 4.	L'apoptose: voies et régulation
Figure 5.	Le microenvironnement tumoral de la LLC
Figure 6.	Les principales dérégulations du système immunitaire dans la LLC
Figure 7.	L'ontogenèse des cellules B
Figure 8.	Les mécanismes de contrôle de la réponse immunitaire par les LB régulateurs
Figure 9.	Les LB régulateurs suppresseurs de la réponse anti-tumorale
Figure 10.	Spontanément les LB de LLC sont incapables de réguler la prolifération des LT95
Figure 11.	Comparaison des sous-populations lymphocytaires T entre témoins et patients LLC96
Figure 12.	Les LT de LLC et de témoins présentent la même capacité proliférative
Figure 13. témoins	Les LT de LLC tout comme les LT de témoins sont sensibles à la régulation par les LB
Figure 14.	Phénotypage des LB de LLC et LB de témoins
Figure 15. témoins	Le blocage de l'interaction CD40-CD40L inhibe l'activité régulatrice des LB de
Figure 16. avec le pourc	L'expression du récepteur CD40 à la surface des LB de témoins tend à être corrélée entage d'inhibition de la prolifération
Figure 17.	La stimulation CD40 ne permet pas d'activer les LB de LLC
Figure 18. deux groupes	L'induction de l'activité régulatrice par la stimulation TLR-9 permet de discriminer de patients

Figure 19.	La prolifération des LT de témoins et des LT de LLC est régulée de façon identique par
les LB de LLO	C et les LB de témoins
Figure 20.	Les LB de LLC stimulés avec du CpG-ODN n'induisent pas une mortalité exacerbée
des LT quel q	ue soit le groupe de patients
Figure 21.	Le sérum autologue des patients LLC semble augmenter leur activité régulatrice 106
Figure 22.	Le sérum de LLC et le sérum de témoins agissent de façon identique sur l'activité
régulatrice de	s LB
T ! A A	
Figure 23.	Les LB de LLC présentent un phénotype identique quel que soit leur activité
régulatrice.	108
Figure 24.	La fonction régulatrice des LB de témoins est corrélée positivement à la sécrétion de
TGF-β en co-	culture tandis que celle des LB de LLC est négativement corrélée au taux d'IFN-7110
Figure 25.	Les LB de LLC sont capables de repondre à une stimulation CpG-ODN quel que soit
leur groupe d'	appartenance
Figure 26.	L'expression du récepteur CD40 est induite sous stimulation CpG-ODN à la surface des
LB de témoin	s et des deux groupes de patients LLC112
F: 07	
Figure 27.	Le blocage de l'interaction CD40-CD40L n'influence pas la fonction regulatrice de LB
de LLC reg la	indie en presence de CpG-ODN
Figure 28.	Les LB de témoins et les LB de LLC présentent une expression différentielle des gènes
associée aux v	voies TLR et notamment de la signalisation TLR-9
E:	E-market differentially described and its in TID 0 dama has ID de LLC and
Figure 29.	Expressions differentielles des genes associes à la voie TLR-9 dans les LB de LLC reg
laible et reg n	eg en comparaison aux LB de temoins
Figure 30.	Les différences d'expression des gènes des voies TLR entre les deux groupes de
patients sugge	erent des disparités dans leur signalisation
Figure 21	Expressions différentialles des gènes essenties à la signalization TID O dans les ID de
rigure 31.	Expressions unterentienes des genes associes à la signalisation TLK-9 dans les LB de
LLC leg laloi	כ כו וכצ ווכצ
Figure 32.	L'activité régulatrice des LB de LLC n'est pas corrélée avec le statut mutationnel des
gènes IGVH	

Figure 33.	Les patients ayant des LB avec une faible activité régulatrice nécessite une entrée en
traitement plu	s précoce que les patients n'en ayant aucune
Figure 34.	Les patients ayant des LB avec une faible activité régulatrice présentent un doublement
lymphocytaire	e plus rapide que les patients n'en ayant aucune
Figure 35.	Le phénotype des LB de LLC n'évolue pas au cours du temps
Figure 36.	Numération lymphocytaire des patients au cours des deux consultations réalisées entre 6
et 12 mois d'i	ntervalles
Figure 37.	Nombre d'aires ganglionnaires déterminées chez les patients au cours de deux
consultations	réalisés entre 6 et 12 mois d'intervalles127
Figure 38.	L'expression de CD40 est augmentée à la surface des LB ayant un gène IGVH non
muté	
Figure 39.	Le taux de mortalité des LB de LLC est inférieur à celui des LB de témoins138
Figure 40.	Les mécanismes de régulation des LB de témoins et des LB de LLC141

Liste des tableaux

Tableau 1.	Le score Matutes
Tableau 2.	Classification clinique de Rai définie en 197521
Tableau 3.	Classification clinique de Binet définie en 198121
Tableau 4.	Les différents phénotypes des LB régulateurs60
Tableau 5.	Marqueurs communs entre LB régulateurs et LB de LLC73
Tableau 6.	Liste des anticorps utilisés pour le phénotypage des lymphocytes B et T
Tableau 7.	Liste des cytokines dosées par ELISA
Tableau 8.	Liste des gènes inclus dans la plaque TaqMan array 96 Human Toll-like Receptors
pathway	
Tableau 9.	Amorces permettant l'amplification des gènes <i>IGVH</i>
Tableau 10.	Expression différentielle des gènes associés à la signalisation TLR dans les LB de LLC
reg faible et L	LC reg neg en comparaison aux LB de témoins115
Tableau 11.	Expression différentielle des gènes associés à la signalisation TLR dans les LB de LLC
reg neg en con	mparaison aux LB de LLC reg faible118
Tableau 12.	Caractéristiques cliniques des patients atteints de LLC
Tableau 13.	Le statut mutationnel des gènes IGVH des patients
Tableau 14.	Tableau clinique de l'étude longitudinale. 125

Liste des abréviations

AC	Anticorps
ADCC	Cytotoxicité à médiation Cellulaire dépendante de l'Anticorps
ADN	Acide DésoxyriboNucléotide
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ADP-ribose	Adenosine Dinucleotide Phosphate
AF700	Alexa fluor 700
AF750	Alexa fluor 750
Ag	Antigène
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor
APC	Allophycocyanine
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
APTs	Acyl-Protein Thioesteraes
ARN	Acide RiboNucléotide
ATM	Ataxia Telangiestasia Mutated
BAFF	B Cells Activating Factor
BC	Beckman Coulter
BCMA	B Cells Maturation Antigen
BCR	B Cells Receptor
BD	BD Bioscience
β2 - m	Beta-2 Microglobuline
BIP	Binding immunoglobulin protein
BIRC3	Baculoviral IAP Repeat Containing 3
BMSC	Bone Marrow Stromal Cells
Breg	Lymphocytes B Régulateurs

BTK	Bruton Tyrosine Kinase
CAR	Récepteurs Antigéniques Chimeriques
CDC	Cytotoxicité induite par le Complément
CDR3	Complementary Determining Region 3
СМН	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTV	CellTrace Violet
DC	Cellules Dendritiques
DD	Domaines de mort
Dntp	Désoxyribonucléotides Triphosphates
DTT	Dithiothréitol
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune
ECD	Phycoérythrine - Texas red
FDC	Cellules Dendritiques Folliculaires
FITC	Isothiocyanate de Fluorescéine
FoxP3	Forkhead Box P3
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GrB	granzyme B
GRM	Globules Rouges de Moutons
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IDO	Indoleamine-2,3-Dioxygenase
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobulines
IGVH	Immunoglobulin Variable Heavy-Chain
IND	indéterminé
КО	Krome Orange
LAP	Latency-Associated Peptide

LB	Lymphocytes B
PB	Pacific Blue
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
LED	Lupus Erythémateux Disséminée
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LPL	LipoProtéine Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocytes T
LTαβ	Lymphotoxin alpha beta
М	Muté
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDR	Minimal Residual Disease
MDSC	Cellules Suppressives Dérivées des Monocytes
MIP1-α	Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha
miR	micro-ARN
MZ	Zone Marginal
NAD	Nicotinomide Adenine Dinucleotides
NCL	Nurses-Like Cells
NF-Kb	Nuclear Factor Kappa B
NK	Natural Killers
NKT	Natural Killers T cells
NM	Non Muté
NS	Non Significatif
OLS	Organes Lymphoïdes Secondaires
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC5.5	Péridinine chlorophylle protéine – cyanine 5

PC7	Phycoérythrine Cyanine 7
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
pDC	Cellules Dendritiques Plasmacitoïdes
PE	Phycoérythrine
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SHABdec	Sérum Humain AB décomplémenté
SEM	Standard Error of the mean
STIM1	Stromal interaction molécule 1
SVF	Sérum de veau fœtal
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TACI	Transmenbrane Activator and CAML Interactor
tBreg	tumor-evoked regulatory B cells
TCR	T Cells Receptors
Tfh	Lymphocytes T folliculaires helpers
Tfr	Lymphocytes T folliculaires régulateurs
TFT	time to first treatment
TGF - β	Transforming Growth factors
Tie2	Angiopoitine 2
TIM-1	T cell immunoglobuline mucine domain 1
ТК	Thymidine Kinase
TLR	Toll-Like Receptor
T2-MZP	LB transitionnels précurseurs de la zone marginale
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
Tr1	Lymphocytes T Régulateurs 1
Treg	Lymphocytes T Régulateurs

- VEFG Vascular Endothelial Growth Factor
- VIH virus de l'immunodéficience humaine
- ZAP70 Zeta-Associated Protein of 70 kDa

INTRODUCTION

Introduction

1 La Leucémie lymphoïde chronique

1.1 L'épidémiologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération de lymphocytes B (LB) monoclonaux matures CD19⁺ CD5⁺ CD23⁺ dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires ainsi que par leur accumulation dans le sang. Leur clonalité cellulaire repose sur la composition de leurs immunoglobulines (Ig) de surface faiblement exprimées, constituées d'un seul type de chaine légère, kappa ou lambda, et d'une chaîne lourde. Il s'agit de la plus courante des leucémies présente dans les pays occidentaux, touchant exclusivement les adultes. Selon un rapport émis par l'institut de veille sanitaire en 2010, on estime l'apparition de près de 3 300 nouveaux cas par an rien qu'en France dont 2/3 chez les hommes [1]. Annuellement, on dénombre plus de 1000 décès dus à la pathologie. Son incidence mondiale standardisée s'élèverait à 4,2/100 000 habitants et par an [2-4]. Sur un plan clinique, la LLC est une maladie indolore dont la découverte est souvent fortuite chez des personnes âgées en moyenne de 70 ans, dont l'incidence augmente avec l'âge des patients. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif pour cette pathologie. La LLC reste donc un enjeu sanitaire mondial.

1.2 Le diagnostic

Le diagnostic de la LLC est connu depuis de nombreuses années. Il a fait l'objet de rapports établis à partir de 1978 par «The Cancer and Leukemia Group B» (CALGB) [5], réévalués par la National Cancer Institute-sponsored Working Group (NGI-WG) en 1988 [6] puis 1996 [7], apportant ainsi des recommandations sur les bonnes marches à suivre en terme de diagnostic et de traitements. Depuis 2008, le diagnostic de la LLC est basé sur la recommandation de «The International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia» (iwCLL) qui repose sur la présence d'une hyper-lymphocytose B monoclonale CD5⁺ dans le sang dont le seuil a été fixé à \geq 5 Giga/L pendant une période de plus de 3 mois [8].

Afin de distinguer les patients atteints de LLC d'autres syndromes lymphoprolifératifs, une étude phénotypique est réalisée par cytométrie en flux. Elle porte sur la présence ou non des marqueurs CD5, CD23, CD22, FMC7 et des Ig de surface ainsi que sur leur densité. Le marqueur CD5 est une glycoprotéine habituellement fortement exprimée sur les LT et faiblement sur une petite proportion de LB ($\approx 15\%$ appelés B-1). Les LB de LLC possèdent typiquement une forte densité de CD5 à leur surface. Son rôle serait directement lié à la signalisation du BCR et aux mécanismes d'induction de l'apoptose [9]. La molécule CD23 est un récepteur de faible affinité pour les IgE, dont l'expression est corrélée à la progression de la pathologie. L'anticorps FMC7 permet la reconnaissance d'un épitope du récepteur CD20, faiblement exprimé dans la LLC. Un score immunophénotypique a été établi en 1994 par Matutes *et al*, complété en 1997 par Moreau *et al*, en remplaçant la caractérisation du marqueur CD22 par celle de CD79b plus propice au diagnostic, ces deux molécules étant directement impliquées dans la transduction du signal BCR et faiblement ou non exprimées dans les LB de LLC [10, 11]. Depuis 1997, le score du Royal Marsden Hospital ou score Matutes est toujours d'actualité (Tableau 1.), un score ≥ 4 relevant d'un diagnostic positif.

SCORE	1	0
CD5	+	-
CD23	+	-
Immunoglobulines de surface	Faible	Forte
FMC7	-	+
CD79b	Faible	Forte

Immunophénotypage des LB permettant le diagnostic de la LLC d'après Matutes *et al* et Moreau *et al* [10, 11]. Un score supérieur ou égal à 4 confirme le diagnostic de la LLC. Un score inférieur à 3 élimine le diagnostic de la LLC. Un score égal à 3 nécessite de plus ample investigations. + = expression du marqueur; - = absence d'expression du marqueur.

1.3 Les facteurs pronostics

La LLC est une pathologie extrêmement hétérogène, dont l'évolution et l'agressivité dépendent de plusieurs critères cliniques, cytogénétiques ou encore phénotypiques. Ces facteurs pronostics (Figure 1) permettent d'évaluer l'évolution de la pathologie et d'adapter l'entrée en traitement des patients dans un protocole adéquat.



Figure 1. Les facteurs pronostics.

Illustration des principaux facteurs pronostics génétiques ou protéiques dans la LLC associés à un caractère aggravé ou non de la pathologie d'après Rosenquist *et al* [12]. L'agressivité de la pathologie est associée aux mutations de NOTCH1 et BIRC3 qui vont moduler la signalisation NF- κ B et la prolifération des LB, tout comme la surexpression de ZAP70. La mutation ou la délétion de TP53 va quant à elle résulter d'un dysfonctionnement du contrôle du cycle cellulaire et de l'absence d'entrée en apoptose.

1.3.1 Les critères cliniques

La classification des patients par groupe clinique date des années 1970. Elle est basée sur la lymphocytose, le développement d'aires ganglionnaires (adénopathies), l'anémie (faible taux d'hémoglobine) et la thrombopénie (faible taux de plaquettes). En 1975, Rai *et al* propose une classification en 5 groupes de 0 à IV (Tableau 2.) ayant une médiane de survie allant respectivement de plus de 10 ans à 20 mois [13]. En 1981, Binet *et al* définissent une classification plus restreinte de trois groupes A, B, C (Tableau 3.) pour des médianes de survie de plus de 10 ans, plus de 5 ans ou inférieur à 2 ans respectivement [14]. Actuellement l'une ou l'autre de ces classifications est toujours prise en compte lors de la prise en charge des patients.

Un autre critère clinique est apparu très tôt dans le suivi de la pathologie, il s'agit du temps de doublement lymphocytaire. Concrètement, le temps de doublement se traduit par le nombre de mois écoulé entre le diagnostic et le moment où le taux de lymphocytes dans le

sang des patients a doublé. L'établissement de ce critère date de la fin des années 1980 [15, 16]. Il s'avère que les patients ayant un temps de doublement lymphocytaire < 12 mois présentent une progression rapide de la pathologie qui va nécessiter une entrée en traitement précoce, ainsi qu'une médiane de survie plus courte, en comparaison avec les patients ayant un temps de doublement lymphocytaire ≥ 12 mois. Par ailleurs, associé à une étude du stade clinique de Binet, le temps de doublement permet de différencier à l'intérieur même d'un groupe, la progression de la pathologie pour chaque patient et apporte ainsi un complément d'informations important pour leur surveillance et prise en charge [17].

Stades	Pronostic	Caractéristiques	Médiane de survie (Années)
0	Bon	Lymphocytose ≥ 5Giga/L	>10
Ι	Modéré	Lymphocytose ≥ 5Giga/L + Adénopathies	≈8
II	Modéré	Lymphocytose ≥ 5Giga/L + Adénopathies + Hépato ou splénomégalies	≈5
Ш	Mauvais	Lymphocytose ≥ 5Giga/L + Adénopathies + Hépato ou splénomégalies + Hémoglobine < 11g/dL	≈2
IV	Mauvais	Lymphocytose ≥ 5Giga/L + Adénopathies + Hépato ou splénomégalies + Hémoglobine < 11g/dL + Plaquettes < 100Giga/L	≈2

Tableau 2.	Classification	clinique de	e Rai	définie ei	n 1975.
------------	----------------	-------------	-------	------------	---------

Tableau 3.Classification clinique de Binet définie en 1981.

Stades	Pronostic	Caractéristiques	Médiane de survie (Années)
Α	Bon	Lymphocytoses ≥5Giga/L	>10
В	Modéré	Lymphocytoses ≥5Giga/L + Aires ganglionnaires ≥ 3	≈5
C	Mauvais	Lymphocytoses ≥5Giga/L + Aires ganglionnaires ≥ 3 + Hémoglobine < 10g/dL + Plaquettes < 100Giga/L	≈2

1.3.2 Les critères cytogénétiques

Les anomalies cytogénétiques sont détectées chez plus de 80% des patients atteints de LLC [18] par hybridation *in situ* en fluorescence. Durant de nombreuses années, l'analyse de ces mutations permettait d'étoffer le pronostic et de classer les patients selon l'agressivité de leur pathologie. Aujourd'hui à la lumière de certains résultats, la caractérisation de certaines mutations s'avère également nécessaire avant toutes prises de décisions thérapeutiques, certaines mutations étant fortement corrélées avec la résistance aux traitements. Il est à noter qu'un même patient peut présenter plusieurs de ces anomalies.

1.3.2.1 Le statut mutationnel des gènes IGVH (Immunoglobulin variable heavychain)

L'une des caractéristiques d'un lymphocyte B de LLC est la faible expression des Ig à sa surface et donc une faible expression de son récepteur d'antigène (B cell receptor, BCR). La spécificité de ce BCR vis-à-vis d'un antigène survient suite aux réarrangements de ses gènes V-D-J des chaines légères et lourdes. Ce dernier peut également subir une hypermutation somatique, c'est-à-dire des mutations ponctuelles de sa région variable après activation et passage dans le centre germinatif. Parmi l'ensemble des marqueurs pronostics, le statut mutationnel des gènes *IGVH* est sans doute le moins controversé. Dès 1999, Damle *et al* et Hamblin *et al* ont décrit une corrélation entre la progression de la pathologie et le statut mutationnel de la région variable des chaines lourdes des Ig [19, 20]. La caractérisation du statut mutationnel permet de définir deux groupes de patients ayant une séquence IGVH mutée ou non-mutée c'est-à-dire ayant un pourcentage d'identité < 98% ou \geq 98% avec la séquence germinale. Les patients ayant des gènes *IGVH* mutés (\approx 40%) présentent une maladie peu progressive (médiane de survie \approx 293 mois) et un pronostic favorable. Tandis que les patients ayant des gènes *IGVH* non-mutés (\approx 60%), développent une pathologie à caractère agressif (médiane de survie \approx 95mois) et un pronostic défavorable.

Toutefois, une exception a été identifiée chez les patients présentant un réarrangement *IGVH3-21* (\approx 3%) [21] puisque ces derniers présentent un pronostic de survie défavorable indépendamment du statut mutationnel [22]. En 2004, Messmer *et al* ont mis en évidence qu'un groupe de patients (\approx 20%) partagé un BCR dit «stéréotypé» c'est-à-dire ayant un même arrangement ainsi qu'une région de reconnaissance antigénique CDR3 (complementary determining region 3), de taille identique et dont les séquences présentent une homologie de

plus de 60% entre elles [23]. Cette découverte suggère le rôle clé d'une stimulation antigénique restreinte dans la leucémogénèse sans toutefois apporter de réelles réponses quant à l'implication de cette «stéréotypie» dans le pronostic de la pathologie [24, 25].

Enfin, ce statut mutationnel est également corrélé à d'autres facteurs pronostiques (développés ci-dessous), comme la délétion (17p), la délétion (11q), l'expression de CD38 et ZAP70 avec un statut IGVH non-muté et la délétion (13q) à contrario [26].

1.3.2.2 Les mutations associées à un bon pronostic (pathologie modérée)

del(13q): La délétion sur le bras long du chromosome 13, en particulier dans la région 13q14, a été décrite pour la première fois par Fitchett *et al* en 1987 [27]. Elle représente la mutation génétique la plus courante chez les patients atteints de LLC (\approx 55%). Cette mutation a longtemps été associée à un bon pronostic pour les patients [18]. Des études récentes ont cependant démontré que plus le pourcentage de cellules mutées chez un patient était élevé, plus son pronostic se dégradait, entrainant une entrée en traitement rapide et une espérance de vie diminuée [28, 29]. Par ailleurs, la délétion de la région 13q14 a été retrouvée dans de nombreux autres types de cancers notamment celui de la prostate [30] ou les myélomes multiples [31], suggérant l'implication anti-tumorale des gènes codés dans cette région. Parmi eux l'on retrouve de nombreux micro-ARN tels que *miR15a/16-1* [32], *miR143/155* [33] régulant des gènes anti-apoptotiques par exemple Bcl2 ou MDM2 [34] ou impliqués dans la prolifération comme DLEU2 [35]. La dérégulation de ces gènes résulterait en l'inhibition de l'apoptose et l'augmentation de la prolifération dans les B leucémiques chez les patients atteints de LLC. La régulation des micro-ARNs pourrait donc constituer des cibles thérapeutiques.

1.3.2.3 Les mutations associées à un mauvais pronostic (pathologie agressive)

del(11q): La délétion sur le bras long du chromosome 11 représente environ 18% des anomalies chromosomiques chez les patients atteints de LLC associée à un pronostic aggravé de la pathologie [18]. Le fragment principalement touché, 11q22-q23 code pour le gène *ATM* (ataxia telangiestasia mutated) [36], suppresseur de tumeurs notamment impliqué dans les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN [37]. Plus récemment, la mutation du gène *BIRC3* (Baculoviral IAP repeat containing 3), régulateur négatif de la voie NF- κ B a été mise en lumière et impliquée dans un phénomène de résistance à la fludaradine (analogue des purines) [38].

Tri12: La trisomie 12 est observée chez environ 16% des patients présentant une anomalie chromosomique [18]. Elle est associée à un pronostic intermédiaire pour les patients [39], nécessitant une surveillance accrue du fait de la convergence des patients vers un syndrome de Richter ou le développement d'un autre type de cancer [40]. L'implication de cette aberration dans la physiopathologie de la maladie est peu connue. Une modulation des molécules intégrines (CD11b, CD49b CD18...) [41] ainsi que de certaines chimiokines (CXCL12, CCL21) [42] semble cependant suggérer une implication de la mutation dans la migration des cellules leucémiques vers la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques, indispensable à leur survie et leur prolifération. Par ailleurs, des associations entre la présence d'une trisomie 12 et d'autres mutations telles que *Notch1* [43] ont été définies, conférant un caractère aggravé à la maladie.

del(17p): Environ 7% des patients atteints de LLC présentent une délétion sur le bras court du chromosome 17, en particulier dans la région 17p13 [18]. Cette aberration est associée à la mutation du gène suppresseur de tumeurs *TP53*, dont la présence compromet fortement l'efficacité de thérapies incluant la fludarabine et la cyclophosphamide (agent alkylant de l'ADN) [44]. La mutation *TP53* est par ailleurs retrouvée chez 4 à 6% des patients indépendamment de la délétion 17p, faisant de ce gène un marqueur unique de mauvais pronostic associé à une faible survie et une augmentation des résistances aux traitements [45].

1.3.2.4 Les mutations génomiques récurrentes

Au-delà de la caractérisation des anomalies précédemment décrites, de plus en plus de mutations génétiques récurrentes ont été découvertes grâce à des techniques de «wholegenome sequencing» et incriminées dans le développement de la pathologie [46]. Ces mutations touchent en particulier des processus physiologiques important de la cellule: la voie de signalisation Notch (*Notch1*), la réponse inflammatoire (*MYD88*, *BIRC3*), la signalisation Wnt (*SF3B1*), les voies de réparation des dommages de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire (*ATM*, *TP53*), la modification de la chromatine ou encore les processus d'épissage alternatif (*SF3B1*). Moins décrites, mais tout de même représentées chez 43% des patients, les translocations n'en demeurent pas moins de bons indicateurs quant à l'évaluation du temps avant l'entrée en traitement (7 mois contre 36 sans translocation), les résistances à celui-ci (\approx 57% de réponse à la cladribine) ou au pronostic de survie (12 mois contre 68 en absence de translocations) des patients [47, 48]. Enfin, avec le développement de nouvelles techniques de pointe en matière de séquençage, la liste (non exhaustive) des aberrations chromosomiques ne cesse d'augmenter, parmi elles: le gain de la chaine courte du chromosome 2 (\approx 2% des patients) [49], la délétion du bras long du chromosome 6 (\approx 7.5% des patients) [50] ou du chromosome 14 [51].

1.3.3 Les critères biologiques

1.3.3.1 CD38

La molécule CD38 est une ectoenzyme impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique via le clivage de NAD+ (nicotinomide adenine dinucleotides) en ADP-ribose (cyclic adenosine dinucleotide phosphate) [52]. Dès 1999, ce marqueur a été associé à un mauvais pronostic pour les patients [19]. En effet, une corrélation a pu être déterminée entre la présence d'un gène *IGVH* non-muté et un pourcentage de cellules CD19⁺ CD38⁺ \geq 30%, considéré comme le seuil de positivité pour ce marqueur. Cependant dès 2002, Hamblin *et al* [20] remettent en question ce résultat décrivant le CD38 comme un marqueur de mauvais pronostic indépendant. Sa fiabilité semble toutefois remise en doute. En effet, l'expression de ce marqueur semble augmenter avec la progression de la maladie ou certaines infections. Autre point critique, le seuil de positivité du marqueur évalué arbitrairement à 30%, se distingue selon les études et les auteurs allant ainsi d'un taux de 7% à 30% [53]. Toutefois, l'activité du CD38 a été démontrée dans la physiopathologie de la LLC en influençant la prolifération, la survie et la migration des LB leucémiques [54].

1.3.3.2 ZAP70

La molécule ZAP70 (zeta-associated protein of 70 kDa) est une protéine kinase mise en évidence en 1991 [55, 56] dans les lymphocytes T (LT) et les cellules tueuses NK (natural killers) associée respectivement à la transduction du signal TCR (T cells receptors) et CD16. Dix ans après cette découverte, Rosenwald *et al* révèlent la présence de cette tyrosine ZAP70 chez des patients souffrant de LLC sans mutation des gènes *IGVH* [57]. Plusieurs groupes corroborent ces données et vont associer ZAP70 à un facteur de mauvais pronostic associé à une progression rapide de la pathologie et à un faible taux de survie [58, 59]. Bien qu'associé

à la modulation du signal BCR, le rôle de ZAP70 dans la physiopathologie des LB de LLC soulève encore de nombreuses questions [60].

1.3.3.3 La lipoprotéine lipase ou LPL

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme impliquée dans l'hydrolyse des triglycérides. Cette enzyme est majoritairement retrouvée dans les adipocytes, les cardiomiocytes, les glandes mammaires, les îlots pancréatiques et les macrophages [61]. Absente dans les LB sains, cette enzyme a été décrite dans les années 2000 comme un nouveau critère de pronostic pour les patients atteints de LLC. Plusieurs études ont corrélé son taux d'ARN messager avec la présence de ZAP70, CD38, la mutation du gène *Notch1* ou une absence de mutations *IGVH*, la plaçant ainsi dans le groupe des facteurs de mauvais pronostic [62-64]. Au-delà de ce rôle, Pallasch *et al* ont démontré que l'apoptose des cellules de LLC pouvait être déclenchée en inhibant la sécrétion de LPL, faisant de cette enzyme une cible thérapeutique potentielle [65].

1.3.3.4 CD49d

CD49d ou ITGA4 appartient à la famille des alphas intégrines, son rôle a été principalement décrit dans la migration, l'activation ou la survie des leucocytes. En 1996, elle a été décrite pour la première fois dans la LLC [66]. Son niveau d'expression à la surface des B leucémiques a été mis en regard de la progression de la maladie (CD49d^{faible} = Stade de Rai 0 à II ; CD49d^{fort} = Stade de Rai III et IV). Par la suite, la sur-expression de CD49d a été corrélée à celle des marqueurs CD38 et ZAP70, la présence du gène *IGVH* non-muté, une entrée en traitement précoce et une médiane de survie faible en comparaison avec des patients présentant des B leucémiques CD49d^{faible}, faisant de ce marqueur membranaire un excellent marqueur pronostique [67, 68].

1.3.3.5 CD26

CD26 est une glycoprotéine retrouvée à la surface des LT, des cellules NK et des LB activés. Son rôle dans la progression de plusieurs types de cancer a été suggéré. Dans le cadre de la LLC, la forte expression de CD26 (> 10%) a été décrite comme un nouveau facteur de pronostic défavorable, associé à un temps de doublement lymphocytaire court et une entrée rapide en traitement sans toutefois être corrélé au taux de survie globale des patients [69, 70].

1.3.3.6 Les facteurs solubles

Au-delà des marqueurs génétiques et phénotypiques, il est à noter que le taux de certains facteurs sériques non spécifiques à la LLC apporte une valeur prédictive à la pathologie.

La béta-2 microglobuline (β 2-m) est une protéine qui compose le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMHI) jouant ainsi un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire. Mais elle peut être dosée sous sa forme libre dans le sang, les urines ou le liquide céphalorachidien. Son élévation au niveau sanguin a été définie comme un marqueur de masse tumorale, notamment pour les myélomes. Dans la LLC, un taux supérieur à la normal (< 3mg/l) détecté précocement a été décrit comme facteur de mauvais pronostic [71]. Toutefois, la fiabilité de ce marqueur peut être remise en question, car il peut également refléter une défaillance rénale [72].

La protéine CD23 est un récepteur de faible affinité pour les IgE, une Ig impliquée dans l'allergie. Sous sa forme soluble, elle est détectable dans le sérum des patients. Tout comme pour la β 2-m, un taux trop élevé de sCD23 (> 574U/ml) a été associé à des stades avancés de la pathologie et à un risque de mortalité plus élevé à court terme [73, 74].

La thymidine kinase (sTK) est une enzyme dont l'activité reflète la prolifération des cellules et notamment tumorales (présence d'une isoforme en phase G1/S du cycle cellulaire). Il semblerait alors qu'un taux élevé de cette enzyme (> 7.1U/L) chez les patients LLC soit synonyme de progression rapide de la pathologie [75].

La chimiokine CCL3, aussi connu sous le nom MIP1- α (macrophage inflammatory protein 1 alpha) est sécrétée suite à une activation du BCR des cellules de LLC au sein de son microenvironnement. En 2011, Sivina *et al* ont décrit ce chimioattractant comme un facteur de pronostic robuste et indépendant [76]. En effet, il semblerait que plus le taux de CCL3 dans le sérum des patients est élevé (> 10pg/ml) plus le patient entrera rapidement en traitement. Des associations entre le taux de CCL1 et d'autres marqueurs de mauvais pronostic ont également été décrites (ZAP70⁺, CD38⁺, IGVH muté,..).

27

Introduction

1.3.3.7 La maladie résiduelle

Le développement de différents protocoles thérapeutiques a permis de diminuer fortement la progression de la pathologie, sans toutefois l'éradiquer complètement. Bien qu'en rémission complète d'un point de vue clinique (lymphocytes < 4 GIGA/L, absence d'aires ganglionnaires palpables, absence de splénomégalie, numération sanguine normale), les rechutes sont importantes [8]. Conséquence de ces rechutes, la maladie résiduelle, c'est-àdire la persistance de LB de LLC dans l'organisme du patient, va en effet conditionner l'évolution de la pathologie, différentes études démontrant un allongement de la survie sans progression (une médiane de 76 mois pour les patients sans maladie résiduelle contre 40 mois avec maladie résiduelle détectée après traitement) ainsi que de la survie globale chez les patients MDR⁻ (minimal residual disease negative) [77]. L'évaluation de la maladie résiduelle semble aujourd'hui un élément crucial pour le corps médical afin de déterminer la réussite d'un traitement, mais en fait également un facteur pronostic majeur à prendre en compte pour le suivi des patients [78]. La sensibilité de détection de la maladie résiduelle est donc importante, aujourd'hui elle est détectable avec une fiabilité à un taux de 1 LB de CLL pour 10000 leucocytes. Avec le développement de techniques de pointe, plusieurs groupes ont tenté d'améliorer cette détection, par l'utilisation de panels multi-couleurs par cytométrie en flux (CD19, CD20, CD5, CD43, CD81, CD79b) ou par une technique de séquençage «ClonoSeq» (taux de détection 1 LB de LLC / 1 million de leucocytes) [79].

1.4 L'évolution de la pathologie

Au cours du développement de la pathologie, des complications cliniques peuvent survenir. Les patients sont sujets à de nombreuses infections virales ou bactériennes, au développement de maladies auto-immunes et de cancers solides, en raison d'un dérèglement de leur système immunitaire. Parmi ces dysfonctionnements, on notera d'une part une hypogammaglobulinémie limitant la réponse humorale et d'autre part des dysfonctionnements des LT, des cellules NK ou encore des granulocytes rendant les réponses immunitaires innées et adaptatives peu efficaces [80]. L'ensemble de ces anomalies du système immunitaire seront développées dans le chapitre dédié à la physiopathologie de la LLC (1.6.7).

1.4.1 Les complications infectieuses

Les patients atteints de LLC sont sensibles ($\approx 60\%$) à de multiples infections opportunistes (67% de type bactériennes, 25% de type virales, 7% de type parasitaires) de par leur système immunitaire défectueux et du fait des différents traitements subit aggravant la déficience des cellules immunitaires. Les infections les plus courantes sont de types respiratoires (*Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* ...), urinaires (*Escherichia coli*), virales (zona, Herpes Virus, Cytomégalovirus, Hépatites...) ou encore fongiques (*Candida, Aspergillus...*) [81].

1.4.2 Les complications auto-immunes

On dénombre entre 10 à 20% de patients susceptibles de développer des syndromes auto-immuns au cours de leur pathologie, suite à une sécrétion d'auto-anticorps polyclonaux par les LB non leucémiques (dans 90% des cas). La plupart vont toucher les cellules sanguines et provoquer des anémies hémolytiques auto-immunes ou des purpuras thrombocytopéniques idiopathiques et dans moins de 1% des cas une aplasie pure des globules rouges [80, 82]. Beaucoup plus rarement les patients développeront des maladies «non hématologiques» de types polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé, glomérulonéphrite auto-immune ou pemphigus bulleuse, syndrome de Sjögren pour ne citer que quelques exemples [83]. Ces désordres sont préférentiellement retrouvés chez des patients de stade Binet A (36%) contrairement aux maladies auto-immunes hématologiques présentes à 54% en stade C.

1.4.3 Les complications tumorales

Les patients atteints de LLC possèdent un risque accru de développer un cancer solide et en particulier les cancers de la peau [84]. Une étude entre 1992 et 2007 établie par le programme SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results, USA) a permis de déterminer que le risque de développer un mélanome (Ratio d'incidence standardisé (RIS): 2,3) ou un carcinome à cellules de Merkel (RIS: 8,3), une forme rare et agressive des cancers de la peau, est supérieur chez les patients atteints de LLC et en particulier chez les hommes de moins de 50 ans. Des cas de développement de cancers du sein, colorectal, du foie, des poumons, des ovaires, du pancréas et de la prostate ont également été décris avec une survie globale diminuée en comparaison à des patients atteints par ces mêmes cancers mais n'ayant jamais déclaré de LLC [85, 86].

Le syndrome de Richter est le résultat d'une évolution de la LLC vers un lymphome agressif. Il est décrit chez 2 à 9% des patients atteints de LLC, en particulier chez des patients présentant un gène *IGVH* non-muté, une délétion (11q), une délétion (17p) ainsi qu'une expression élevée des marqueurs CD38 et ZAP70 [87]. Il s'agit d'une des complications les plus graves associée à la LLC avec une survie comprise entre 8 et 24 mois et une forte résistance aux traitements [88].

1.4.4 Les évolutions clonales

Bien que la LLC soit considérée comme une pathologie monoclonale du fait de l'expansion d'un lymphocyte B à chaine légère unique, elle est génétiquement très hétérogène. Le développement de techniques de pointe telles que le séquençage d'exome entier a permis de caractériser les différents clones et sous-clones lymphocytaires chez un patient, de cartographier leur apparition, de suivre leur évolution au cours de la pathologie et à la suite de traitements. En 2013, Landau *et al* suggèrent une apparition progressive des différents clones et sous-clones et sous-clones, notamment liée à l'âge du patient [89]. Ils ont pu également caractériser la présence de mutations «driver» c'est-à-dire responsables du développement tumoral (ex *MYD88*, *TP53*...) [90]. Deux types d'évolution clonales ont été mis en évidence:

- Dans le premier groupe, les résultats suggèrent une expansion clonale stable, associée à une maladie peu progressive et sans impact avec le traitement,
- Dans le second, suite au traitement du patient, une expansion anarchique des sous-clones «driver» agressifs est observée, aboutissant à une rechute, une aggravation de la pathologie et une survie moyenne diminuée.

L'évolution des différents clones et sous-clones semble donc fortement impacter l'issue clinique chez ces patients.

1.5 Les traitements

Au cours de ces dernières années, les protocoles thérapeutiques de la LLC ont fortement évolué, les monothérapies impliquant des agents alkylants ou des analogues des purines ont laissé place à des combinaisons moléculaires mêlant chimio et immunothérapie. La détermination du protocole clinique repose sur 4 critères essentiels: le stade clinique de la pathologie, l'absence de contre-indication pour un patient et un traitement donné, la présence d'aberrations génétiques et les antécédents de traitements (1^{ère} ou 2^{nde} ligne de traitement, résistances...) [91].

1.5.1 Les premiers traitements

Dans les années 1950 à 1990, le chlorambucil, un agent alkylant de l'ADN, était utilisé comme traitement de référence contre la LLC et les lymphomes (0,1mg/kg/jour) [92]. A partir des années 1990, d'autres molécules ont fait leur apparition telles que la fludarabine (25mg/m²/jours x5) [93], la pentostatine, la cladribine, qui sont des analogues des purines dont l'action cytotoxique repose sur l'inhibition d'enzyme (polymérase, ligase ...), empêchant ainsi la synthèse de l'ADN. De manière générale ces molécules ont démontré une meilleure efficacité d'action pour le traitement de la LLC par rapport aux agents alkylants [94]. Pour ne citer qu'un exemple, une étude randomisée comparant le chlorambucil et la fludarabine a démontré une meilleure efficacité de cette dernière en terme de réponse (20% de rémission complète contre 4%) et de survie sans progression (25 mois contre 20) sans toutefois démontrer de différence en matière de survie globale [95]. Initialement utilisée seule, la fludaradine combinée à la cyclophosphamide et au rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20) est aujourd'hui l'une des thérapies de référence. Il faut cependant noter que ce type de traitement s'accompagne d'une augmentation des complications cliniques et infectieuses [81].

1.5.2 L'immunothérapie

Durant ces dernières années, nous avons pu constater une émergence de nouvelles cibles thérapeutiques. Tout d'abord, le développement des connaissances technologiques a permis de synthétiser des anticorps monoclonaux chimériques, largement utilisés aujourd'hui dans les protocoles thérapeutiques de la LLC. Puis, la compréhension de la physiopathologie des B leucémiques a contribué à la production de molécules inhibitrices dirigées contre les principales voies de signalisation impliquées dans le maintien de la survie des cellules leucémiques et dans leur prolifération (Figure 2).

Introduction

1.5.2.1 Les anticorps monoclonaux

Le rituximab (Mabthera ®), un anticorps monoclonal IgG1k chimérique dirigé contre la protéine CD20, est la première molécule immuno-thérapeutique utilisée pour le traitement des patients atteints de LLC et de lymphomes [96]. Son mécanisme d'action repose sur l'activation des processus de cytotoxicité induite par le complément (CDC) et à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC), aboutissant à la déplétion des LB chez les patients. Ce traitement a cependant montré ses limites par la résistance des LB à cet anticorps, pouvant être expliqué par la faible densité de la protéine CD20 à la surface des cellules, à la présence de CD20 circulant [97] ou à l'expression des inhibiteurs du compléments CD46, CD55 et CD59 [98]. Cet anticorps est souvent associé à d'autres molécules dans le cadre de protocoles thérapeutiques telles que la fludarabine ou la bendamustine. Par la suite d'autres anticorps anti-CD20 ont vu le jour. L'ofatumumab, une Ig de haute affinité pour le CD20, a démontré son activité chez des patients résistants à la fludarabine et à l'alemtuzumab, un anticorps monoclonal humanisée anti-CD52 (58% de patients répondeurs, 57% de rémission complète) [99]. Récemment, des études in vitro sur l'obinutuzumab (GA101), un anticorps monoclonal humanisé anti-CD20, ont suggéré un rôle supérieur de cet anticorps par rapport au rituximab sur la viabilité cellulaire (respectivement 11% vs 6%) et la déplétion des LB (respectivement 33% vs 12%) [100]. Les premières études cliniques comparant ces deux molécules semblent être également encourageantes. La prise d'obinutuzumab permet en effet d'augmenter la survie sans progression (29,4 mois vs 15,4 mois) et d'améliorer la survie globale de patients (45 décès contre 63) [101].

L'alemtuzumab (Mabcampth ®) est un anticorps monoclonal IgG1k humanisé dirigé contre la protéine CD52 présente à la surface de toutes les populations lymphocytaires, monocytes et macrophages à l'exception de cellules souches hématopoïétiques. Tout comme le rituximab, il agit soit par CDC, ADCC ou apoptose directe de la cellule cible avec un taux moyen de réponse à 33% et une amélioration des paramètres cliniques (diminution de l'état de fatigue, amélioration de la numération, diminution des aires ganglionnaires..) [102]. Les infections suite à ce traitement sont tout de même fréquentes (\approx 55%). Le réel intérêt de cette molécule réside dans son efficacité thérapeutique chez des patients présentant des mutations des gènes *TP53* (40% de répondeurs) ou *del(11q)* (27% de répondeurs) souvent touchés par de multiples résistances aux traitements [103].

1.5.2.2 Les immunomodulateurs

La voie du BCR (1.6.3) est impliquée dans différents mécanismes de survie du LB leucémique. Il s'agit de la principale voie ciblée pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Les principales molécules décrites sont:

- La fostamatinib, un inhibiteur de la protéine kinase spleen tyrosine kinase (SYK) impliquée dans la transduction du signal BCR. Cette molécule permet de diminuer les signaux d'activation (CD38, CD86) et la prolifération (Ki67) des LB leucémiques *in vitro* [104]. Les résultats des premières études cliniques révèlent une efficacité du traitement sur 55% des patients, tous en rémission partielle [105].
- L'idelasisib (CAL-101) est un inhibiteur de l'isoforme delta de la Phophoinositide 3-Kinase (PI3K). Ce dernier inhibe la phosphorylation des protéines kinase B (AKT) ou les mitogen-activated protein kinase (MAPK) et induit l'apoptose des LB sans endommager les LT ou les cellules NK. Les premières données cliniques sont encourageantes avec 72% de répondeurs indépendamment des anomalies génétiques [106].
- L'ibrutinib (PCI-32765) est un inhibiteur de Bruton tyrosine kinase (BTK), molécule impliquée dans la transduction du signal BCR et NF-κB. Testé en protocole clinique, son taux de réponse est de 71%, toutes aberrations génétiques confondues [107].
- Le dasatinib, un inhibiteur des kinases de la famille Src et Abl, quant à lui ne semble avoir qu'un effet mineur sur la diminution du nombres d'aires ganglionnaires en monothérapie [108].

Les molécules de la famille Bcl2 (B cells lymphoma 2) sont également ciblées dans le développement de nouvelles thérapies. Ces protéines régulent les mécanismes cellulaires proet anti-apoptotiques. Dans le cadre de protocoles thérapeutiques chez les patients LLC, ce sont les molécules anti-apoptotiques Bcl-X, Bcl-2, Bcl-w et Mcl-1 qui vont être ciblées par des molécules inhibitrices telles que, le navitoclax (ABT-263) [109] et le venetoclax (ABT-199) [110], induisant ainsi la mort des cellules cancéreuses. Bon nombre d'autres molécules
sont développées afin d'induire l'apoptose en ciblant la transcription des molécules antiapoptotiques (Flavopiridol, Cyclin-Dependent Kinase inhibitors...) ou en augmentant l'expression des molécules pro-apoptotiques (inhibition de protéasome, de la déacétylation des histones...) [111].

Enfin d'autres stratégies thérapeutiques visant à moduler les autres cellules du système immunitaire afin de renforcer celui-ci face au développement des LB de LLC sont décrites. On notera plusieurs tests réalisés sur le lenalidomide, un antiangiogène régulant les cytokines (VEGF, PDGF). Cette molécule est également connue pour augmenter l'activation antitumorale des LT et des cellules NK [112] ainsi que leur cytotoxicité. Cette molécule présente de bons résultats en clinique. En monothérapie, le taux de réponse varie entre 32 et 54% chez des patients réfractaires aux thérapies habituelles et à mauvais pronostic [113]. Des études combinant différentes molécules sont actuellement en cours.

Les récepteurs antigéniques chimériques (CAR) permettent de modifier les LT grâce à des lentivirus combinant les domaines de reconnaissance spécifiques de la cible liée à des molécules costimulatrices du LT. Dans le cas de la LLC, les LT autologues sont modifiés pour cibler spécifiquement le CD19. Une étude a démontré que 57% des patients étaient répondeurs, parmi eux 50% étaient en rémissions totales, sans rechute et sans maladie résiduelle diagnostiquée [114].



Figure 2. Les différentes molécules thérapeutiques.

Résumé des principales molécules thérapeutiques développées dans les LLC et de leurs cibles moléculaires d'après Hallek *et al* [91]

1.5.3 La transplantation des cellules souches hématopoïétiques

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques n'est pas un acte anodin et demande la prise en compte de nombreux paramètres cliniques. En 2007, le groupe EMBT a publié les critères d'éligibilité pour les patients atteints de LLC [115]:

- * L'âge, ainsi que l'état général du patient; les patients jeunes étant privilégiés
- Le caractère aggravé de la pathologie: présence de la del (11q), TP53, Notch1, IGVH non-muté (critères de mauvais pronostic)
- L'absence de réponse ou de rechute précoce (≈ 12 mois) suite à un traitement à base d'analogue des purines (ex: Fludarabine)
- La rechute (≈ 24 mois) des patients après à un traitement à combinaison multiple (ex: Fludarabine – Cyclophosphamide – Rituximab)
- La compatibilité avec le donneur

Aujourd'hui malgré des résultats satisfaisants (survie globale de 50 à 60 % sur 5 ans), l'utilisation de cette thérapie soulève de nombreuses questions face au développement de nouvelles drogues immunomodulatrices présentant des taux de réussite presque similaires, d'autant plus que la présence de maladie résiduelle est évaluée chez plus de 50% des greffés et le risque de déclarer une maladie du greffon contre l'hôte est élevé [116].

Malgré l'émergence de toutes ces nouvelles thérapies, la LLC reste aujourd'hui encore un mal incurable. De nombreuses études sont en cours afin de trouver la meilleure combinaison thérapeutique possible (combinaison de molécules chimiothérapeutiques avec des immunomodulateurs ...) et de mettre au point de nouvelles molécules thérapeutiques.

1.6 La physiopathologie

1.6.1 L'origine cellulaire du lymphocyte B de LLC

La plus grande interrogation qui entoure la LLC est sans doute celle de son origine. Car malgré de nombreuses études à ce sujet, la réponse reste en suspend. Les premières publications laissaient entendre que les LB de LLC trouvent leur origine parmi les LB CD5⁺ (B-1) situés dans la zone du manteau des organes lymphoïdes secondaires. Toutefois, l'absence de mutation IGVH a écarté cette hypothèse.

En effet, Klein *et al* en analysant le profil d'expression des gènes des LB de LLC en comparaison avec différentes sous population de LB normaux, ont émis l'hypothèse d'une origine de LB mémoires, en démontrant une signature génétique des LB de LLC plus proche de ces cellules que de cellules CD5⁺ [117]. Cette hypothèse est quelque peu remise en cause quelques années plus tard par l'équipe de Seifert *et al* qui ont à nouveau rapproché les LB de LLC des lymphocytes B CD5⁺ matures [118]. Les études du génome leur ont en effet permis de découvrir une sous-population CD5⁺ CD27⁺ (1% des LB totaux) présentant une mutation des gènes *IGVH* et *Bcl6*, caractéristique des cellules post-centre germinatif, dont la signature serait proche des LB de LLC ayant un statut IGVH muté. Les LB de LLC à IGVH non-muté selon eux dériveraient des LB matures CD5⁺ CD27⁺. Les auteurs ne semblent toutefois pas exclure un précurseur unique puisque les cellules CD5⁺ CD27⁺ seraient à la base des cellules CD5⁺ CD27⁺ différenciées. Par la suite, des études du génome et du méthylome sont venues appuyer la thèse d'une origine B mémoire [119].

Chiorazzi *et al* ont quant à eux associé dès 2003 l'origine des LB de LLC aux cellules B de la zone marginale IgM⁺ IgD^{faible} capables d'acquérir les marqueurs de surface CD5 et CD23 après activation antigénique T-indépendante [120].

Enfin, la question d'une origine unique ou multiple s'est également posée, même si la présence de BCR «stéréotypés» suggérait la présence d'un précurseur unique antigène dépendant. D'autant plus que la question d'un état pré-leucémique s'est également posée suite à la découverte de LB monoclonaux phénotypiquement proches des LB de LLC ($\approx 10\%$) chez 3 à 5 % de sujets sains, majoritairement des hommes de plus de 60 ans. De façon surprenante il semblerait que ces lymphocytes présentent des aberrations chromosomiques couramment retrouvées chez les patients atteints de LLC telles que la délétion 13q14 ($\approx 40\%$) ou la délétion 11q/17p (< 1%). Le répertoire des gènes *IGVH* présente cependant de fortes disparités [79]. La présence de ces LB «LLC-like» n'implique cependant pas nécessairement un développement de la pathologie (seulement dans 1,1% des cas) ou un risque clinique plus élevé de développer des infections. L'hypothèse d'un état pré-leucémique reste donc spéculative.

1.6.2 Le phénotype des lymphocytes B de LLC

La LLC est une pathologie cliniquement très hétérogène, pourtant les LB tumoraux présentent une signature phénotypique assez homogène. Comme cité précédemment (1.2), certains marqueurs sont spécifiquement étudiés lors du diagnostic des patients afin de les différencier d'autres syndromes lymphoprolifératifs B. Il est approuvé que les LB de LLC sont CD5^{fort} CD23⁺ s1g^{faible} FMC7⁻ CD79b^{faible} CD22^{faible}. Il a été également démontré que les LB de LLC expriment faiblement les marqueurs CD19 et CD20 par rapport à des LB d'individus sains [121]. La molécule CD20 semble exprimée de façon différentielle en fonction de la localisation des cellules en périphérie ou dans les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. La faible expression de CD20 dans ces deux derniers compartiments par rapport aux cellules du sang périphérique pourrait ainsi expliquer la résistance des patients aux immunothérapies anti-CD20 et leur fort taux de rechute [122]. Les LB de LLC sont aussi majoritairement CD27⁺, un marqueur associé aux cellules mémoires [119]. Ces cellules se distinguent par l'expression aberrante de ZAP70 chez certains patients, la faible expression de CD38 et, tout comme les LB normaux, elles expriment les marqueurs CD40 et CD24, dont la densité semble associée à la progression de la maladie.

Il est couramment admis que les LB de LLC ne sont pas de bonnes cellules présentatrices d'antigènes et la faible expression des molécules du CMH permet l'échappement des cellules tumorales au sein du système immunitaire. Il n'est donc pas surprenant de constater par exemple que seul 10% des patients atteints de LLC, possèdent des LB présentant à leur surface, le récepteur CD1d, une glycoprotéine apparentée aux molécules de CMH-I et permettant la présentation de glycolipides aux cellules NKT (natural killers T cells). L'augmentation de la densité de cette molécule est associée à un mauvais pronostic pour le patient, mais son mécanisme d'action semble toutefois peu connu [123].

Les LB de LLC sont également capables de produire *in vitro* de l'IL-10 (interleukine 10), une cytokine anti-inflammatoire, impliquée dans des mécanismes d'immunorégulations. Notre groupe a pu démontrer que la production d'IL-10 par les LB de LLC est contrôlée par la molécule CD5 via l'activation des facteurs de transcription STAT3 et NFAT2 [124]. Hagh *et al* ont quant à eux montré la capacité des cellules de LLC à sécréter *in vitro* du granzyme B, une molécule cytotoxique, après stimulation des cellules par l'IL-21 et du CpG-ODN et ainsi induire l'apoptose de cellules non traitées, suggérant la possibilité de développement d'un vaccin à partir de ces molécules [125].

Enfin, les LB de LLC expriment la molécule CD200 [126] et des ectoenzymes CD39 et CD73 [127], dont le rôle est directement lié à des mécanismes d'immunosuppression des LT.

Il est à noter que parmi les nombreuses études réalisées sur le phénotype des LB de LLC, il apparait que leur signature génétique diffère selon le compartiment cellulaire et le microenvironnement dans lequel la cellule se trouve montrant ainsi une certaine plasticité du LB de LLC [128].

1.6.3 Le rôle de la stimulation antigénique

Le BCR, récepteur membranaire spécifique des LB, est constitué d'une Ig de surface, capable de reconnaitre un antigène associé, à un dimère Iga/Igß cytoplasmique (aussi connue sous le nom CD79a/CD79b) permettant la transduction du signal via ses motifs ITAM. L'acquisition du BCR par les LB a lieu au cours de leur maturation au sein de la moelle osseuse suite aux réarrangements des gènes des chaines lourdes et des chaines légères de l'Ig. Puis au niveau des organes lymphoïdes secondaires, suite à son activation antigénique, le BCR va être modulé par le processus d'hypermutation somatique afin de modifier sa

spécificité et sa diversité antigénique. La transduction du signal va pouvoir s'effectuer via le recrutement de différentes tyrosines kinases (Lyn, Syk, BTK, PI3K...) et va être impliqué dans des mécanismes de différenciations cellulaires, de prolifération, d'apoptose, de signaux calciques ou encore de sécrétion d'anticorps. Cette activation va pouvoir être modulée par le microenvironnement et d'autres récepteurs de surface (signal positif via le CD19, signal inhibiteur via le CD22 et le CD32 FcγRIIB), formant avec le BCR un complexe appelé «signalosome» [129].

Dans la LLC, la stimulation antigénique du BCR a été décrite comme jouant un rôle primordial dans la physiopathologie du LB leucémique et notamment dans son développement (Figure 3). En effet, la découverte de BCR «stéréotypés», proches structurellement et retrouvés chez un grand nombre de patients présentant des caractéristiques cliniques communes, suggère qu'un panel antigénique restreint contribuerait au développement de la pathologie. Bien qu'inconnu à ce jour, Chiorrazi *et al* suggèrent un rôle direct ou indirect d'antigènes d'origines virales ou bactériennes commensales dans la leucémogénèse à l'instar des antigènes d'Helicobacter pylori décrit dans les lymphomes gastriques [130]. La présence de mutations des gènes IGVH va également moduler la stimulation antigénique et influencer l'évolution clinique d'un patient. En effet, l'engagement d'un BCR muté est associé à un état «anergique» de la cellule et celui d'un BCR non muté à des signaux d'apoptose ou de survie et de prolifération selon l'influence du microenvironnement. Ces deux types cellulaires semblent également se différencier par la réactivité de leur BCR. Une étude a ainsi démontré que les BCR non-muté sont polyréactifs et de faibles affinités pouvant reconnaitre des auto-antigènes ou des antigènes (Ag) microenvironnementaux (par exemple: la vimentine, des doubles ou simples brins d'ADN, du LPS ou les LDH...) tandis que les BCR mutés sont de forte affinité avec une spécificité pour un antigène donné (par exemple: les facteurs rhumatoïdes), remettant en cause l'anergie suggérée précédemment [131]. La nature du BCR semble également influencer le signal transduit, une stimulation IgM pouvant aboutir ou prévenir l'apoptose alors qu'une stimulation IgD protège uniquement les cellules de la mort cellulaire [132]. Enfin, Dühren-von Miden et al ont récemment démontré que le BCR pouvait avoir une signalisation autonome antigène indépendant via l'interaction entre la région CDR3 et un épitope interne au BCR [133].



Figure 3. La stimulation antigénique du BCR chez les patients atteints de LLC.

Les patients ayant des gènes *IGVH* non-mutés sont sensibles à la fixation et stimulation d' autoantigène via leur BCR de faible spécificité. Les LB reçoivent de multiples signaux positifs ou négatifs qui vont être à l' origine soit d' une prolifération cellulaire soit d'une entrée en apoptose. Les patients ayant des gènes *IGVH* mutés présentent une BCR de forte affinité dont la capacité à lier un antigène est réduite par la présence de mutations. Leurs LB perçoivent donc des signaux de prolifération ou d'apoptose défectueux. Illustration réalisée d'après Burger *et al* et Chiorazzi *et al* [129, 130].

1.6.4 La déficience des processus apoptotiques

L'apoptose est un mécanisme de mort programmée de la cellule faisant intervenir des protéines de la famille des caspases, suite à l'apparition de facteurs de stress, de lésion de l'ADN, l'irradiation, la présence de facteurs de mort ou encore l'absence de facteurs de croissance. Le dysfonctionnement des mécanismes apoptotiques peut résulter en un développement de cancer ou de maladie neurodégénératives pour ne citer que quelques exemples. Deux types de processus apoptotiques sont clairement définis (Figure 4) [134]:

La voie intrinsèque: Suite à l'activation de la mitochondrie, un relargage de la protéine cytochrome c a lieu dans le cytoplasme de la cellule. Cette dernière va alors former l'apoptosome, un complexe protéique associé à la molécule Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor), responsable de l'activation de la cascade

des caspases (caspase 9 -> caspase 3 effectrice) et aboutissant à la formation de corps apoptotiques.

La voie extrinsèque: En réponse à la liaison de leurs différents ligands (TNF-α, FasL, TRAIL...), les récepteurs de mort (TNF-R, Fas, DR5...) vont amorcer directement la cascade des caspases (caspase 8 -> caspase 3 effectrice), grâce à leur différents domaines de mort intracytoplasmique (DD), résultant tout comme pour la voie intrinsèque à la destruction de la cellule.

Les différents mécanismes d'apoptose sont régulés principalement par deux grandes familles de protéines:

- La famille Bcl2: Les molécules de la famille Bcl2 jouent un double rôle dans la régulation des voies apoptotiques. Parmi les 30 membres de cette famille, Bcl2, Bcl-X_L ou encore Mcl-1 ont une activité anti-apoptotique, en opposition à l'action pro-apoptotique de Bad, Bak, Bid, Bax ou PUMA. Leur action va principalement se porter sur la libération du cytochrome c ou l'activation des caspases.
- La famille des Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAP): Les principaux membres de cette famille, X-IAP, c-IAP ou la survivine, sont impliqués dans l'inhibition de l'activation de différentes caspases (3,7 et 9 essentiellement).

Introduction



Figure 4. L'apoptose: voies et régulation.

L'apoptose ou le processus de mort programmée fait intervenir deux voies: la voie extrinsèque dont les principaux acteurs sont les récepteurs de mort et la voie intrinsèque déclanchée par des facteurs de stress extérieurs. Ces deux voies mettent en jeu des protéines appelées caspase, aboutissent à la mort de la cellule. Les protéines de la famille Bcl2 (Bcl2, Bcl-Xl) et des Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAP-1, X-IAP, survivine) sont présentes afin de réguler la cascade d'activation à différents niveaux.

Depuis de nombreuses années, il est admis que dans la LLC ces processus apoptotiques sont défectueux, contribuant au développement de la pathologie. Les mécanismes liés à cette dérégulation restent encore confus bien que certains auteurs aient tenté d'apporter quelques réponses.

En 1993, Hanada *et al* ont mis en évidence que la protéine Bcl2, anti-apoptotique, était surexprimée (1,7 à 25 fois supérieur aux LB normaux) chez 95% des patients atteints d'une LLC [135]. Bien que peu clair à l'heure actuelle, cette surexpression pourrait s'expliquer par une hypométhylation du promoteur du gène induisant une augmentation de sa transcription. Cependant, au-delà de l'expression de Bcl-2 dans les LB de CLL, il semblerait que ce soit le ratio Bcl2/Bax, deux antagonistes de la famille Bcl-2, qui impacte les mécanismes apoptotiques. En effet, la variation du ratio Bcl2/Bax a été décrite comme inversement proportionnelle aux taux de cellules entrées en apoptose [136]. Enfin l'altération de micro-ARNs (ex: miR 15/16), régulateurs des protéines Bcl2, pourrait aussi apporter une explication

à l'hyper-expression de cette dernière [34]. Une autre protéine de la famille Bcl2 semble fortement impliquée dans le dysfonctionnement des processus apoptotiques, il s'agit de Mcl-1 [137]. L'expression de cette protéine a été décrite comme étant corrélée à des marqueurs d'agressivité ainsi qu'à un stade avancé de la pathologie. Tandis qu'*in vitro* Mcl-1 démontre un effet protecteur face à l'utilisation de molécules thérapeutiques telle que la fludarabine.

La voie extrinsèque mettant en jeu les récepteurs de mort est également impliquée dans la résistance des cellules vis-à-vis de l'apoptose. Frenzel *et al* ont démontré par des techniques de siRNA anti-XIAP, protéine surexprimée dans la LLC, qu'il est possible de restaurer les signaux de mort associés aux récepteurs TRAIL [138]. Les récepteurs Fas seraient quant à eux inhibés suite à une dérégulation des miR-138 et miR-424, qui dans l'incapacité de contrôler l'expression des molécules APTs1/2 (acyl-protein thioesteraes) empêcheraient la cellule d'entrer en apoptose [139].

De plus, il ne faut pas oublier d'une part que certaines aberrations chromosomiques altèrent les gènes *TP53* et *ATM* empêchant ainsi des mécanismes de réponses aux dommages de l'ADN de se mettre en place, et d'autre part que l'activation des voies NF- κ B ou PI3K par l'intermédiaire des molécules AKT et MDM-2 vont provoquer l'ubiquitination de p53 et donc sa dégradation. Enfin, le microenvironnement tumoral va conférer à la cellule un certain nombre de signaux de survie via les interactions cellulaires avec les «Nurse–like cells», les cellules stromales et les LT mais également via des facteurs solubles [140]. L'ensemble de ces points seront abordés dans un paragraphe consacré au microenvironnement du LB de LLC (1.6.6).

1.6.5 La prolifération du lymphocyte B de LLC

Les cellules de LLC, bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire ont longtemps été considérées comme peu prolifératives et leur accumulation était attribuée à un défaut des mécanismes apoptotiques. Pourtant dès les années 1990, les centres de proliférations ou «pseudofollicules» ont été observés dans les ganglions lymphatiques des patients atteints de LLC, composés d'un taux important de cellules tumorales Ki67+ prolifératives [141]. La présence d'autres types cellulaires a également été décrite, notamment des LT jouant un rôle dans l'activation des cellules de LLC.

Par la suite, Damle *et al* ont mis en évidence la présence de télomères raccourcis dans les LB de LLC par rapport aux LB normaux ainsi qu'une activité télomérase accrue qui reflèteraient un processus de divisions cellulaires répétées [142]. De plus, Messmer *et al* ont pu démontrer grâce à l'utilisation d'eau lourde ou d'oxyde de deutérium, un isotope non radioactif, la présence *in vivo* d'une population proliférative [143]. La croissance cellulaire représenterait 0,11 à 1,75% de la population tumorale totale par jour, contrebalancée par un taux de mortalité variant de 0 à 2%. Les auteurs décrivent ici un processus cellulaire dynamique et corrélé à la progression de la pathologie.

1.6.6 Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement joue un rôle prépondérant dans la survie, la prolifération mais également dans la circulation des cellules entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Grâce à de nombreux contacts cellulaires et facteurs solubles (Figure 5), le microenvironnement contribue au développement de la pathologie et facilite également l'apparition de résistances aux différents traitements. La mort rapide des LB de LLC *in vitro* est d'ailleurs le reflet de la perte de signaux de survie et de l'importance du microenvironnement tumoral dans le maintien de la pathologie [128, 129].

Les cellules «nurse-like» (NCL), d'origine monocytaire, font partie des cellules largement étudiées dans la survie des cellules de LLC. Décrites pour la première fois au début des années 2000 [144] pour leur rôle protecteur dans l'apoptose spontanée *in vitro* via l'interaction SDF-1/CXCR4, on sait aujourd'hui qu'elles contribuent au chimiotactisme et à la survie des cellules par la sécrétion des chimiokines CXCL12/CXCL13 mais également grâce à l'expression à leur surface des molécules telles que BAFF, APRIL [145] ou CD31[146], renforçant ainsi l'activation des voies du BCR, PI3K et NF-ĸB. Récemment, il a été démontré que l'expression du marqueur CD163 sur les NLC et le taux de CD163 solubles sont corrélés aux taux de prolifération des LB de LLC [147]. Ce même groupe a décrit l'implication de ces cellules dans des mécanismes de résistance à l'ibrutinib [148].

Les cellules stromales mésenchymateuses ont également un rôle à jouer par l'intermédiaire de leur interaction VCAM-/VLA-4 et par la sécrétion de facteurs solubles tels que la chimiokines CXCL12, des cytokines ou des facteurs pro-antigéniques VEGF. Ces facteurs vont contribuer à l'activation des voies NF- κ B et AKT permettant l'augmentation des protéines de la famille Bcl2, notamment Mcl-1 responsable de l'inhibition de l'apoptose. Le

rôle de ces cellules dans la résistance aux traitements (ex Fludarabine) a également été rapporté [149].

D'autres cellules et de nombreux facteurs vont également intervenir pour favoriser la survie des cellules tumorales. Les cellules dendritiques folliculaires de par leur récepteur CD44 et le récepteur à la lymphotoxine bêta ou encore les LT qui, via le récepteur CD40L, vont générer la sécrétion d'une molécule anti-apoptotique, la survivine. Enfin, on notera la présence de nombreuses cellules impliquées dans la réponse anti-tumorale (LT, cellules NK, CD8⁺ cytotoxiques). Ces cellules vont présenter des déficits immunitaires empêchant l'activation des processus anti-tumoraux et vont donc contribuer à l'échappement des cellules de LLC. L'ensemble de ces anomalies du système immunitaire sera développé dans un prochain paragraphe (1.6.7).



Figure 5. Le microenvironnement tumoral de la LLC.

Le microenvironnement de CLL favorise la survie, la migration et la résistance des LB de LLC vis-àvis des thérapeutiques par l'intermédiaire de contacts cellulaires ainsi que différents facteurs solubles (cytokines et chimiokines). Illustration réalisée d'après ten Hacken *et al* [129]. FDC = cellules dendritiques folliculaires, NLC= «nurse-like cells», BMSC= cellules stromales (Bone marrow stromal cell), LT=lymphocyte T, BAFF= B cells activating factor, BAFF-R= B cells activating factor receptor, APRIL= A proliferation-inducing ligand, TACI= Transmembrane activator and CAML interactor, BCMA= B cells maturation antigen, LT $\alpha\beta$ = lymphotoxin $\alpha\beta$, VEFG= Vascular endothelial growth factor.

1.6.7 Les perturbations du système immunitaire

La LLC est caractérisée par l'expansion anarchique de cellules lymphocytaires B. Mais il a été démontré que les patients présentent également des dysfonctionnements du système immunitaire qui contribuent à l'immunodéficience et à la progression de la pathologie (Figure 6).

1.6.7.1 Les perturbations du système immunitaire inné

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme vis-à-vis d'agents pathogènes faisant intervenir des molécules solubles (cytokines, compléments..) et de nombreux types cellulaires (granulocytes, monocytes, NK...). Bon nombre de ces mécanismes ont été décrits comme altérés chez les patients atteints de LLC, favorisant au passage le développement de maladies bactériennes et virales responsables de nombreux décès.

Les polynucléaires neutrophiles sont impliqués dans la phagocytose des agents bactériens ou fongiques non opsonisés au sein du système immunitaire. L'activité antimicrobienne est déficiente dans la LLC indépendamment du nombre de cellules ou du taux de cytokines pro-inflammatoires [150]. La faible expression des facteurs chimiotactiques N-formyl-méthionylleucylphénylalanine (fMLP) et C5a (molécules du complément) associée à des infections récurrentes évoquées précédemment [151], pourrait en être l'explication.

Les monocytes présentent également un certain nombre de dysfonctionnements. Tout d'abord, le répertoire monocytaire semble quelque peu modifié par rapport aux patients sains avec une augmentation du nombre absolu de monocytes, une augmentation de la population CD14⁺ CD16⁺⁺ non conventionnelle, un profil génétique associé aux mécanismes d'immunosuppression et une expression supérieure du récepteur Tie2 (récepteur de l'angiopoïétine 2), les monocytes Tie2 ayant pour fonction de supprimer l'activation des LT et promouvoir l'expansion de LT régulateurs [152]. Par ailleurs, Jurado-Camino et al ont démontré que suite à une stimulation au lipopolysaccharide (LPS) in vitro, la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-10 et TNF- α) est diminuée en comparaison aux cellules monocytaires issues de patients sains [153]. De plus, les monocytes de LLC possèdent une forte capacité de phagocytose ainsi qu'une réduction des marqueurs HLA-DR et HLA-DQ associés à une diminution de leur capacité à présenter des antigènes. Ces résultats suggèrent que les monocytes de LLC seraient bloqués à un stade de tolérance aux endotoxines, mécanisme bien connu dans le développement de maladies bactériennes et dans les cas de septicémies, les rendant incapables de développer une réponse inflammatoire. Enfin, une étude récente in vivo chez la souris Eµ-TCL1, a permis de démontrer la présence de monocytes tolérogènes (PD-L1^{fort}) et de macrophages M2 immunosuppresseurs dans les organes lymphoïdes secondaires au cours du développement de la pathologie [154]. La déplétion de ces deux types cellulaires a permis la restauration de la réponse immunitaire innée et une diminution du développement tumoral, démontrant ainsi le rôle prépondérant de ces cellules dans la progression de la pathologie.

Autres cellules myéloïdes impliquées dans les mécanismes d'immunosuppression, les cellules suppressives dérivées des monocytes (MDSC) CD14⁺ HLA-DR^{faible} sont induites par les cellules de LLC. Ces cellules sont responsables *in vitro* d'une dérégulation de la fonctionnalité des LT ainsi que de l'augmentation du taux de LT régulateurs via la production d'indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), une enzyme permettant la dégradation du tryptophane. L'expansion des MDSC étant corrélée à une progression rapide de la maladie, elle reflèterait un des moyens d'échappement mis en œuvre par la tumeur [155].

Le système du complément permet de lutter contre les infections et les complexes immuns. Les molécules du complément de la voie classique (C1, C2, C3 ou C4) ont été décrites comme déficientes dans la LLC (\approx 38% des patients), augmentant le risque d'infections chez ces patients. De plus, le système du complément va permettre la lyse des cellules tumorales dans le cas d'immunothérapie monoclonale en activant ce qu'on appelle la CDC. Middleton *et al* ont démontré que cette déficience du système du complément diminue considérablement l'activation de la CDC par le rituximab et l'ofatumumab, pouvant ainsi expliquer l'apparition de résistances vis-à-vis des traitements chez ces patients [156]. De fait, une supplémentation en molécules du complément semble pouvoir restaurer la lyse des cellules.

Parmi les principaux acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale, les cellules NK présentent une activité cytotoxique défectueuse envers les LB de LLC. Cette déficience pourrait s'expliquer par la faible expression de son récepteur membranaire NKG2D, impliqué dans son activation, puisque ce dernier après avoir été induit par de l'IL-2 et de l'IL-15 va permettre la restauration de l'activité cytotoxique des cellules NK [157]. Reiners *et al* quant à eux mettent en cause la signalisation NKp30/BAG6, en démontrant, d'une part, un défaut d'expression de la molécule BAG6 sur l'exosome, responsable de l'activation des cellules NK et d'autre part, que le ligand soluble BAG6, dont le taux dans le sérum des patients augmente avec la progression de la maladie, va être responsable de l'anergie des cellules NK [158]. Il

semblerait qu'une autre molécule soluble soit également impliquée dans la protection des cellules de LLC vis-à-vis de la fonction tueuse des cellules NK, de manière directe ou indirecte rituximab dépendante. Il s'agit de la cytokine BAFF, sécrété par les cellules NK elle-même. Le rôle de BAFF a été démontré suite à l'utilisation d'un anticorps ciblant cette molécule, le belimumab, qui permet de lever la résistance des LB de LLC [159]. De plus, il est à noter que les LB de LLC possèdent à leur surface la molécule HLA-G, une molécule du CMH-I non conventionnelle tolérogène, qui par contact cellulaire direct avec les cellules NK et leurs récepteurs inhibiteurs KIR (NK inhibitory receptor: ILT2, ILT4 et KIR2DL4) va entraîner l'inhibition de leur activité cytotoxique [160].

Enfin, le compartiment des lymphocytes NKT, dont le rôle dans la réponse immunitaire repose essentiellement sur la sécrétion de cytokines suite à la reconnaissance de glycolipides présentés par le récepteur CD1d, ne semble pas être épargné dans les dérégulations immunes dans la LLC. En effet, il existerait une déficience numéraire de ces cellules mais pas fonctionnelle [161]. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette immunodéficience ne sont pas clairement définis [162].

1.6.7.2 Les perturbations du système immunitaire adaptatif

Le système adaptatif est le second rempart de notre système immunitaire. Qu'il soit à médiation cellulaire ou humorale, il se trouve également fortement bouleversé dans la LLC.

1.6.7.2.1 L'immunité cellulaire

Le développement d'une réponse immunitaire adaptative nécessite avant tout une reconnaissance antigénique ainsi que la formation d'une synapse immunologique entre les LT et les cellules présentatrices d'antigènes. Or, il s'avère que ces deux mécanismes sont défectueux dans la LLC. D'une part, il a été décrit que les LB de LLC sont de mauvaises cellules présentatrices d'antigènes probablement dû à la sous-expression des molécules de co-stimulation de la famille B7 (CD80/CD86) indispensables pour la transduction du signal [163]. D'autre part, la formation des synapses immunologiques entre les LT et les LB de LLC est défectueuse suite à un mauvais réarrangement du cytosquelette et une inhibition de la polarisation des filaments d'actine. Les molécules costimulatrices CD200, PD-L1 et B7H3, surexprimées à la surface des LB de LLC, seraient les principales actrices de ce dysfonctionnement synaptique [164].

Le compartiment lymphocytaire T est particulièrement touché par des dérégulations fonctionnelles le rendant incapable de développer une réponse anti-tumorale. Tout d'abord, il s'avère que le nombre absolu de LT est augmenté dans le sang périphérique des patients atteints de LLC et est associé avec une diminution du ratio CD4/CD8, pouvant s'expliquer en partie par l'hypersensibilité des LT CD4⁺ à l'apoptose engendrée par la signalisation Fas/FasL [165]. Autre fait intéressant, l'expression des molécules de co-stimulation inhibitrices PD-1-PD-L1 et CTL-4 sur les LT CD4⁺ et CD8⁺ qui permet habituellement la régulation des réponses inflammatoires, serait responsable d'une diminution de la réponse anti-tumorale dans la LLC. En effet, la forte expression de ces molécules serait à l'origine d'une inhibition de l'activité des CD4⁺ (inhibition de la sécrétion de cytokines) et de l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ et favoriserait l'activité des LT régulateurs [149]. Une forte proportion de LT mémoires a également été retrouvée dans le sang des patients. Les LT participeraient à la survie des cellules de LLC grâce à la sécrétion de chimiokines leur permettant de migrer dans les ganglions lymphatiques et de déclencher une signalisation du BCR via l'interaction CD40/CD40L et la sécrétion des cytokines IFN-y, IL-4 et IL-21 [166]. D'autre part, il est à noter qu'une forte proportion de LT régulateurs circulants a été caractérisée dans la LLC et corrélée avec la progression de la pathologie [167]. Enfin, la population de LT auxiliaires sécréteurs d'IL-17 (Th17) ne déroge pas à ces dérégulations immunitaires. En effet, la population Th17 serait supérieure chez les patients LLC par rapport aux témoins sains. Le pourcentage de Th17 serait inversement corrélé avec la progression de la pathologie suggérant un rôle protecteur envers les LB de LLC [168].

Pour finir, les cellules dendritiques conventionnelles, sentinelles de la réponse immunitaire et principales actrices de la présentation antigénique, circulantes dans la LLC possèdent un phénotype immature (expression faible des marqueurs CD83 et CD80) et de ce fait se trouvent dans l'incapacité de sécréter de l'IL-12 et d'activer la prolifération des LT [169]. A l'instar, des cellules dendritiques plasmacytoïdes qui ont elles aussi une déficience dans la production d'IFN- γ , ces déficits s'ajoutent à l'ensemble des mécanismes d'immunodéfience caractéristiques de la LLC [170].

1.6.7.2.2 L'immunité humorale

Entre 30 et 55% des patients de LLC souffrent d'hypogammaglobulinémie, rendant la réponse immunitaire humorale peu efficace et accentuant le développement du risque

d'infections [171]. Le pourcentage de patients atteints d'hypogammaglobulinémie augmente généralement avec les différents stades de la pathologie, qu'elle soit liée aux taux d'IgA, IgG ou IgM dans le plasma des patients. Cette absence de sécrétion des Ig pourrait s'expliquer par l'activation des processus apoptotiques dans les LB cellules sécrétrices d'anticorps, les plasmocytes, par contact direct avec les LB de LLC via l'interaction des récepteurs de mort Fas/FasL [172].



Figure 6. Les principales dérégulations du système immunitaire dans la LLC.

Illustrations des anomalies du système immunitaire inné, cellulaire et humoral décrites chez les patients atteints de LLC. MDSC= myeloid-derived suppressor cell, NKT= natural killer T, NK= naturel killer, DC= cellules dendritiques conventionnelles, pDC= cellules dendritiques plasmacytoïdes, Th= lymphocytes T helper, Treg= lymphocytes T régulateurs, Ig= immunoglobulines.

2 Les Lymphocytes B régulateurs

2.1 L'ontogenèse les lymphocytes B

L'ontogenèse des LB a lieu dans la moelle osseuse suite au développement et à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes, cellules progénitrices de l'ensemble des cellules sanguines (Figure 7). Sous l'influence de signaux émis par les cellules stromales, ces progéniteurs vont subir une série de transformations (cellules pro-B précoces, cellules pro-B tardives, grandes cellules pré-B, petites cellules pré-B, cellules B immatures) au cours desquelles le BCR va progressivement se mettre en place suite aux réarrangements des différents gènes de la région variable des immunoglobulines. Les cellules B immatures vont alors migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS), sous le nom de LB transitionnels (CD24⁺ CD38⁺ IgM⁺ IgD^{+/-}) où elles pourront subir deux destins distincts:

- Une partie des cellules transitionnelles va se retrouver dans les structures extrafolliculaires des OLS, où deux populations se distingueront. L'une se situe dans la zone marginale (LB de la zone marginale = MZ LB IgM^{fort}, IgD^{faible}, CD23^{faible}, CD5⁻) où les LB subissent une expansion et une différenciation rapide en cellules plasmocytaires sécrétrices d'anticorps T-indépendants de faibles affinités. L'autre se situe dans la zone du manteau, où les LB exprimant le marqueur CD5⁺ sont communément appelés cellules B-1a chez la souris producteurs d'anticorps polyréactifs.
- Les autres cellules transitionnelles vont se différencier en cellules folliculaires conventionnelles (LB mature 1 = Bm1 IgD⁺ CD38⁻) qui vont soit se transformer en cellules Bm2 (IgD⁺ CD38⁺) précurseurs de cellules sécrétrices d'IgM, soit former des centres germinatifs en présence de LT et de cellules dendritiques. A l'intérieur de ces structures, les cellules activées (Bm2' IgD⁺ CD38^{fort}) suite à une reconnaissance antigénique T-dépendante vont subir des hypermutations somatiques et des commutations de classe aux stades Bm3 ou centroblastes et Bm4 ou centrocytes (IgD⁻ CD38^{fort}) permettant d'accroître l'affinité de leur BCR. Elles termineront leur destin en se différenciant soit en cellules B mémoires CD27⁺ (early Bm5 IgD⁻ CD38⁺ et Bm5 IgD⁻ CD38^{fort} CD138⁺).

L'ontogenèse est bien évidemment un processus contrôlé par notre système immunitaire. A chaque grande étape de différenciation et de maturation, des processus de tolérance s'opèrent afin de limiter l'apparition de LB autoréactifs.



Figure 7. L'ontogenèse des cellules B.

L'ontogenèse des LB a lieu dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Les cellules s'y développeront jusqu'au stade B immatures. Les cellules vont alors migrer vers les OLS sous la forme de LB transitionnels. Ces LB transitionnels vont soit se transformer en cellules de la zone marginale soit en cellules folliculaires. L'ensemble de ces cellules vont subir une succession de différenciation T-indépendantes ou T-dépendantes aboutissant à la formation de cellules mémoires ou plasmocytes. MZ= zone marginale, Bm= lymphocytes B matures, Ig= immunoglobulines, DC= cellules dendritiques, LT= lymphocyte T, eBm5= early memory B cells, Bm5= memory B cells, Bm3= centroblaste, Bm4= centrocytes.

2.2 La découverte des LB régulateurs

Les LB jouent un rôle complexe dans les réponses immunitaires. Leurs fonctions ne se restreignent d'ailleurs pas uniquement à la présentation des antigènes ou à la sécrétion d'anticorps. En effet, plusieurs études chez la souris puis l'Homme ont démontré la capacité de certaines populations lymphocytaires B à réguler d'autres cellules du système immunitaire. Ces LB, appelés LB régulateurs (Breg) sont directement impliqués dans des mécanismes d'immunosuppression, dans la physiopathologie de certaines maladies auto-immunes et inflammatoires ainsi que dans l'échappement des tumeurs.

Introduction

2.2.1 Historique des LB régulateurs

L'idée du rôle régulateur des LB dans la réponse immunitaire a commencé à germer dès les années 1970. Neta *et al* ont alors démontré que la déplétion des LB lors d'un transfert adoptif de splénocytes dans le système immunitaire du cochon d'inde, rendait impossible l'inhibition de la réaction d'hypersensibilité retardée cutanée après sensibilisation des animaux [173]. Ces résultats suggéraient pour la première fois la possibilité d'une fonction suppressive des LB sur les LT responsables de cette hypersensibilité retardée.

Il faudra ensuite attendre 1996 pour qu'une autre équipe décrive à nouveau l'effet suppressif des LB, cette fois-ci dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune (EAE), une maladie T-dépendante touchant le système nerveux central [174]. Pour ce faire, les auteurs ont comparé le développement de la pathologie chez des souris, B10.PL contrôles et des souris B10.PLµMT déplétées en LB. Chez les deux types de souris, la maladie s'est déclarée de façon similaire, toutefois l'absence de LB a eu pour conséquence une aggravation de la maladie et une absence de rémission spontanée, montrant un rôle protecteur des LB dans l'EAE. Les auteurs iront plus loin dans leur discussion en émettant l'hypothèse d'une fonction B immuno-régulatrice via la modulation de la sécrétion des cytokines Th1/Th2, hypothèse qui sera confirmée quelques années plus tard [175]. De fait, l'équipe de Moulin a pu déterminer que la polarisation Th1/Th2 était dépendante de la sécrétion d'IL-12 par les DC, elle-même sous le contrôle des LB et notamment de leur production d'IL-10.

A partir des années 2000, les études sur la fonction régulatrice des LB se sont multipliées. Mizoguchi *et al* ont ainsi pu démontrer dans un modèle murin TCR $\alpha^{-/-}$ développant une colite chronique spontanée (équivalent de la colite ulcéreuse chez l'Homme) sous l'action des LT CD4⁺ TCR $\alpha^{-\beta}\beta^{faible}$, que les souris déplétées en LB étaient plus gravement atteintes par la pathologie [176]. De plus, un transfert adoptif de LB matures (CD38⁺) dans ces souris permettait une diminution considérable du taux de LT TCR $\alpha^{-\beta}\beta^{faible}$ et supprimait le développement de la colite. Cette étude a également permis de décrire l'importance de l'interaction CD40-CD40L et de la molécule de co-stimulation CD86 (B7-2), par l'utilisation d'anticorps bloquants monoclonaux anti-CD40 et anti-CD86, dans la protection des LB contre le développement d'une maladie inflammatoire. En effet, le blocage de ces molécules ne permet pas de réduire le nombre de LT pathologiques chez les souris après transfert des LB. Cette même équipe a deux ans plus tard montré que cette pathologie pouvait être régulée par

des LB CD19⁺ CD1d⁺ suite à la sécrétion d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, en inhibant la signalisation pro-inflammatoire IL-1 β /STAT3 [177]. Deux autres équipes confirmeront le rôle régulateur des LB producteurs d'IL-10 dans le développement de l'EAE [178] et l'arthrite au collagène [179].

Chez l'Homme, la description de Breg sera beaucoup plus tardive. Il faudra attendre la fin des années 2000, pour voir apparaître les premiers résultats. La présence de Breg a ainsi été évoquée par l'étude de patients atteints de sclérose en plaques. Chez ces patients, les LB présentent une faible production d'IL-10 par rapport aux volontaires sains, suggérant le rôle protecteur des LB normaux vis à vis du développement de cette maladie auto-immune. En 2010, Blair et al ont clairement caractérisé une population de LB normaux CD19⁺ CD24^{fort} CD38^{fort} (LB transitionnels) capables d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les LT et de supprimer la polarisation Th1, grâce à la production d'IL-10 et par interaction directe avec ses récepteurs CD80/CD86 [180]. Enfin, en 2011 notre groupe a montré que les LB CD19⁺ CD24^{fort} CD38^{fort} CD5⁺ peuvent inhiber la prolifération des LT, indépendamment de la production d'IL-10, mais également par interactions directes avec les récepteurs CD80/CD86, en favorisant la production de Treg [181]. Fait intéressant, cette population CD19⁺ CD24^{fort} CD38^{fort} retrouvée chez les patients souffrant de lupus érythémateux disséminé (LED), présente une sécrétion plus faible d'IL-10 et une incapacité à réguler les LT. Ces résultats suggèrent donc que la fonction régulatrice de LB est déficiente chez ces individus et est au cœur du développement de la maladie auto-immune.

Tous ces arguments démontrent clairement la capacité des LB à contrôler le développement de maladies auto-immunes et inflammatoires chez la souris et l'Homme. Cependant quelles sont les populations lymphocytaires présentant une activité régulatrice ? Ces LB sont-il présents naturellement au sein de notre système immunitaire ou inductibles ? Et surtout quels sont leurs mécanismes d'action ? Autant de questions auxquelles nous allons tenter de répondre dans la suite de ce chapitre.

2.2.2 Les différents types de LB régulateurs

La signature phénotypique des Breg prête toujours à débat. Plusieurs sous-populations de LB ont été décrites comme ayant une activité régulatrice dans les réponses immunitaires (Tableau 4.).

2.2.2.1 Les premières caractérisations

Mizoguchi *et al* ont été les premiers à caractériser phénotypiquement une population Breg CD21^{int} CD62^{faible} IgM^{int} CD23^{fort} CD1d^{fort} sécréteurs d'IL-10 dans les ganglions lymphatiques mésentériques d'un modèle murin développant des colites chroniques [177]. Une autre population régulatrice CD1d^{fort} IL-10⁺ a été identifiée cette fois-ci dans un modèle d'arthrite induite par le collagène [182]. Le transfert des LB transitionnels précurseurs de la zone marginale (T2-MZP) CD21^{fort} CD23⁺ CD24^{fort} IgM^{fort} IgD⁺ CD1d⁺ est en effet responsable de la rémission de la pathologie chez les souris. Une population de LB transitionnels CD24^{fort} CD38^{fort} régulateurs a été identifiée chez l'Homme quelques années plus tard et décrite comme déficiente chez les patients atteints de LED [180, 181]. Depuis cette étude, notre équipe a démontré que les LB transitionnels regroupent un ensemble de sous-populations complexes présentant chacune un phénotype et une capacité régulatrice unique [183]. Les cellules de la zone marginale ont également démontré leur fonction régulatrice dans le maintien de la tolérance vis-à-vis des cellules apoptiques, limitant ainsi la production d'auto-anticorps et le déclenchement d'arthrite [184].

2.2.2.2 Les LB régulateurs dits B10

En 2008, le groupe dirigé par Tedder [185] a mis en évidence une population de Breg IL-10⁺ inhibitrice de la réaction d'hypersensibilité de contact. Cette population appelée «B10» possède un phénotype unique CD1d^{fort} CD5⁺. Elle ne représente que 1 à 2% des cellules de la rate ainsi que 7 à 8 % des cellules du péritoine. Les cellules de la rate ont un phénotype qui s'apparente à celui d'autres populations régulatrices décrites précédemment telles que les LB T2-MZP, les cellules B1-a CD5⁺ ou encore les LB de la zone marginale. Tandis que les cellules du péritoine sont IgM^{fort} IgD^{faible} CD5⁺ CD23⁻ CD11b⁺ CD43⁺ B220^{faible}, un phénotype également partagé par les cellules B1-a. Ces mêmes auteurs confirmeront la présence de ces «B10» chez la souris dans des modèles de lupus [186] et d'EAE [187], puis caractériseront une sous-population similaire des «B10» chez l'Homme [188]. Dans cette dernière étude, une population de LB circulants IL-10 compétents a été mise en évidence. Présente entre 0,2% et 2% chez les individus sains, elle est caractérisée par les marqueurs de surface CD24^{fort} CD27⁺. Elle a la capacité d'inhiber la production de TNF- α par les monocytes en culture *in vitro* sous le contrôle de l'IL-10, démontrant un rôle de ces «B10» dans la régulation du système immunitaire innée. Chez des patients atteints de maladies

inflammatoires ou auto-immunes, telles que le LED, la polyarthrite rhumatoïde ou le syndrome de Sjögren, le taux de ces Breg peut se retrouver augmenté.

2.2.2.3 L'émergence des populations LB régulatrices

Depuis près de 6 ans, les études sur les Breg n'ont cessé d'augmenter, permettant de dresser une liste non exhaustive de sous-populations lymphocytaires B immuno-modulatrices.

- Les LB régulateurs TIM-1⁺: La glycoprotéine TIM-1 (T cell immunoglobulin mucine domain 1) a tout d'abord été décrite comme une molécule costimulatrice sur les LT CD4⁺ activés. En 2011, l'équipe de Rothstein a démontré que non seulement ce marqueur était présent à la surface de 70% des Breg IL-10⁺ mais qu'il était également nécessaire à l'induction et au maintien de la fonction régulatrice grâce à leur domaine mucine [189, 190]. En effet, la stimulation des LB avec un anticorps anti-TIM-1 permet l'augmentation de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 et augmente la réponse Th2. De plus, son activation notamment par des cellules apoptotiques, serait essentielle pour promouvoir la différenciation Th2 ainsi que pour inhiber le rejet de greffe chez les souris.
- Les LB régulateurs Br1: Cette population CD19⁺ CD25⁺ CD71^{fort} CD73^{faible} a été mise en évidence dans un modèle humain d'allergie au venin d'abeille [191]. Il s'avère que ces LB également sécréteurs d'IL-10⁺ sont capables d'inhiber la prolifération des LT et la production d'IgE. Ils sont en outre responsables de l'induction de la production d'IgG4, une Ig jouant un rôle prépondérant dans la tolérance périphérique suite à l'exposition prolongée d'un individu à un allergène. Nommés Br1 en référence aux LT régulateurs 1 (Tr1), répondant aux mêmes caractéristiques fonctionnelles, les auteurs décrivent ici le rôle essentiel des Breg humains dans le maintien de la tolérance.
- Les LB régulateurs producteurs de granzyme B: Lindner *et al* [192] ont identifié pour la première fois une population de Breg dans le microenvironnement tumoral de différents cancers solides (ovariens, poumons...) chez l'Homme. Ces Breg sécréteurs de granzyme B et d'IL-10 sous la stimulation d'IL-21 (produite que par les LT CD4⁺) sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération des LT en dégradant leur TCR. Ces résultats suggèrent fortement le rôle des Breg dans

l'inhibition de la réponse anti-tumorale (2.3). D'autre part, ces cellules ont également été retrouvées chez des patients atteints par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [193] et dans un modèle murin de transplantation [194]. Ces deux études démontrent que suite à une perte de signal CD40L (notamment due directement au VIH), les Breg sont induits au dépend de la différenciation en plasmocytes, contribuant respectivement aux dysfonctionnements de la réponse immunitaire chez les patients VIH⁺ et à la tolérance cellulaire chez les rongeurs greffés. Des arguments qui laissent envisager une fonction régulatrice des LB dépendantes du microenvironnement.

- Les LB régulateurs CD39⁺ CD73⁺: Ces deux molécules sont deux ectoenzymes impliquées respectivement dans des mécanismes de catalyse d'ATP en ADP/AMP et la production d'adénosine à partir d'AMP, permettant un maintien de l'homéostasie extracellulaire. Chez la souris, elles sont exprimées sur les cellules B1 [195]. Le transfert de LB-1 CD73⁺ chez des souris CD73^{-/-} souffrant de colite, a permis de diminuer la réponse inflammatoire en corrélation avec l'augmentation d'adénosine dont le rôle anti-inflammatoire a été précédemment établi.
- Les LB régulateurs PD-1^{fort}: Cette population présentant un phénotype bien particulier PD-1^{fort} CD5^{fort} CD24^{-/+} CD27⁺ CD38^{int} a été identifiée chez les patients atteints de carcinomes hépatocellulaires [196] où elle semble responsable du développement de la pathologie. En effet, la production d'IFN-γ par les LT CD4⁺ et la sécrétion de granzyme B/perforine par les LT CD8⁺ sont considérablement supprimées *in vitro* en présence de ces LB PD-1^{fort}. Cette activité semble une nouvelle fois dépendante d'une production d'IL-10. Chez la souris, le blocage de PD-1 *in vivo* va permettre la diminution de la taille de la tumeur.
- Les cellules plasmocytaires régulatrices: Chez la souris au cours du développement de l'EAE, une population de cellules plasmocytaires CD138⁺ CD44⁺ IL-10⁺ est induite sous le contrôle des gènes IRF-4 et Blimp1 [197]. Ces cellules vont réprimer la fonction permettant aux DC d'induire des LT autoréactifs. Dans cette même étude, les auteurs définissent une population de

plasmablastes humains IL-10⁺ CD27^{fort/int} CD38⁺ inductible *in vitro* en présence de CpG-ODN, IL-2, IL-6, IFN-α, suggérant la possible expansion de plasmablastes régulateurs in vivo dans un contexte pro-inflammatoire. L'année suivante une autre équipe a confirmé la présence de plasmablastes régulateurs chez l'Homme, cette fois-ci dans un contexte de développement de la maladie du greffon contre l'hôte [198]. Les auteurs ont mis en évidence que plus le nombre de plasmablastes CD27^{fort} CD38^{fort} sécréteurs d'IL-10 était diminué chez les patients, plus sévère était la pathologie. Enfin, l'équipe de Fillatreau a démontré l'importance de la fonction suppressive de la cytokine IL-35 [199]. De façon surprenante, cette cytokine semble jouer un double rôle au sein du système immunitaire. Chez les souris déficientes pour IL-35, un développement de l'EAE et une absence de rémission vont être observés, conjointement à une résistance face à une infection bactérienne type Salmonelle. Il s'avère qu'une population de plasmocytes CD138⁺ est responsable de la sécrétion majoritaire d'IL-35, démontrant à nouveau le pouvoir régulateur de ces cellules différenciées.

Les lymphocytes B régulateurs Foxp3⁺ (forkhead box P3): Pour finir, tout comme les LT régulateurs, il existerait une population de LB régulateurs circulants exprimant le facteur de transcription Foxp3 [200]. Le transfert adoptif des LB CD19⁺ transfectés avec le gène *foxp3* dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène entraîne une diminution de la progression de la pathologie et permet une diminution du pourcentage de Th17 et une expansion de Treg [201].

LB régulateurs	Phénotype souris	Phénotype humain	Références
LB CD19+CD1d+	CD19+CD1d+CD21 ^{int} CD23 ^{fort} CD62 ^{faible} IgM ^{int}	-	[177]
LB T2-MZP	CD21 ^{fort} CD23+CD24 ^{fort} IgM ^{fort} CD1d+	CD19+CD24fortCD38fort	[180-183]
LB MZ	CD19+CD21fortCD23-	-	[184]
LB «B10»	CD1d ^{fort} CD5 ⁺	CD24 ^{fort} CD27 ⁺	[185-188]
LB Br1	-	CD19+CD25+CD71 ^{fort} CD73 ^{faible}	[191]
LB TIM-1+	CD19+TIM-1+	-	[189, 190]
LB Granzyme B+	CD19+GrzB+	CD19+GrzB+	[192-194]
LB CD73+	CD19+CD73+CD39+	-	[195]
LB PD-1+		CD19+CD5 ^{fort} CD24-/+ CD27+CD38 ^{int} PD-1+	[196]
Plasmablastes	CD138 ⁺ CD44 ⁺	CD27 ^{fort} CD38 ⁺	[197, 198]
Plasmocytes	CD138+IL-35+	-	[199]
LB Foxp3	CD19+ FOXP3+	-	[200, 201]

Tableau 4.Les différents phénotypes des LB régulateurs.

LB T2-MZP= Lymphocytes B transitionnels précurseurs de la zone marginale, LB MZ= lymphocytes B de la zone marginale.

L'ensemble de ces études suggère que les Breg ne relèvent pas que d'une population spécifique. De surcroit, plusieurs sous-populations de LB semblent capables de développer une fonction immuno-regulatrice selon le microenvironnement, les différents signaux reçus et le contexte pathologique.

2.2.3 Les mécanismes d'induction des LB régulateurs

Le caractère régulateur des LB n'apparait pas comme naturel. Plusieurs mécanismes semblent être mis en jeu afin qu'ils puissent acquérir cette propriété.

2.2.3.1 Le signal CD40

Le récepteur CD40 est une protéine membranaire de la famille TNF impliquée comme molécule de co-stimulation dans de nombreux processus immunologiques incluant la maturation des LB. Son imputation dans l'induction de la fonction B régulatrice a été démontrée à de nombreuses reprises. Son blocage dans des modèles murins d'EAE (B6 CD40^{-/-}) [178] ou d'arthrite induite par le collagène [179] a pour conséquence une inhibition de la production d'IL-10 résultant en une incapacité de rémission de la pathologie. Chez l'Homme, l'engagement du CD40 est tout aussi prépondérant. En effet, une stimulation des LB humains *in vitro* par le CD40L va leur conférer un phénotype régulateur «B10». De même que dans le LED, les Breg CD19⁺ CD38^{fort} CD24^{fort} semblent inopérants du fait d'une

déficience de la voie de signalisation CD40/CD40L [180]. Enfin, notre groupe a mis en évidence que la stimulation de CD40 permettait aux LB d'acquérir une fonction régulatrice sur la prolifération des LT, la polarisation Th1/Th2 et l'expansion de Treg en co-culture [181].

2.2.3.2 Le signal du BCR

Le rôle du BCR dans l'induction de la fonction régulatrice n'est pas clairement établi. Cependant quelques éléments permettent de l'envisager. Tout d'abord, la déficience de la molécule CD19 chez les souris (CD19^{-/-}) est responsable d'une diminution de plus de 80% de la fréquence de Breg CD1d^{fort} CD5⁺ ainsi que du nombre de LB IL-10⁺ [202]. Or, la molécule CD19 est un co-récepteur positif du BCR qui intervient dans la modulation de son signal. Ensuite, une étude a démontré que le transfert syngénique de LB activés par le BCR (par stimulation anti-IgM) dans des souris NOD protège ces dernières contre le développement de diabète de type I en sécrétant de l'IL-10 et en augmentant la réponse immunitaire Th2 au dépend de la réponse Th1 [203]. Enfin, la stimulation du BCR permet une augmentation du calcium intracellulaire, avec pour conséquence la modulation de l'expression de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans différents processus (différenciations cellulaires, survie ...). Il est à noter que chez des souris déficientes pour les molécules STIM1 (Stromal interaction molecule 1) et STIM2, indispensables à l'influx calcique et à la signalisation BCR, un développement exacerbé de l'EAE est observé, associé à une diminution du pourcentage de LB sécréteurs d'IL-10. Cette observation sous-entend l'importance du signal BCR via STIM dans l'induction de Breg et dans le contrôle de l'autoimmunité [204].

2.2.3.3 L'implication des récepteurs Toll-like

Les toll-like receptor (TLR) sont impliqués dans la reconnaissance d'agents pathogènes et le déclenchement des réponses immunitaires innées associées (ex: inflammation). Plusieurs éléments semblent démontrer leur implication dans la génération des Breg. Le premier a été mis en évidence par Lenert *et al*, en démontrant la capacité des LB murins de la zone marginale à sécréter de l'IL-10 sous stimulation CpG-ODN, ligand naturel du TLR-9 [205]. Fait intéressant, la sécrétion d'IL-10 va moduler la réponse immunitaire et notamment le contrôle de la différentiation Th1, en inhibant la sécrétion d'IL-12 par les DC [175]. Second élément relatant l'implication des TLR dans l'induction des LB régulateurs, le développement accru du lupus décrit chez les souris MRL/MP^{lpr/lpr} TLR-9^{-/-} est associé à une augmentation de la production d'IFN-y et une exacerbation de la réponse inflammatoire. Cette observation suggère fortement que l'absence de signalisation TLR-9 empêche d'induire des LB capables de protéger les souris contre la maladie auto-immune [206]. A contrario, la délétion du TLR-7 permet une amélioration de l'ensemble des signes cliniques chez ces même souris, montrant un rôle opposé de ces deux récepteurs. Cette étude démontre donc l'implication des TLR dans le développement des pathologies inflammatoires et auto-immunes mais permet également d'envisager une modulation de la réponse immunitaire selon le «contexte», du fait de la reconnaissance de pathogènes différents par ces deux récepteurs. Autre point notoire, le TLR-4 a lui aussi été caractérisé pour son rôle déterminant dans le contrôle de l'EAE [207]. En effet, un pré-traitement des souris avec du LPS, ligand du TLR-4, 3 jours avant l'induction de la pathologie par l'injection de l'antigène MOG 35-55, permet de retarder le développement de l'EAE chez ces dernières en comparaison à des souris non-traitées. Une diminution de la prolifération des LT ainsi que de la capacité des DC à présenter cet antigène aux LT a pu également être observé in vitro en présence de LB isolés chez les souris traitées avec le LPS, tout comme une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α ou l'INF- γ . Enfin, il a été mis en évidence que chez des souris déficientes pour le gène MyD88, protéine directement impliquée dans la signalisation de nombreux TLR (dont les TLR-4, 7 et 9), une augmentation de la production d'IL-17 et d'IFN- γ était visible, reflétant une augmentation de la réponse inflammatoire Th17 et Th1 [208]. De plus, il a été constaté chez ces souris une exacerbation de la pathologie EAE, mettant à nouveau en cause l'absence de Breg chez des souris ne bénéficiant d'aucune signalisation TLR.

Chez l'Homme, la stimulation *in vitro* des LB périphériques par le LPS et le CpG-ODN a été directement associée à une augmentation de la production d'IL-10, indiquant là encore le rôle des TLR dans l'induction de LB régulateurs [188]. De même, que notre groupe a pu constater que la stimulation des LB avec du CpG-ODN, permet d'accroitre leur fonction régulatrice sur la prolifération des LT ou encore l'expansion des LT régulateurs et ainsi démontrer que le TLR-9 joue un rôle prépondérant dans l'efficacité de la réponse des LB régulateurs [181].

2.2.3.4 Les facteurs solubles

La multiplicité des Breg définie précédemment (Tableau 4.) laisse envisager une génération de ces populations sous le contrôle de contextes pathologiques ou microenvironnementaux. Rosser *et al* semblent corroborer cette hypothèse en démontrant que dans le microbiote intestinal des souris, l'IL-1 β et l'IL-6 produits par les macrophages et les DC permettent de promouvoir une réponse inflammatoire et aussi l'induction de Breg [209]. En effet, les auteurs décrivent qu'une stimulation *in vitro* de LB naïfs stimulés par ces deux cytokines permet d'augmenter 4 à 5 fois le taux de LB IL-10⁺, qu'ils soient des LB T2-MZP, des LB CD5⁺, des LB TIM-1⁺ ou des B10. L'augmentation de LB sécréteurs d'IL-10 est également visible chez les souris traitées avec de l'IL-1 β et de IL-6. Le microbiote intestinal semble donc maintenir une balance entre signaux pro- et anti-inflammatoires. Il est à noter que l'utilisation d'antibiotiques peut moduler cet équilibre en diminuant le taux de Breg produits et donc favoriser le développement de maladies inflammatoires.

Autre facteur soluble important dans l'établissement de la fonction régulatrice des LB, la protéine BAFF (B cell-activating factor) membre de la famille TNF et dont le rôle a largement était décrit dans la maturation, l'activité et la survie des LB. Cette cytokine permet en culture in vitro de différencier des LB CD19⁺ spléniques en LB sécréteurs d'IL-10 présentant des caractéristiques phénotypiques proches de celles des cellules de la zone marginale CD21^{fort} CD23^{faible}, mais également en cellules B10 CD5⁺ et CD1d^{fort} [210]. De même qu'un traitement *in vivo* de souris par cette molécule va engendrer une augmentation de la fréquence et du nombre absolu de LB IL-10⁺ dans la rate. Ces LB activés par BAFF vont présenter une activité régulatrice in vitro en inhibant la prolifération des LT mais également in *vivo* puisqu'après transfert de ces LB chez la souris, le développement de l'arthrite induite par le collagène est considérablement retardé. Récemment, un autre groupe a démontré dans un modèle humain, l'implication non pas de BAFF mais de la molécule APRIL (A proliferation inducing ligand), un autre membre de la famille TNF dans l'activation de la sécrétion d'IL-10 par les LB [211]. Ces LB stimulés par APRIL sont capables d'inhiber la sécrétion de TNF-a et d'IFN-γ par les LT. Ces résultats ont été décrit à la fois sur des LB de témoins et des LB de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde.

Enfin, l'IL-21 va également permettre de façonner des Breg producteurs de granzyme B [192] et d'IL-10 (B10) [212]. Tout comme l'IL-33, une cytokine de la famille IL-1, régulant

les réponses anti- et pro-inflammatoires, qui injectée chez la souris va jouer un rôle protecteur contre le développement d'une entérocolite en générant des LB peu conventionnels CD19⁺ CD25⁺ CD1d^{fort} IgM^{fort} CD5⁻ CD23⁻ TIM-1⁻ IL-10⁺ [213].

2.2.3.5 Les autres signaux

Les mécanismes permettant la génération et le maintien des Breg apparaissent tout aussi variés que leur signature phénotypique et l'on peut aisément imaginer que d'autres résultats apporteront de nouvelles informations sur ces processus. Parmi les récentes découvertes, on notera la participation de la molécule TIM-1 [190] ou encore celle de la molécule BIP (Binding immunoglobulin protein), un membre des protéines Heat shock, qui interviennent toutes les deux dans l'expansion de LB IL-10⁺ suppresseurs de la réponse immunitaire [214]. Une population cellulaire suppressive de l'immunité, les MDSC (CD11c⁻ CD11b⁺ GR1⁻), joue également un rôle dans l'induction de Breg et dispose d'un potentiel thérapeutique prometteur dans les maladies auto-immunes notamment dans le lupus [215]. En effet, ces cellules permettent à la fois de générer *in vitro* et *in vivo* des populations caractérisées comme régulatrices, LB IL-10⁺ et LB CD1d^{fort} CD5⁺ mais aussi de diminuer la proportion de plasmocytes. Parallèlement, une inhibition de la réponse inflammatoire est observée *in vivo* chez les souris lupiques, ainsi qu'une diminution de la production des auto-anticorps, de l'infiltrat lymphocytaire et une sous-expression des populations T folliculaires helper (Tfh), Th1 et Th17.

2.2.4 Les mécanismes d'action des LB régulateurs

A l'instar de leurs phénotypes et des mécanismes d'induction, les Breg vont présenter un large éventail de fonctionnalité. Nous verrons que l'activité des Breg ne porte pas uniquement sur la production de l'IL-10, mais que d'autres facteurs solubles ou récepteurs de surface jouent également un rôle clé (Figure 8).

2.2.4.1 Le contrôle de la réponse immunitaire adaptative

Le rôle des Breg sur les LT CD4⁺ a largement été décrit. Il porte essentiellement sur la suppression de la réponse Th1 et Th17 pro-inflammatoire. Que ce soit dans des modèles murins d'EAE [178, 208] ou d'arthrite induite au collagène [216], un défaut en LB sécréteurs

d'IL-10 résulte en une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et IL-17 associée à un développement exacerbé de la pathologie auto-immune.

Le même constat a été fait sur les Breg humains qui vont contrôler la différentiation Th1 de façon IL-10 dépendante [180, 181, 217]. Cependant, un contact cellulaire via les molécules de co-stimulation CD80-CD86 semble tout aussi primordial dans l'activité régulatrice des LB. En effet, un blocage de ces deux protéines entraine une augmentation des cytokines Th1 malgré la présence de l'IL-10. De plus, il est à noter que les Breg peuvent inhiber la prolifération des LT par contact direct CD40-CD40L, indépendamment de la présence d'IL-10 [181] sous l'action du TGF- β [218].

Au delà des pathologies auto-immunes et inflammatoires, les Breg jouent également un rôle prépondérant dans la tolérance chez des individus greffés. Dans un modèle murin, il semble que la délétion des LB et surtout l'absence d'IL-10 permettent la diminution des LT folliculaires régulateurs (Tfr). L'absence de ces dernières va engendrer la migration des Tfh vers la zone T des OLS. La production accrue d'IL-21 et d'IL-6 va alors contribuer au développement des Th17 et à leur migration CCR6 dépendante vers les tissus greffés, augmentant ainsi le risque de rejet de greffe [219].

Récemment, un autre facteur soluble a été identifié pour son rôle clé dans le contrôle de la réponse immunitaire [199]. Il s'agit de l'IL-35 qui est sécrétée par les LB stimulés via le TLR-4 et le CD40. Dans un modèle murin d'EAE, le défaut de cette cytokine provoque une exacerbation de la maladie liée à une franche augmentation de la réponse inflammatoire des Th1 et Th17. Au contraire, dans le cadre d'une infection à *Salmonella enterica* provoquant une pathologie similaire à la fièvre typhoïde humaine, l'absence de l'IL-35 se traduit par un effet protecteur chez les souris et par une résistance vis-à-vis du pathogène en augmentant le nombre de macrophages ainsi que la réponse des LT. Cette étude a permis de démontrer que les Breg étaient à la fois capables d'inhiber la réponse auto-immune ainsi que la réponse antibactérienne en produisant de l'IL-35.

Un autre moyen est mis en œuvre par les Breg pour abolir la réponse inflammatoire Th1, il s'agit de l'induction de la mort cellulaire. Ce processus a été décrit dans un modèle murin portant sur le diabète [220]. Le transfert de LB activés par le LPS peut en effet inhiber le développement de la pathologie en induisant la mort des LT Th1 via la sécrétion de TGF-β et l'expression du récepteur de mort FasL ou encore inhiber l'activation des LT Th1 ainsi que la fonction des cellules présentatrices d'antigènes.

Les Treg représentent une autre cible majeure dans l'activité régulatrice des LB qui se traduit par leur expansion dans le système immunitaire. Que se soit chez la souris [216] ou chez l'Homme [221] l'accroissement du pourcentage de Treg Foxp3⁺ peut avoir lieu sous le contrôle de la production d'IL-10. D'autres facteurs solubles sont aussi inducteurs de Treg. En effet, les LB humains stimulés par le CpG-ODN en co-culture in vitro, ont la capacité d'induire l'expansion de Treg Foxp3, de Treg producteurs d'IL-10 (Tr1) et de Treg producteurs de TGF-β sous la double dépendance du TGF-β et de l'enzyme IDO [218]. Cependant, un contact direct entre LT et Breg ne peut être exclu, puisque l'interaction B7-CTLA4 semble impliquée dans l'induction de ces Treg. De plus, dans un modèle d'EAE, l'expansion de Treg Foxp3 et Tr1, permettant la rémission de la pathologie, nécessite une interaction cellulaire avec les Breg de part leur récepteur B7 [222]. Il est à noter que les Treg sont eux même des cellules suppressives de la réponse immunitaire, leur expansion peut alors être considérée comme un mécanisme indirect mis en œuvre par les Breg afin de limiter l'activité de certaines populations lymphocytaires T. D'ailleurs, récemment une étude a démontré que dans l'EAE, les Treg bien que présents chez les souris présentaient une activité défectueuse contribuant au développement de la maladie. Un transfert de LB régulateurs a pu restaurer cette activité et diminuer l'ensemble des réponses inflammatoires grâce à l'expression à leur surface de BTLA (B and T lymphocyte attenuator), une molécule de costimulation [223].

La suppression de l'activité des LT $CD8^+$ est quant à elle beaucoup moins définie. Toutefois, il s'avèrerait que les LB stimulés au LPS soient en mesure d'induire l'anergie des LT $CD8^+$ *in vitro* en limitant leur prolifération, leur activation ainsi que leur activité cytotoxique [224]. Bien qu'aptes à produire de l'IL-10, l'activité des LB dépend ici de la sécrétion de TGF- β . Qui plus est, une stimulation de ces mêmes LB par des anticorps anti-Ig et anti-CD40 va entrainer une activation et une prolifération des LT $CD8^+$, démontrant l'importance de l'origine des signaux reçus par les LB pour moduler leur activité cytotoxique étude a démontré la capacité des LB de la zone marginale à supprimer l'activité cytotoxique des LT $CD8^+$ (diminution du pourcentage de LT CD8+ sécréteurs de granzyme B) par l'induction de la sécrétion d'IL-10 suite à l'infection de souris par Leishmania [225]. Les Breg sont également à même de contrôler l'activité des DC. Effectivement, notre groupe a montré que la différenciation des monocytes en DC peut être régulée *in vitro* par des LB stimulés via les récepteurs CD40 et TLR-9 ainsi que leur maturation, puisque la présence de ces Breg va générer une expansion de DC exprimant faiblement les récepteurs HLA-DR, CD86 et CD80 [226]. Subséquemment, la fonctionnalité des DC se trouve impactée. Ces cellules se retrouvent dans l'incapacité de sécréter de l'IL-12, et leur aptitude à induire la prolifération des LT va être réduite. La production d'IL-10 n'est pas incriminée dans cette activité suppressive. Mais, la capacité des LB IL-10⁺ à contrôler la polarisation Th2 en diminuant la sécrétion d'IL-12 par les DC, le laissait envisager [175].

Enfin, une boucle de rétrocontrôle a été mise en évidence entre Breg et pDC [227]. La production d'IFN- α et l'engagement de CD40 par les pDC permettraient de différencier les LB CD19⁺ CD24^{fort} CD38^{fort} en cellules régulatrices IL-10⁺ capables de limiter l'activité des LT CD4⁺ ainsi qu'en plasmablastes. En retour, la sécrétion d'IL-10 va restreindre l'activation des pDC et leur aptitude à sécréter de l'IFN- α . Fait intéressant dans le LED, la différenciation des LB transitionnels en Breg est inexistante du fait d'une dérégulation de la signalisation STAT1/3, ce qui pourrait expliquer en partie le développement de la pathologie. Ces résultats présentent un intérêt dans le développement d'immunothérapies puisque le rituximab, un anticorps chimérique dirigé contre la molécule CD20, est à même de restaurer cette communication pDC/LB régulateurs chez les patients.

La réponse immunitaire humorale peut également être contrôlée par les Breg. Notre groupe vient de mettre en évidence la capacité des LB stimulés par TLR-9 et CD40 à réguler la maturation des LT en Tfh, ainsi qu'à inhiber la différenciation Tfh-dépendante des LB en LB mémoires et en cellules sécrétrices d'anticorps (Achour *et al*, 2016, JACI, accepté) (Annexe 4).

2.2.4.2 Le contrôle de la réponse immunitaire innée

Le contrôle de la réponse immunitaire par les Breg passe également par la modulation de certaines cellules de l'immunité innée.

Les LB contribuent au maintien de la tolérance dans l'auto-immunité en activant la prolifération et l'activation des cellules NKT [228]. Dans la SLE, la perte exclusive de l'expression du marqueur de surface CD1d sur les LB, provoque une déficience des LB

corrélée avec une baisse du pourcentage de NKT dans le sang des patients. On notera également que chez les souris déficientes en LB une augmentation du pourcentage de NK granzyme⁺ est observée, suggérant ainsi que les Breg peuvent supprimer la fonction tueuse des cellules NK [225]. Tout comme le confirment Neves *et al*, en démontrant un enrichissement en cellules NK IFN- γ^+ et de neutrophiles sécréteurs de TNF- α chez des souris MyD88^{-/-} déficientes en Breg IL-10⁺ [229].



Figure 8. Les mécanismes de contrôle de la réponse immunitaire par les LB régulateurs.

Les LB régulateurs contrôlent les mécanismes de l'immunité innée et adaptative via des interactions cellulaires CD40-CD40L, CD28-CD80/CD86 ou Fas-FasL ainsi que par la sécrétion de cytokines tels que l'IL-10, le TGF- β ou l'IL-35. B reg= lymphocyte B régulateur, NK= natural killers cells, NKT= natural killer T, MDSC= myeloid-derived suppressor cells, TNF- α = tumor necrosis factor alpha, pDC= cellules dendritiques plasmacytoïde, DC= cellules dendritiques, Th= lymphocyte T helper, T reg= lymphocytes T régulateurs, IL-10= interleukine 10, IFN- γ = interféron gamma, GrB= granzyme B, Tfh= lymphocyte T folliculaire helper. Illustration d'après Rosser *et al* [230].

2.3 Les LB régulateurs dans le cancer

La découverte du rôle des LB dans la régulation de la réponse immunitaire inflammatoire et auto-immune remonte aux années 1970. C'est à cette même période que les premières constatations ont été réalisées sur le rôle pivot des LB dans l'immunité antitumorale. En effet, en 1978 il a été relevé chez les souris traitées par un anticorps anti-IgM, un retard de développement tumoral par rapport à des souris contrôles [231]. Des cas de rémission spontanée ont également pu être observés, suggérant pour la première fois l'implication des LB dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale. D'autres études suivront démontrant respectivement chez les souris μ MT (B^{-/-}) une augmentation de la prolifération des LT et de leur activité cytotoxique corrélée à une inhibition du développement de la tumeur ainsi qu'une augmentation du pourcentage de l'infiltrat cellulaire au niveau de la tumeur associée à une réponse Th1 anti-tumorale exacerbée [232, 233]. Il faudra attendre 2011 pour que le terme Breg soit utilisé dans le développement tumoral [234].

2.3.1 Les mécanismes de suppression de la réponse anti-tumorale

Les mécanismes résultant de la suppression de la réponse anti-tumorale sont encore assez peu connus. Cependant, la fonctionnalité des Breg dans les cancers diffère peu de celle retrouvée dans les pathologies auto-immunes et inflammatoires.

De nombreuses études ont démontré un développement rapide de la tumeur chez des souris contrôles par rapport à des souris déplétées en LB après transfert de cellules cancéreuses EMT-6 (cancers du sein) [235, 236] ou B16 (mélanome) [237]. L'absence de LB chez ces souris est corrélée d'une part par une diminution du pourcentage et de l'activité des Treg Foxp3⁺, et d'autre part à une augmentation de la réponse anti-tumorale Th1 (sécrétion accrue d'IFN-γ) et de l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ (production exacerbée de granzyme B et d'IFN-γ). Fait intéressant, le transfert de LB normaux et de LB IL10^{-/-} va permettre de restaurer l'activité anti-tumorale chez les souris EMT-6 LB^{-/-}, suggérant que le rôle des Breg dans le cancer peut-être IL-10 indépendant [235]. Dans cette même étude, les auteurs ont également mis en évidence que les LB promouvaient le développement tumoral en limitant l'infiltration des cellules NK dans les niches tumorales. Dans un autre modèle murin, après induction d'un carcinome de la peau, une population émergeante de Breg CD19⁺ CD21^{fort} IL-10⁺ va augmenter la susceptibilité des souris vis-à-vis du développement de la tumeur.
L'activité des Breg semble reposer ici sur leur sécrétion de TNF- α , les souris TNF- $\alpha^{-/-}$ démontrant une forte résistance à l'accroissement du carcinome par l'augmentation de l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ et l'augmentation du répertoire macrophagocytaire [238]. L'activité des Breg dans les cancers murins repose donc en majeur partie sur la génération de Treg et la suppression des réponses Th1 et CD8⁺ cytotoxique. Cependant, Yang *et al* évoque également un possible rôle des Breg sur l'angiogénèse, un mécanisme mainte fois décrit dans le maintien et le développement tumoral. En effet, les LB agissent en contrôlant l'activité STAT3 indispensable à la production de facteurs pro-angiogéniques [237].

Chez l'Homme, une population de Breg dans le microenvironnement tumoral de différents cancers solides (ovariens, poumons...) a été pour la première fois identifiée en 2013. Leur activité anti-tumorale repose sur la sécrétion de granzyme B et d'IL-10 sous la stimulation d'IL-21 (produite par les LT CD4⁺) permettant l'inhibition de la prolifération des LT [192]. Depuis d'autres populations de Breg ont pu être identifiées. On notera par exemple que chez les patients atteints de cancers ovariens, une forte proportion de LB IL-10⁺ CD80/CD86^{faible} est retrouvée dans l'ascite, par rapport aux cellules sanguines. Le pourcentage de cette population est positivement corrélé à la sévérité de la maladie. Oue ce soit *in vivo* ou *ex vivo*, ces LB vont être responsables de la génération de Treg Foxp3⁺ et de la suppression de la réponse anti-tumorale Th1 et CD8⁺ [239]. Une autre population de Breg bien connue chez les patients atteints de maladies auto-immunes a été observée dans les tissus tumoraux de patients souffrant de cancers gastriques. Il s'agit des LB transitionnels CD19⁺ CD24^{fort} CD38^{fort} dont le pourcentage est une nouvelle fois positivement corrélé à la proportion de LT Foxp3⁺. Cependant, les auteurs apportent une information nouvelle en démontrant *in vitro* que seule la suppression de la sécrétion de TGF-B1 permet d'empêcher la génération de Treg [240].

L'absence de Breg chez la souris ou chez l'Homme favorise donc l'activité antitumorale des LT en partie grâce à la faible proportion de Treg générés. Il ne faut toutefois pas oublier que les LB peuvent avoir un rôle très bénéfique au sein du système immunitaire et notamment en supprimant le développement tumoral par la sécrétion d'anticorps, la présentation d'antigène ou encore par le déclenchement direct de processus de mort cellulaire [241]. Les mécanismes responsables de l'orientation des LB vers l'une ou l'autre de ces activités restent inconnus. Cependant, nous verrons qu'il n'est pas impossible que les tumeurs elles-mêmes puissent moduler la fonction des LB pour leur propre avantage.

2.3.2 Le rôle clé des cellules tumorales dans la génération des LB régulateurs

Depuis quelques années, il a été établi que l'échappement des tumeurs au sein du système immunitaire était un processus actif dû à l'expansion de cellules suppressives telles que les MDSC ou les Treg par les tumeurs elles-mêmes. Cependant, les mécanismes permettant aux tumeurs de recruter ces cellules suppressives ne sont pas clairement définis.

Olkhanud *et al* ont été les premiers à identifier une population de Breg induite par la tumeur elle-même et suppressive de la réponse anti-tumorale [234]. En effet, que ce soit *in vivo* après induction de la tumeur chez la souris ou en culture *in vitro* de LB naïfs en présence de cellules cancéreuses murines 4T1, des LB IgD^{fort} CD21^{faible} CD23^{faible} CD43⁻ IgM^{int} CD62L^{faible} CD69^{fort} CD80^{fort} CD86^{fort} MCHII^{fort} (phénotype proche des LB B2) sont générés par la tumeur. Remis en culture avec des LT, ces LB appelés tBreg (tumor-evoked regulatory B cells) sont capables d'inhiber la prolifération des LT par contact cellulaire et d'induire l'expansion de Treg Foxp3⁺ sous le contrôle de la production de TGF- β . *In vivo*, l'induction des tBregs semble donc faciliter le recrutement indirect de Treg par la tumeur, responsables de l'échappement des métastases pulmonaires chez la souris. Une autre étude portant sur ce même modèle murin, évoque la production de métabolites par la tumeur tels que le leucotriène B4 afin de promouvoir le développement de ces tBreg et l'établissement de la tumeur [242].

Le facteur de croissance placentaire (PIGF), une protéine impliquée dans les mécanismes d'angiogénèse, semble également impliqué dans la différenciation des LB en Breg promoteurs de tumeurs. Les cellules gliales tumorales humaines sont capables de relarguer une quantité important de PIGF d'origine exosomale. Mise en culture en présence de LB, cette protéine permet l'expansion d'une population lymphocytaire B TGF- β^+ , capable de supprimer la réponse cytotoxique des LT CD8⁺, démontrant ainsi le rôle de ce PIGF dans l'établissement de cellules suppressives par les tumeurs [243].

Enfin récemment, Zhang *et al* ont apporté une autre preuve quant à la capacité des cellules tumorales à générer des Breg suppresseurs de la réponse anti-tumorale [244]. Les cellules cancéreuses murines EMT6 permettent *in vitro* la différenciation de LB spléniques en LB exprimant fortement les marqueurs CD86, PD-L1 et LAP/TGF- β (latency-associated peptide). Ces LB induits *in vitro* inhibent la prolifération des LT CD25⁻ et l'expansion de Treg par contact cellulaire B-T. Fait intéressant, cette même population de Breg a été

identifiée au sein même des niches tumorales chez les souris, dans lesquelles les taux de LT CD8⁺ et de cellules NK se retrouvent fortement diminués.



Figure 9. Les LB régulateurs suppresseurs de la réponse anti-tumorale.

Les LB développent une activité régulatrice suite à leur migration au sein des niches tumorales. Ils vont acquérir la capacité à sécréter des cytokines et contrôler directement ou indirectement la réponse anti-tumorale des LT et cellules NK. LB reg= lymphocytes B régulateurs, LT= lymphocytes T, IFN- γ = interféron gamma, NK= natural killers, TGF- β = Transforming Growth Factor beta. Illustration d'après Zhang *et al* [245].

3 L'objectif de la thèse

Comme nous avons pu le voir au cours de cette introduction, la LLC est une pathologie complexe pour laquelle de nombreuses zones d'ombre existent encore, notamment concernant leurs mécanismes d'expansion. Ces patients présentent également de nombreuses anomalies du système immunitaire, qui sont sans doute en grande partie responsables de l'absence de réponse anti-tumorale. Le rôle des LB de LLC dans ces dysfonctionnements de la réponse immunitaire ne sont toutefois pas encore bien établis.

Nous savons à présent que les LB peuvent acquérir une fonction régulatrice permettant de contrôler la réponse immunitaire innée et adaptative et de générer l'échappement des cellules cancéreuses à cette réponse. La caractérisation de cette population régulatrice prête toujours à débat. En effet, de nombreuses sous-populations lymphocytaires B comme, les cellules de la zone marginale ou les cellules transitionnelles peuvent être considérées comme des Breg. Leurs mécanismes d'action sont tout aussi divers, pouvant nécessiter à la fois un contact cellulaire direct avec la cellule cible ou la sécrétion de facteurs solubles tels que l'IL-10 ou le TGF- β .

Fait intéressant, les LB de LLC partagent certaines caractéristiques phénotypiques avec les Breg. En effet, Dilillo *et al* ont démontré que les LB de LLC ainsi que les LB régulateurs «B10» expriment positivement le marqueur CD5 et fortement les marqueurs CD24 et CD27 [246]. De plus, ces deux types cellulaires sont capables de sécréter de l'IL-10 sous stimulation CD40, TLR-9 ou encore BAFF [247]. On notera d'autres similitudes comme la capacité des LB de LLC à sécréter du granzyme B ou à exprimer des marqueurs tels que CD73 et PD-L1 (Tableau 5.). Nous pouvons également constater que les LB de LLC semblent partager des qualités immunosuppressives avec les Breg, notamment en régulant l'activation de certaines populations cellulaires, la réponse humorale ou encore la polarisation Th1 due à un mécanisme d'IL-10 dépendant. Leur propriété régulatrice IL-10 indépendante permettant de contrôler la prolifération des cellules T n'a jamais été démontrée. D'ailleurs de manière générale, l'identification et le rôle des Breg dans le développement de la LLC sont encore très peu connus. C'est l'objet de revues générales que nous venons de publier dans OncoImmunology et Hématologie [248] (Annexe 1 et 2).

Tableau 5.Marqueurs communs entre LB régulateurs et LB de LLC.

Marqueurs	Références LB régulateurs	Références LB LLC
Granzyme B ⁺	[192]	[125]
CD1d ⁺ CD5 ⁺	[185]	[249]
CD24 ⁺ CD27 ⁺	[188]	[246]
PD-L1 ⁺	[250]	[251]
CD73 ⁺	[195]	[127]

Notre objectif est donc de déterminer si dans la LLC, les LB ont une activité immunosuppressive similaire à celle des Breg permettant d'expliquer la physiopathologie de la maladie et notamment le passage aux stades plus agressifs. Pour ce faire, nous nous sommes concentrés sur la propriété des Breg à contrôler la prolifération des LT, en utilisant un modèle de co-culture *in vitro*.

ANNEXE 1

Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia

Audrey Mohr, <u>Yves Renaudineau</u>, <u>Cristina Bagacean</u>, <u>Jacques-Olivier Pers</u>, <u>Christophe</u> <u>Jamin</u>, <u>Anne Bordron</u>

OncoImmunology, Mars 2016, Vol.5, No.5,

REVIEW

Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia

Audrey Mohr^a, Yves Renaudineau^{a,b}, Cristina Bagacean^{a,b}, Jacques-Olivier Pers^a, Christophe Jamin^{a,b}, and Anne Bordron^a

^aINSERM ESPRI ERI29/EA2216 Laboratory of Immunotherapies and Pathologies of B Lymphocytes, Université de Brest, Labex IGO "Immunotherapy Graft, Oncology," Reseau Epigenetique et Reseau Canaux Ioniques du Cancéropole Grand Ouest, Brest, France; ^bLaboratory of Immunology and Immunotherapy, CHRU Morvan, Brest, France

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by an abnormal expansion of mature B cells in the bone marrow and their accumulation in blood and secondary lymphoid organs. Tumor CLL cells share expression of various surface molecules with many subsets of B cells and have several common characteristics with regulatory B cells (B regs). However, the identification of B regs and their role in CLL remain elusive. The aim of this review is to summarize recent works regarding the regulatory and phenotypic characteristic of B regs and their associated effects on the immune system. It is also meant to highlight their potential importance with regards to the immunotherapeutic response.

ARTICLE HISTORY

Received 21 October 2015 Revised 10 December 2015 Accepted 12 December 2015

Taylor & Francis

Taylor & Francis Group

KEYWORDS B lymphocytes; CLL;

immunotherapy; regulatory B cell

Introduction

CLL is a clinically heterogeneous disease, characterized by CD5 positive monoclonal B cell proliferation in the bone marrow and accumulation in blood and secondary lymphoid organs.¹ The origin of tumor cells in CLL is unknown and, based on their phenotypic characteristics several hypotheses have been formulated in the last few years. These cells can be linked to the B1 lineage found in a mouse model expressing the Ly1/CD5 antigen,² but they are also phenotypically close to naive B cells, mature B cells, and memory B cells.³⁻⁶ Another way to classify CLL cells is related to their functional properties since several functional and phenotypic characteristics resemble the recently described B10 cell subset.⁷ B10 cells produce interleukin (IL)-10 inducing, on the one hand, inhibition of proinflammatory cytokines by T cells, and, on the other hand, the development of regulatory T cells (T regs). Moreover, CLL cells are effective in modulating both the innate and adaptive immune system responses which, in part, could explain the immunodeficiency reported in CLL-prone mouse models and CLL patients, with an impact on the clinical course of the disease.⁸

Last but not least, CLL remains an incurable malignant disease despite the recent development and use of therapeutic antibodies and chemotherapy mainly targeting B cells.⁹ Since immunosuppression is observed in CLL, new strategies of treatment must be developed by taking into account the regulatory functions of CLL cells on cellular immunity. This review is aimed to summarize the functional and phenotypic characteristics of CLL cells to better understand their implication in the immunosuppressive responses, the disease progression, and thereby to point out the development of pertinent immunotherapeutic treatments.

Common activities of B regs and B-cell CLL: Regulation of immune cells

Regulatory functions of B regs

Generally speaking, B regs can be defined based on their immunosuppressive capacities on different effector cell types including T helper cells such as Th1, Th2 and Th17 cells,¹⁰ and natural killer (NK) cells. Dendritic cells (DC) and macrophages can be negatively regulated, since B regs affect their phagocytic capacity both *in vivo* and *in vitro*.^{11,12} In addition to the direct immunosuppressive function, the regulatory effect could be an indirect effect promoting T regs, along which conventional T regs and type 1 regulatory T (Tr1) cells.^{13,14} In mice, NKT cells can also be activated by B regs. These B regs are characterized as marginal zone B cells and type 2 transitional B cells expressing the non-classical major histocompatibility complex (MHC) antigen CD1d and CD21 at high levels.¹⁵ This B reg-dependent NKT activation can eliminate autoimmune or inflammatory responses.^{16,17}

New B regs have been identified in the case of solid tumors: they are named tumoral B regs (tB regs). These cells that strongly express CD19, CD25 and CD69 molecules, like their conventional counterpart, can inhibit Th cell proliferation and are able to activate T reg expansion by transforming naive CD4⁺ T cells.^{18,19} Infiltrating tumor CD19⁺ CD38⁺ CD1d⁺ IgM⁺ CD147⁺ B cells can be considered as B regs due to their capacity to regulate T cell response *via* the production of granzyme B (GrB) which promotes T-cell receptor (TCR) ζ chain degradation.²⁰ Furthermore, GrB⁺ tB regs also express IL-10, CD25 and indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO). The latter enzyme mediates inhibition of T cell proliferation and promotes development of T regs. GrB-derived B regs are found in

Immune cells	Cell subtypes	Increase () or Decrease (\downarrow)	Consequences on normal functions	Disease activity	References
T cells	CD4 ⁺		Immune synapse with APC	Disease progression	38,39
		memory effector CD4 ⁺ with expression of PD-1	↓Immune response	Disease progression	40
		T helpers	B cell proliferation	Disease progression	41
	CD8 ⁺	Terminally differentiated CD8 ⁺ with expression of PD-1	Immune synapse with APC L Cell cytotoxicity	Disease progression	39,40,102
	T reg		Inhibition of CD4 ⁺ T cells	Disease progression	8,42
			Release of CD25		38,39,43,44
NKT	INKT	1	Absence of CD1d+ B CLL cell lysis	Disease progression	51
	NKT like cells	,	Inhibition by T reas		52
Neutrophil granulocytes		¥	Bactericidal activity Migration	Disease progression	54,55
Plasmacytoid dendritic cells		\downarrow	\downarrow Production of IFN α	Aggressive form of disease	57
Monocytes			↓ Production of cytokines ↓ APC	Disease progression	58,103
moMDSCs			\downarrow APC IDO \downarrow HLA DR T reg number	Disease progression	59

Table 1. Immune cells downregulated	or upregulated that participate in the	defective immune responses observed in CLL.
-------------------------------------	--	---

APC, Antigen-presenting cells; CLL, chronic Lymphocytic leukemia; HLA-DR, major histocompatibility complex, class II, DR; IDO, indoleamine 2,3 dioxygenase; IFN, interferon; moMDSCs, myeloid-derived suppressor cells; NKT, natural killer T cell, PD-1, programmed cell death 1, T reg, regulatory T cell.

other human diseases such as tolerant graft recipients or allergy.^{21,22}

It is widely believed that acquisition of B regulatory functions is closely associated with the production of cytokines such as IL-10. The very first demonstrations of this association came from murine models of autoimmune or inflammatory diseases and were then confirmed in humans. Mizoguchi A et al. identified a subset of B cells in a murine model of chronic bowel inflammation that could act as B regs through their ability to produce IL-10.²³ This production is induced by stimulation of Toll-like receptor (TLR) 4 and TLR9.24 It involves the transmission of a signal mediated by the myeloid primary response protein differentiation 88 (MyD88) adaptor, the activation of the nuclear factor $\kappa B - \alpha$ kinase (NF κB), and the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3).^{25,26} There are other mechanisms which induce IL-10 production by B cells that were subsequently identified. Stimulation of the B-cell receptor (BCR) via the B cell linker protein, and activation of calcium signaling via the stromal interaction molecule 1 (STIM-1), or expression of CD5 on the B-cell surface have been associated with elevated production of IL-10.27,28 Moreover, various immunosuppressive cytokines can be produced by B regs. This is the case for the transforming growth factor (TGF)- β which triggers apoptosis of effector T cells and IL-21.^{29,30} More recently, the secretion of IL-21 has been shown to be responsible for an upregulation of IL-10 production in a murine model for multiple sclerosis suggesting a more heterogeneous cytokine profile of the B regs than initially suspected.³¹

Finally, several reports indicate that the activity of B regs can also be modulated. Thus, after the BCR engagement and CD40 stimulation, peripheral blood B cells proliferate and secrete the tumor necrosis factor (TNF)- α , lymphotoxin and IL-6, stimulating immune responses.³² Alternatively, if B cells receive only CD40 stimulation in the absence of BCR activation, they produce negligible amounts of pro-inflammatory cytokines, but also a significant level of IL-10 and then can be identified as B regs.³² Similarly, when treated with IL-2, marginal zone B cells can shift into a B reg phenotype since they produce a low level of TNF- α and an extremely high level of IL-10.²⁴ However, when activated by the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway via the Ras proteins called nucleoside guanyl releasing proteins (RAS, GTP), the production of IL-10 by the marginal zone B cells is stopped while the synthesis of TNF- α and TNF- β is increased, leading to the acquisition of effector capacities for T cell stimulation.^{33,34} Recent studies indicate that the number of B regs is decreases with age and contributing to the susceptibility for autoimmune reactions as described in murine models.³⁵

Regulatory functions of B-cell CLL

Acquisition of B reg functions in CLL is an important yet barely explored aspect in the disease. It has been suggested that it might be controlled by the tissue location of CLL cells rather than the CLL's origin, e.g. the unmutated vs. mutated status of IgVH. Consistent with this hypothesis, it has been demonstrated that CLL cells in lymph nodes over-expressed a high number of genes associated with immune tolerance (CAV1, MCM3, BATF) compared with those found in B cells from the bone marrow or the peripheral blood.³⁶ The influence of the microenvironment on cellular behavior in CLL is strongly supported by these observations.

Moreover, CLL cells are characterized by their plasticity related to their ability to produce IL-10. The regulatory functions and the capacity to produce IL-10 are maintained in cultured CLL cells when they are stimulated by TLR agonists such as CpG-ODN and/or CD40. However, these effects can be reversed in response to BCR stimulation or when using diacyl-glycerol agonists. In the latter conditions, CLL cells acquire the characteristics of effector B cells with the ability to activate T cells.³⁷

CLL cells can mediate an immunosuppressive effect on different effector cells and can induce T regs. However, CLL T cells were found deficient in their capacity to constitute competent immunological synapses with antigen-presenting cells (APC).³⁸ Gorgun *et al.* determined that this defect concerns CD4⁺ T cells with consequences such as defective cellular differentiation as well as defects in cytoskeletal formation and vesicle trafficking.³⁹ Moreover, the level of effector memory CD4⁺ T lymphocytes from CLL patients is increased when compared

Table 2. Phenotypic characteristics of B CLL as regulatory B cells.

Phenotypic characteristics shared by regulatory and CLL B cells	Reg B cells References/Species studied	CLL B cells References/Species studied
CD1d ^{hi} CD19 ⁺	²³ /Mice	⁴⁶ /Human
	¹⁰⁴ /Mice	⁴⁵ /Human
CD1d ^{hi} CD5 ⁺	⁶³ /Mice	¹ /Human
CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{hi} (B10)	⁶¹ /Human	⁷² /Human
		⁷¹ /Human
CD24 ^{hi} CD27 ⁺ IL-10 ⁺ (B10)	⁶² /Human	⁴ /Human
		⁷ /Human, Mice
CD19 ⁺ granzyme B ⁺	²⁰ /Human	⁷³ /Human
3		⁷⁴ /Human
TACI IL-10 ⁺	⁶⁶ /Human	⁶⁶ / Human, Mice

to controls, and it is positively associated with a more advanced stage of the disease with treatment requirements and with unfavorable genomic aberrations.40 T cells from CLL patients express more programmed death-1 receptor (PD1) than normal T cells, a receptor involved in tumor-mediated immunosuppression, explaining the correlation between its expression and the progression of the disease. Surprisingly, the cross-talk between CLL cells and T helper cells through cell surface CD40-CD40L co-ligation is effective and induces malignant B cell proliferation.41 Moreover, a defective cytotoxic activity of CD8⁺ T cells was observed which is related to the presence of CLL cells. Thus, healthy control CD8⁺ T cells can be rendered deficient when co-cultured with CLL cells.³⁹ These changes are mainly mediated by direct intercellular contact. CD8⁺ T cells also express PD-1, at their terminally differentiated stage, contributing to the immunosuppression observed in CLL (Table 1).40 In addition, an elevated number of circulating CD4⁺ or CD8⁺ T regs has been noted.⁴² These T regs are effective and induce transcriptional downregulation of the TCR in naive T cells responsible for defective maturation into Th cells. Furthermore, T regs are characterized by an elevated expression of CD25. It has been suggested that excessive soluble CD25 found in CLL patients could result from T reg cell surface release. As CD25 constitutes the α chain of the heterotrimeric IL-2 receptor, the soluble CD25 isoform could prevent IL-2 binding to the effective T cells and consequently could act as an antagonist of cytokine signaling, counteracting the IL-2 antitumor activities.⁴³ The T reg expansion is present very early in the course of CLL and the T reg level is positively associated with the disease progression (Table 1).8,44

CLL cells can also regulate NKT and NK cells. They express more CD1d molecules on their surface than normal B cells and the expression density is correlated with the clinical outcome. High CD1d expression is associated with a poor outcome and unfavorable prognosis (Table 1).^{45,46} According to their reactivity with the α -galactosylceramide glycolipid (GalCer) presented by CD1d and by their TCR, NKT cells can be divided into three subgroups.⁴⁷ Type I includes invariable cells called iNKT that in humans express a restricted TCR consisting of a V α 24-J α 18 invariant chain and a Vß11 variable chain.⁴⁸ These cells are dependent on the GalCer recognition by their TCR presented by CD1d. Type II NKT cells are also dependent on CD1d but express a more variable TCR α chain.⁴⁹ Finally, type III NKT cells, called NKT-like cells, are independent from the CD1d molecules and express semi-invariant TCR.⁵⁰ In CLL, type I and type II NKT cells recognize the α Gal-Cer antigen presented by the CD1d molecules of CLL cells, leading to tumor cell death.⁵¹ A reverse correlation is found between the percentage of CD1d⁺ CLL cells and the percentage of type I iNKT cells. Although not regulated by CD1d, type III NKT-like cells are also suspected to play an immunoprotective role in CLL and this assertion is also supported by the inverse correlation observed between the number of these cells, the T regs frequency, and the CLL disease progression (Table 1).⁵² In addition to their immunoregulatory function on NKT cells, CLL cells provide resistance to the NK cellular cytotoxic activity. Because CLL cells express the HLA-G tolerogenic molecule, they inhibit the NK cell killer function. It should be noted that the NK-dependent ADCC mechanism is also altered during B CLL.⁵³

Finally, CLL cells regulate myeloid phagocytic cells. Neutrophils play a major role in fighting infections through their ability to migrate, to produce cytokines, and to recruit immune cells. All these activities are deficient in CLL. The neutrophil migration and the chemotaxis mediated by C5a and N-formyLmethionylleucylphenylalanine (fMLP) are impaired.⁵⁴ Dysfunction in the bactericidal activity against key non-opsonized bacteria has been reported, while the micro bactericidal response against fungi seems normal (Table 1).55 Besides, DC are subdivided into various subtypes of conventional DC and plasmacytoid DC (pDC). Both DC subtypes are effective in promoting normal antigen presentation to CD4⁺ T cells due to increased expressions of class II MHC molecules, co-stimulation molecules, and inflammatory cytokines.⁵⁶ However, a lower number and a reduced efficacy of pDC have been observed recently in progressive forms of CLL (Table 1).⁵⁷ Contrarily, the number of monocytes appears to be increased,⁵⁸ but it is associated with a qualitative impairment because monocytes dimly express HLA-DR MHC class II and CD86 molecules. These observations suggest that monocytes in CLL are not very efficient APCs and possess only a low capacity to stimulate the immune system, which would accelerate the disease progression (Table 1). These cells display several characteristics of the recently described monocytes myeloid-derived suppressor tumor cells (moMDSC) known to contribute to cancer development by supporting cancer growth; cancer scattering leads to metastasis and it has a negative impact on the regulation of the immune system. In agreement with a supplementary immunomodulatory effect, it has been recently reported that monocytes express high amounts of IDO in CLL.⁵

Common phenotypic characteristics of B regs and B-cell CLL

Phenotypic comparisons of B regs and CLL cells highlight interesting common characteristics suggesting CLL cells' unexpected functional activities.

Phenotypic characteristics of B regs

The phenotypic signature of B regs remains controversial and no consensus has emerged to characterize B regs in contrast to their T cell counterparts.⁶⁰ Blair *et al.* and Lindner *et al.* defined human B regs as B cells expressing CD38⁺ CD1d⁺ IgM⁺ CD147⁺ and GrB within the B-cell immature subset CD19⁺ CD24⁺ CD38^{high}, respectively.^{20,61} In contrast, for Iwata *et al.*, human B regs were related to memory B cells (CD24^{hi}CD27⁺).⁶² For others, they could be transitional precursor B cells of the marginal zone identified as CD19⁺ CD21⁺ CD23⁺ CD24⁺ IgM⁺ cells, but also B10 cells (CD19⁺ CD5⁺ CD1d⁺) expressing IL-10 (Table 2).⁶³

A distinct subtype of IL-10-producing B regs with the unique phenotype CD19^{hi}Fc γ RIIb^{hi} was recently observed in a murine model.⁶⁴ This phenotype is dependent on CD40-CD40L activation, known to play a major role in the induction of functional B regs and to enhance IL-10 producing transitional type 2-immature-like B reg subsets in the Mrl/lpr murine model (Table 2).⁶⁵

Recently, it has been pointed out that the expression of the BAFF receptor TACI as a phenotypic characteristic of B regs that mediates the B reg IL-10 production (Table 2).⁶⁶

Phenotypic characteristics of B-cell CLL

Some phenotypic modifications of B CLL cells result from cytogenetic alterations and mutations. Their identification provides better understanding of the origin and physiopathology of the disease.⁶⁷ Phenotypic studies highlight the identification of various sub-populations associated with the progression of the disease or with cytogenetic anomalies. Thus, CD19⁺ CD27⁻ B cells derived from CD5⁺ mature B cells with unmutated IgVH seem to be clearly dissociated from the CD19⁺CD27⁺ B cells derived from post germinal center B cells with mutated IgVH.⁵ However, this dichotomy has not been seen by other authors. So, Klein *et al.* demonstrated that the gene profiles and the CLL origin are independent from the IgVH genotype, suggesting a homogeneous phenotype of memory CD27⁺ B cells (Table 2).⁴

CLL cells produce IL-10, *via* a pathway that involves CD5 through the downstream activation of the two transcription factors STAT3 and NFAT2.²⁸ The contribution of CD5 has been confirmed in experimental approaches in CLL cells to produce IL-10 by using small interfering (si)CD5 RNAs that lower the production of IL-10. On the other hand, forcing CD5 expression in human B cells, with plasmid technology, promotes IL-10 expression. Moreover, the IL-10 level in serum is increased in CLL compared to controls.⁶⁸

Another common characteristic of CLL cells and B regs is the expression of the cell surface CD38 ectoenzyme that promotes cytokine production, B CLL migratory potential through the hydrolysis of nicotinomide adenine dinucleotides (NAD) to cyclic adenosine dinucleotide-phosphate (ADP)-ribose, and the control of intracellular Ca²⁺ levels.^{69,70} This marker is correlated with the CLL disease activity facilitating CLL cell circulation within the lymph nodes and favoring tumor growth and survival.^{71,72}

Furthermore, CLL cells can also express CD1d and produce GrB to gain cytotoxic potential after activation by IL-21.⁷³ GrB production is further enhanced following stimulation of TLR9 with CpG-ODN and in the presence of IL-21 (Table 2).^{74,75} Interestingly, the level of TLR9 expression in CLL appears to be positively correlated with the expression of the immunosuppressive molecule HLA-G and its receptor CD85j.

CLL cells also express the Fc γ RIIb molecule similar to B regs. This expression is detrimental to the efficacy of rituximab (RTX), a therapeutic anti-CD20 antibody. In fact, Fc γ RIIb allows RTX internalization in a *cis* manner and after phosphorylation becomes internalized along with CD20: anti-CD20 complexes before lysosomal degradation.⁷⁶

Finally, as described for the B regs, BAFF stimulation promotes IL-10 production by CLL cells in a murine model of CLL but also in CLL patients.⁶⁶ The intracellular signaling pathway looks identical to that found in B regs and the expression of TACI on the surface of CLL cells is promoted by the stimulation of CD40 and IL-4R engagement.⁷⁷

What are recent immunotherapies ensuing from the Implication of B-cell CLL cells as B regs?

The actual gold standard for treating CLL patients is based on chemotherapy associated with monoclonal antibodies (mAb). RTX was the first chimeric anti-CD20 mAb approved by the Food and Drug Administration for the treatment of non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and CLL. However, resistance and relapses are frequently observed.^{78,79} This raises the problem of cell targeting and also the deleterious effect of CLL on the immune system which must be improved by efficient immunotherapy. Overall, clarification of functional and phenotypic characteristics of B CLL cells should facilitate the development of efficient therapeutic strategies based on the implications of B regs in CLL.

Treatments that reverse B CLL regulatory functions

Co-stimulatory molecules and T cell activation

Re-educating CLL cells from a B reg phenotype to effector B cells is an interesting approach. To this end, prerequisites are required, including CLL capacity to express important co-stimulatory molecules to activate competent T lymphocytes. The protein kinase C (PKC) agonist bryostatin is a possible candidate. Thus, treating CLL cells with bryostatin increases their capacity to stimulate a T cell response, Th1 cytokine production, and expression of co-stimulatory molecules (Fig. 1).⁸⁰

Moreover, re-educating T cells into effector T cells can be achieved by using T cell therapy. It is currently possible with chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. CARs are designed to recognize a specific antigen on target cells and are composed of intracellular T-cell signaling domains fused primarily to single-chain variable fragments (scFvs) from mAbs directed to this specific antigen. Retroviral construction leads to the expression of CAR on the T cell surface. A CD19-targeting T CAR has been successfully tested inducing CLL cell lysis by the activation of T cells.⁸¹ A supplementary co-stimulatory signal by CD28 may be necessary to increase the antitumor efficacy of the T cells (Fig. 1).⁸²

CD40L

CD4⁺CD40L⁺ T cells in proliferative centers play an essential role in CLL cell activation, proliferation and survival. Triggering CD40 in B-cell lymphoma cell lines has been reported to suppress growth and to induce apoptosis in some cases.⁸³ However, treatment with Lucatumumab, an anti-CD40 antagonist



Figure 1. Immunotherapies based on regulatory B characteristics of B CLL cells. Several immunotherapies are based on the re-education of T cell activation. They are mediated by bryostatin with expression of co-stimulatory molecules and Th1 cytokine production, the T CAR targeting CD19 on B CLL cells, transfection of CD40L into B CLL cells, use of blinatumomab (anti-CD3xanti-CD19 bispecific Ab), polarized DC and lenalidomide leading Th17 expansion and production of pro-inflammatory cytokines. Other immunotherapies use the modulation of T regs. This could be realized by blockage of CD200 on B CLL cells and thalidomide, fludarabine, green tea constituents and mAb targeting CD25 or CTLA-4. Finally, stimulation of NK cells and increase of ADCC are realized by recombinant IL-15 and lenalidomide. NK cells can produce BAFF after binding of the anti-CD20 Ab rituximab to NK Fc receptor. A neutralizing anti-BAFF Ab, belimumab, prevents metabolism of CLL cells and restores efficacy of NK cells. Kuromamin, a CD38 inhibitor causes a decrease of CLL cells in the bone marrow and in the spleen but also, an increase in the peripheral blood. Ab, antibody; ADCC, anti-body dependent cellular cytotoxicity; CAR, chimeric zntigen receptor T-cell therapy; CD40L, CD40 ligand; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CTLA-4, (cytotoxicit T-lympho-cyte-associated protein 4); DC, dendritic cell; mAb, monoclonal antibody; NK, natural killer; Rhuman IL-15, recombinant IL-15; Th, T helper; T reg, regulatory T cells.

Ab, appears to have minimal clinical efficacy.⁸⁴ In addition, CLL cells weakly express the costimulatory CD80/CD86 molecules, which makes them poorly effective APC. Genetic therapy based on transfection of CD40L in B-cell CLL was tested and found to promote CLL-specific autologous cytotoxic T lymphocytes *in vitro* (Fig. 1) due to an increased expression of upregulating CD80/CD86 co-stimulatory and CD54 adhesion molecules.^{85,86}

CD200

Targeting CLL immune modulatory CD200 molecules is another interesting approach. Their blockage contributes to the

inhibition of T reg activity and enhances the cytotoxic T cell response.⁸⁷ The expression of CD200 is upregulated on CLL cells and their stimulation is sufficient to induce T regs, and to downregulate the Th1 response by decreasing IL-2 and IFN γ pro-inflammatory cytokine synthesis (Fig. 1).^{88,89}

CD38

In CLL, expression of CD38 represents a marker of disease aggressiveness with a poor survival prognosis. For this reason, the effects of Kuromamin, a CD38 inhibitor, have been evaluated. Its use causes a decrease of CLL cells in the bone marrow and in the spleen but also, an increase in the peripheral blood (Fig. 1). $^{71}\,$

Treatments that restore immune regulation

Innate immune system

The ability of NK cells to lyse CLL cells by direct contact or through ADCC is compromised in CLL patients. Different strategies were developed to restore efficient killer NK activities. For example, the recombinant human IL-15 (rhIL-15) was used and showed the restoration of the trans-presentation between CLL cells and NK cells that further promotes the activation and proliferation of the latter cells leading to leukemic B cell depletion and ADCC reaction in the presence of anti-CD20 antibodies such as RTX (Fig. 1). 90-92 Moreover, binding of RTX to NK Fc receptor induces the production of BAFF by NK cells enhancing CLL metabolic activity which impairs the NK direct lysis and the RTX-induced cell lysis by RTX. These observations encourage the use of belimumab, the neutralizing anti-BAFF antibody, in CLL. The metabolism of CLL cells is prevented and the efficacy of NK cells is restored in allogeneic and autologous systems (Fig. 1).93

Finally, the use of DCs to kill malignant cells is also supported by Junevik *et al.* DCs isolated from patients and expressing a strong functional rate of CD70 were identified and called α -type 1- polarized DC (α DC1s) (Fig. 1).⁹⁴ These cells produce IL-12p70 causing the activation of effector cells. To achieve the upregulation of CD70 expression on them, DCs are incubated in the presence of PGE2 (prostaglandin E2). This generates functionally activated cells leading to T-cell survival. Further research on pDCs demonstrated a possible increase of their activity using TGF- β and TNF inhibitors. Following this strategy, the tumor mass decreased.⁵⁷

An adaptive immune system

The deficient activity of effector T cells is partially due to their direct interactions with CLL cells.³⁸ Lenalidomide, a thalidomide analog, was studied based on its anti-neoplastic, anti-angiogenic, pro-erythropoietin and immunomodulatory activities. This drug stimulates T cells through CD28, leads to Th17 expansion and generates the production of pro-inflammatory cytokines, T reg repression and NK ADCC increased the effect (Fig. 1).95 Adaptive therapy was recently elaborated.96 A bispecific (CD3 \times CD19) antibody, blinatumomab, has been designed, acting both as a T cell stimulator and a CLL depletion agent. Associated with the recombinant human IL-2, ex vivo peripheral blood mononuclear cells from CLL patients were incubated for 3 weeks with blinatumomab. T cells were mostly effector and central memory cells with the Th1 subset dominating and were efficiently cytotoxic against CLL in the presence of the bispecific Ab (Fig. 1).

T regs

Various therapeutic molecules demonstrated their ability to modulate T reg activity in CLL such as fludarabine, thalidomide and more recently green tea constituents, for patients in the early stage of the disease.^{42,97,98} Other treatments are currently in development including mAb targeting CD25 or CTLA-4 molecules (Fig. 1).^{99,100} These antibodies are being tested in

clinical trials for hematological or solid tumors. However, if T reg inhibition shows interesting results, this will become an area of intense research. It has been indeed reported in NHL that T reg cells were capable of killing the malignant cells with significant impact on survival.¹⁰¹

Conclusions

A better comprehension of the immune responses and characterization of the impact of B-cell CLL as B regs in these responses are worthy of pursuit in order to establish new efficient treatments.

Disclosure of potential conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

We are grateful to the "Ligue contre le Cancer," "association Laurette Fugain," Agence Nationale de la Recherche under the "Investissement d'Avenir" program with the reference ANR-11-LABX-0016-001, and the "Région Bretagne" for their support. Thanks are also due to Geneviève Michel and Simone Forest for their help typing of the paper. The editorial assistance of Dr. Wesley H. Brooks, University of South Florida, USA, is greatly appreciated.

References

- Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia-an accumulative disease of immunolgically incompetent lymphocytes. Blood 1967; 29: Suppl:566-84; PMID:6022294
- Phillips JA, Mehta K, Fernandez C, Raveche ES. The NZB mouse as a model for chronic lymphocytic leukemia. Cancer Res 1992; 52:437-43; PMID:1370214
- Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. Blood 2011; 117:1781-91; PMID:21148333; http://dx.doi.org/ 10.1182/blood-2010-07-155663
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L 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; PMID:11733577; http://dx.doi.org/10.1084/jem. 194.11.1625
- Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Durig J, Kuppers R. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med 2012; 209:2183-98; PMID:23091163; http://dx.doi.org/10.1084/jem.20120833
- Forconi F, Potter KN, Wheatley I, Darzentas N, Sozzi E, Stamatopoulos K, Mockridge CI, Packham G, Stevenson FK. The normal IGHV1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic patterns characteristic of unmutated CLL. Blood 2010; 115:71-7; PMID:19887677; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-06-225813
- DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, Matsushita T, Matta KM, Chen Y, Venturi GM et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. Leukemia 2013; 27:170-82; PMID:22713648; http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.165
- Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A, Hojjat-Farsangi M, Khoshnoodi J, Razavi SM, Jeddi-Tehrani M, Shokri F. Increased frequency of CD8+ and CD4+ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. Cancer Invest

2013; 31:121-31; PMID:23286587; http://dx.doi.org/10.3109/ 07357907.2012.756110

- Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. Blood 2013; 122:3723-34; PMID:24065239; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-05-498287
- Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Munoz-Suano A, Kamanaka M, Ehrenstein MR, Flavell RA, Mauri C. 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; PMID:21464089; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1100284
- Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and latephase immunopathogenesis. J Immunol 2010; 185:2240-52; PMID:20624940; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1001307
- Wong SC, Puaux AL, Chittezhath M, Shalova I, Kajiji TS, Wang X, Abastado JP, Lam KP, Biswas SK. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. Eur J Immunol 2010; 40:2296-307; PMID:20468007; http://dx.doi.org/10.1002/eji.200940288
- Carter NA, Rosser EC, Mauri C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 2012; 14:R32; PMID:22315945; http://dx.doi.org/ 10.1186/ar3736
- Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, Mauri C. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. Sci Transl Med 2013; 5:173ra23; PMID:23427243; http://dx.doi.org/10.1126/ scitranslmed.3005407
- Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, Lamers MC, Carsetti R. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. J Exp Med 1999; 190:75-89; PMID:10429672; http://dx.doi. org/10.1084/jem.190.1.75
- Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A, Bach JF, Monteiro RC. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. J Exp Med 1998; 188:1831-9; PMID:9815260; http://dx.doi. org/10.1084/jem.188.10.1831
- Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, Exley M, Snapper S, Balk SP, Hagen SJ et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. Gastroenterology 2000; 119:119-28; PMID:10889161; http://dx.doi.org/10.1053/gast.2000.9114
- Olkhanud PB, Rochman Y, Bodogai M, Malchinkhuu E, Wejksza K, Xu M, Gress RE, Hesdorffer C, Leonard WJ, Biragyn A. Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. J Immunol 2011; 186:5656-62; PMID:21490155; http://dx.doi.org/ 10.4049/jimmunol.1100463
- He Y, Qian H, Liu Y, Duan L, Li Y, Shi G. The roles of regulatory B cells in cancer. J Immunol Res 2014; 2014:215471; PMID:24991577
- Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, Beyer T, Reister F, Fabricius D, Lotfi R et al. Interleukin 21induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. Cancer Res 2013; 73:2468-79; PMID:23384943; http://dx.doi. org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3450
- Chesneau M, Michel L, Dugast E, Chenouard A, Baron D, Pallier A, Durand J, Braza F, Guerif P, Laplaud DA et al. Tolerant kidney transplant patients produce B cells with regulatory properties. J Am Soc Nephrol 2015; 26:2588-98; PMID:25644114; http://dx.doi.org/ 10.1681/ASN.2014040404
- Braza F, Chesne J, Castagnet S, Magnan A, Brouard S. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. Allergy 2014; 69:1454-63; PMID:25060230; http://dx.doi.org/10.1111/all.12490
- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. Immunity 2002; 16:219-30; PMID:11869683; http://dx.doi.org/ 10.1016/S1074-7613(02)00274-1

- Miles K, Heaney J, Sibinska Z, Salter D, Savill J, Gray D, Gray M. A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109:887-92; PMID:22207622; http://dx.doi.org/ 10.1073/pnas.1109173109
- Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. Arthritis Res Ther 2013; 15 Suppl 1:S1; PMID:23566714; http://dx.doi.org/10.1186/ar3907
- Yang X, Yang J, Chu Y, Wang J, Guan M, Zhu X, Xue Y, Zou H. T follicular helper cells mediate expansion of regulatory B cells via IL-21 in Lupus-prone MRL/lpr mice. PLoS One 2013; 8:e62855; PMID:23638156; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062855
- Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. Immunity 2011; 34:703-14; PMID:21530328; http://dx.doi.org/10.1016/j. immuni.2011.03.016
- Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, Berthou C, Mageed RA, Renaudineau Y, Youinou P. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. J Immunol 2011; 186:4835-44; PMID:21398617; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003050
- Noh G, Lee JH. Regulatory B cells and allergic diseases. Allergy Asthma Immunol Res 2011; 3:168-77; PMID:21738882; http://dx. doi.org/10.4168/aair.2011.3.3.168
- Snir A, Kessel A, Haj T, Rosner I, Slobodin G, Toubi E. Anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab): a B cell targeting therapy. Clin Exp Rheumatol 2011; 29:697-700; PMID:21813064
- Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ, Tedder TF. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. Nature 2012; 491:264-8; PMID:23064231; http:// dx.doi.org/10.1038/nature11501
- Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? J Immunol 2004; 172:3422-7; PMID:15004141; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol. 172.6.3422
- 33. Stang SL, Lopez-Campistrous A, Song X, Dower NA, Blumberg PM, Wender PA, Stone JC. A proapoptotic signaling pathway involving RasGRP, Erk, and Bim in B cells. Exp Hematol 2009; 37:122-34; PMID:19100522; http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2008.09.008
- Tomic J, White D, Shi Y, Mena J, Hammond C, He L, Miller RL, Spaner DE. Sensitization of IL-2 signaling through TLR-7 enhances B lymphoma cell immunogenicity. J Immunol 2006; 176:3830-9; PMID:16517754; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3830
- Yokoyama T, Yoshizaki A, Simon KL, Kirby MR, Anderson SM, Candotti F. Age-dependent defects of regulatory B cells in Wiskott-Aldrich syndrome gene knockout mice. PLoS One 2015; 10: e0139729; PMID:26448644; http://dx.doi.org/10.1371/journal. pone.0139729
- 36. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rai KJ, Gilling-Cutucache CE, Nordgren TM, Moragues M, Lu R, Opavsky R, Bociek GR, Weisenburger DD et al. Chronic lymphocytic leukemia cells in a lymph node microenvironment depict molecular signature associated with an aggressive disease. Mol Med 2014; 20:290-301; PMID:24800836; http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2012.00303
- Spaner DE, Shi Y, White D, Mena J, Hammond C, Tomic J, He L, Tomai MA, Miller RL, Booth J et al. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia 2006; 20:286-95; PMID:16341037; http://dx.doi.org/ 10.1038/sj.leu.2404061
- Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgun G, Le Dieu R, Blum W, Byrd JC, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. J Clin Invest 2008; 118:2427-37; PMID:18551193; http://dx.doi.org/10.1172/JCI35017
- Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, Neuberg D, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. J Clin Invest 2005; 115:1797-805; PMID:15965501; http://dx.doi.org/10.1172/JCI24176

- Brusa D, Serra S, Coscia M, Rossi D, D'Arena G, Laurenti L, Jaksic O, Fedele G, Inghirami G, Gaidano G et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica 2013; 98:953-63; PMID:23300177; http://dx.doi.org/ 10.3324/haematol.2012.077537
- 41. Os A, Bürgler S, Ribes Anna P, Funderud A, Wang D, Thompson Keith M, Tjønnfjord Geir E, Bogen B, Munthe Ludvig A. Chronic lymphocytic leukemia cells are activated and proliferate in response to specific T helper cells. Cell Rep 2013; 4:566-77; PMID:23933259; http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.011
- 42. Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, Knolle PA, Thomas RK, von Bergwelt-Baildon M, Debey S et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. Blood 2005; 106:2018-25; PMID:15914560; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-02-0642
- Lindqvist CA, Christiansson LH, Simonsson B, Enblad G, Olsson-Stromberg U, Loskog AS. T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. Immunology 2010; 131:371-6; PMID:20518821; http:// dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03308.x
- Christopoulos P, Pfeifer D, Bartholome K, Follo M, Timmer J, Fisch P, Veelken H. Definition and characterization of the systemic T-cell dysregulation in untreated indolent B-cell lymphoma and very early CLL. Blood 2011; 117:3836-46; PMID:21270444; http://dx.doi.org/ 10.1182/blood-2010-07-299321
- Bojarska-Junak A, Hus I, Chocholska S, Tomczak W, Wos J, Czubak P, Putowski L, Rolinski J. CD1d expression is higher in chronic lymphocytic leukemia patients with unfavorable prognosis. Leuk Res 2014; 38:435-42; PMID:24418751; http://dx.doi.org/10.1016/j. leukres.2013.12.015
- Weinkove R, Brooks CR, Carter JM, Hermans IF, Ronchese F. Functional invariant natural killer T-cell and CD1d axis in chronic lymphocytic leukemia: implications for immunotherapy. Haematologica 2013; 98:376-84; PMID:23065503; http://dx.doi.org/10.3324/ haematol.2012.072835
- Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? Nat Rev Immunol 2004; 4:231-7; PMID:15039760; http://dx.doi.org/10.1038/nri1309
- Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. Annu Rev Immunol 2007; 25:297-336; PMID:17150027; http://dx.doi.org/ 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711
- Blomqvist M, Rhost S, Teneberg S, Lofbom L, Osterbye T, Brigl M, Mansson JE, Cardell SL. Multiple tissue-specific isoforms of sulfatide activate CD1d-restricted type II NKT cells. Eur J Immunol 2009; 39:1726-35; PMID:19582739; http://dx.doi.org/10.1002/ eji.200839001
- Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. Nat Immunol 2010; 11:197-206; PMID:20139988; http://dx.doi.org/ 10.1038/ni.1841
- Fais F, Morabito F, Stelitano C, Callea V, Zanardi S, Scudeletti M, Varese P, Ciccone E, Grossi CE. CD1d is expressed on B-chronic lymphocytic leukemia cells and mediates alpha-galactosylceramide presentation to natural killer T lymphocytes. Int J Cancer 2004; 109:402-11; PMID:14961579; http://dx.doi.org/10.1002/ijc.11723
- Jadidi-Niaragh F, Jeddi-Tehrani M, Ansaripour B, Razavi SM, Sharifian RA, Shokri F. Reduced frequency of NKT-like cells in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia. Med Oncol 2012; 29:3561-9; PMID:22669567; http://dx.doi.org/10.1007/s12032-012-0262-4
- Maki G, Hayes GM, Naji A, Tyler T, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Gregory SA. NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. Leukemia 2008; 22:998-1006; PMID:18288133; http://dx.doi.org/ 10.1038/leu.2008.15
- Itala M, Vainio O, Remes K. Functional abnormalities in granulocytes predict susceptibility to bacterial infections in chronic lymphocytic leukaemia. Eur J Haematol 1996; 57:46-53; PMID:8698131; http://dx.doi. org/10.1111/j.1600-0609.1996.tb00489.x

- 55. Kontoyiannis DP, Georgiadou SP, Wierda WG, Wright S, Albert ND, Ferrajoli A, Keating M, Lewis RE. Impaired bactericidal but not fungicidal activity of polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma 2013; 54:1730-3; PMID:23163595; http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2012.750723
- Messmer D, Telusma G, Wasil T, Messmer BT, Allen S, Rai KR, Chiorazzi N. Dendritic cells from chronic lymphocytic leukemia patients are normal regardless of Ig V gene mutation status. Mol Med 2004; 10:96-103; PMID:16113842
- Saulep-Easton D, Vincent FB, Le Page M, Wei A, Ting SB, Croce CM, Tam C, Mackay F. Cytokine-driven loss of plasmacytoid dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2014; 28:2005-15; PMID:24721775; http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.105
- Gustafson MP, Abraham RS, Lin Y, Wu W, Gastineau DA, Zent CS, Dietz AB. Association of an increased frequency of CD14+ HLA-DR lo/neg monocytes with decreased time to progression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). Br J Haematol 2012; 156:674-6; PMID:22050346; http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08902.x
- Jitschin R, Braun M, Buttner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, Eckart MJ, Krause SW, Oefner PJ, Le Blanc K 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; PMID:24850760; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-12-546416
- Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. Annu Rev Immunol 2012; 30:221-41; PMID:22224776; http://dx.doi.org/ 10.1146/annurev-immunol-020711-074934
- Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. 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; PMID:20079667; http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009
- 62. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD 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; PMID:20962324; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-07-294249
- Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. Immunity 2008; 28:639-50; PMID:18482568; http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni. 2008.03.017
- 64. Qian L, Qian C, Chen Y, Bai Y, Bao Y, Lu L, Cao X. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcgammaIIbhi regulatory B cells through IFN-beta and CD40L. Blood 2012; 120:581-91; PMID:22692512; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-08-377242
- 65. Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. J Immunol 2009; 182:3492-502; PMID:19265127; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803052
- 66. Saulep-Easton D, Vincent FB, Quah PS, Wei A, Ting SB, Croce CM, Tam C, Mackay F. The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. Leukemia 2015; PMID:26139429; http://dx.doi.org/10.138/leu.2015
- Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. Biomed Res Int 2014; 2014:435983; PMID:24967369; http://dx.doi.org/10.1155/ 2014/435983
- Karmali R, Paganessi LA, Frank RR, Jagan S, Larson ML, Venugopal P, Gregory SA, Christopherson KW, 2nd. Aggressive disease defined by cytogenetics is associated with cytokine dysregulation in CLL/SLL patients. J Leukoc Biol 2013; 93:161-70; PMID:23136257; http://dx. doi.org/10.1189/jlb.0612301
- Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Durig J, Morabito F, Duhrsen U, Malavasi F. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Blood 2003; 102:2146-55; PMID:12763926; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-03-0989

- Vaisitti T, Aydin S, Rossi D, Cottino F, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, Horenstein AL, Brennan P, Pepper C et al. CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia 2010; 24:958-69; PMID:20220774; http://dx. doi.org/10.1038/leu.2010.36
- Vaisitti T, Audrito V, Serra S, Buonincontri R, Sociali G, Mannino E, Pagnani A, Zucchetto A, Tissino E, Vitale C et al. The enzymatic activities of CD38 enhance CLL growth and trafficking: implications for therapeutic targeting. Leukemia 2015; 29:356-68; PMID:24990614; http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.207
- Zupo S, Isnardi L, Megna M, Massara R, Malavasi F, Dono M, Cosulich E, Ferrarini M. CD38 expression distinguishes two groups of Bcell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. Blood 1996; 88:1365-74; PMID:8695855
- Jahrsdorfer B, Blackwell SE, Wooldridge JE, Huang J, Andreski MW, Jacobus LS, Taylor CM, Weiner GJ. B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. Blood 2006; 108:2712-9; PMID:16809616; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-03-014001
- Hagn M, Blackwell SE, Beyer T, Ebel V, Fabricius D, Lindner S, Stilgenbauer S, Simmet T, Tam C, Neeson P 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; PMID:24497611; http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxu001
- Wlasiuk P, Tomczak W, Zajac M, Dmoszynska A, Giannopoulos K. Total expression of HLA-G and TLR-9 in chronic lymphocytic leukemia patients. Hum Immunol 2013; 74:1592-7; PMID:23994589; http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.08.277
- Lim SH, Vaughan AT, Ashton-Key M, Williams EL, Dixon SV, Chan HT, Beers SA, French RR, Cox KL, Davies AJ et al. Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. Blood 2011; 118:2530-40; PMID:21768293; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-01-330357
- 77. Ferrer G, Bosch R, Hodgson K, Tejero R, Roue G, Colomer D, Montserrat E, Moreno C. B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL. Br J Haematol 2014; 164:570-8; PMID:24245956; http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12645
- McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a fourdose treatment program. J Clin Oncol 1998; 16:2825-33; PMID:9704735
- Huh YO, Keating MJ, Saffer HL, Jilani I, Lerner S, Albitar M. Higher levels of surface CD20 expression on circulating lymphocytes compared with bone marrow and lymph nodes in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Am J Clin Pathol 2001; 116:437-43; PMID:11554173; http://dx.doi.org/10.1309/438N-E0FH-A5PR-XCAC
- Shaha SP, Tomic J, Shi Y, Pham T, Mero P, White D, He L, Baryza JL, Wender PA, Booth JW et al. Prolonging microtubule dysruption enhances the immunogenicity of chronic lymphocytic leukaemia cells. Clin Exp Immunol 2009; 158:186-98; PMID:19737143; http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04003.x
- Hosing C, Kebriaei P, Wierda W, Jena B, Cooper LJ, Shpall E. CARs in chronic lymphocytic leukemia – ready to drive. Curr Hematol Malig Rep 2013; 8:60-70; PMID:23225251; http://dx.doi.org/10.1007/ s11899-012-0145-y
- Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, Smith DD, Forman SJ, Jensen MC, Cooper LJ. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. Cancer Res 2006; 66:10995-1004; PMID:17108138; http://dx.doi. org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0160
- Benoit NE, Wade WF. Increased inhibition of proliferation of human B cell lymphomas following ligation of CD40, and either CD19, CD20, CD95 or surface immunoglobulin. Immunopharmacology

1996; 35:129-39; PMID:8956976; http://dx.doi.org/10.1016/S0162-3109(96)00138-5

- Byrd JC, Kipps TJ, Flinn IW, Cooper M, Odenike O, Bendiske J, Rediske J, Bilic S, Dey J, Baeck J et al. Phase I study of the anti-CD40 humanized monoclonal antibody lucatumumab (HCD122) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma 2012; 53:2136-42; PMID:22475052; http://dx.doi.org/10.3109/ 10428194.2012.681655
- Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. Blood 2000; 96:2917-24; PMID:11049967
- Kato K, Cantwell MJ, Sharma S, Kipps TJ. Gene transfer of CD40ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. J Clin Invest 1998; 101:1133-41; PMID:9486984; http://dx.doi.org/10.1172/JCI1472
- Pallasch CP, Ulbrich S, Brinker R, Hallek M, Uger RA, Wendtner CM. Disruption of T cell suppression in chronic lymphocytic leukemia by CD200 blockade. Leuk Res 2009; 33:460-4; PMID:18838168; http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2008.08.021
- Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I. Augmented induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R. Transplantation 2005; 79:488-91; PMID:15729177; http://dx.doi.org/ 10.1097/01.TP.0000152118.51622.F9
- McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, Maruyama T, Potter KN, Mockridge CI, Ravey EP, Qin F, Bowdish KS. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:1041-6; PMID:16418292; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510081103
- Laprevotte E, Voisin G, Ysebaert L, Klein C, Daugrois C, Laurent G, Fournie JJ, Quillet-Mary A. Recombinant human IL-15 trans-presentation by B leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia induces autologous NK cell proliferation leading to improved anti-CD20 immunotherapy. J Immunol 2013; 191:3634-40; PMID:23997218; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1300187
- Moga E, Alvarez E, Canto E, Vidal S, Rodriguez-Sanchez JL, Sierra J, Briones J. NK cells stimulated with IL-15 or CpG ODN enhance rituximab-dependent cellular cytotoxicity against B-cell lymphoma. Exp Hematol 2008; 36:69-77; PMID:17959301; http://dx.doi.org/ 10.1016/j.exphem.2007.08.012
- Moga E, Canto E, Vidal S, Juarez C, Sierra J, Briones J. Interleukin-15 enhances rituximab-dependent cytotoxicity against chronic lymphocytic leukemia cells and overcomes transforming growth factor betamediated immunosuppression. Exp Hematol 2011; 39:1064-71; PMID:21864486; http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem. 2011.08.006
- Wild J, Schmiedel BJ, Maurer A, Raab S, Prokop L, Stevanovic S, Dorfel D, Schneider P, Salih HR. Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis. Leukemia 2015; 29:1676-83; PMID:25710310; http://dx.doi.org/ 10.1038/leu.2015.50
- Junevik K, Werlenius O, Fogelstrand L, Karlsson-Parra A, Andersson PO. High functional CD70 expression on alpha-type 1-polarized dendritic cells from patients with chronic lymphocytic leukaemia. Scand J Immunol 2014; 79:415-22; PMID:24684541; http://dx.doi. org/10.1111/sji.12172
- Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. Immune reconstitution in chronic lymphocytic leukemia. Curr Hematol Malig Rep 2012; 7:13-20; PMID:22231031; http://dx.doi.org/10.1007/s11899-011-0106-x
- 96. Golay J, D'Amico A, Borleri G, Bonzi M, Valgardsdottir R, Alzani R, Cribioli S, Albanese C, Pesenti E, Finazzi MC et al. A novel method using blinatumomab for efficient, clinical-grade expansion of polyclonal T cells for adoptive immunotherapy. J Immunol 2014; 193:4739-47; PMID:25267972; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol. 1401550
- D'Arena G, Simeon V, De Martino L, Statuto T, D'Auria F, Volpe S, Deaglio S, Maidecchi A, Mattoli L, Mercati V et al. Regulatory T-cell modulation by green tea in chronic lymphocytic leukemia. Int J Immunopathol Pharmacol 2013; 26:117-25; PMID:23527714

- Skorka K, Bhattacharya N, Wlasiuk P, Kowal M, Mertens D, Dmoszynska A, Giannopoulos K. Thalidomide regulation of NF-kappaB proteins limits Tregs activity in chronic lymphocytic leukemia. Adv Clin Exp Med 2014; 23:25-32; PMID:24596000; http://dx.doi.org/ 10.17219/acem/37018
- Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. J Immunol 1999; 163:5211-8; PMID:10553041
- 100. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, Suri KB, Levy C, Allen T, Mavroukakis S et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. J Immunother 2007; 30:825-30; PMID:18049334; http://dx.doi.org/10.1097/CJI.0b013e318156e47e
- 101. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-

cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica 2008; 93:193-200; PMID:18223287; http://dx.doi.org/10.3324/haematol.11702

- 102. Nunes C, Wong R, Mason M, Fegan C, Man S, Pepper C. Expansion of a CD8(+)PD-1(+) replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression. Clin Cancer Res 2012; 18:678-87; PMID:22190592; http:// dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2630
- Anand M, Chodda SK, Parikh PM, Nadkarni JS. Dysregulated cytokine production by monocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. Cancer Biother Radiopharm 1998; 13:43-8; PMID:10850341; http://dx.doi.org/10.1089/cbr.1998.13.43
- 104. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J Immunol 2007; 178:7868-78; PMID:17548625; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol. 178.12.7868

e1132977-10 🛞 A. MOHR ET AL.

ANNEXE 2

Les lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique, des lymphocytes B régulateurs qui s'ignorent ?

Audrey Mohr, Yves Renaudineau, Jacques-Olivier Pers, Jamin Christophe, Anne Bordron

Hématologie, Janvier-Février 2016, Vol.22, No.1, pp 22-28

Les lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique, des lymphocytes B régulateurs qui s'ignorent ?

B lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia, regulatory B lymphocytes which ignore?

Audrey Mohr, Yves Renaudineau, Jacques-Olivier Pers, Christophe Jamin, Anne Bordron

EA2216, Inserm ESPRI, ERI29, université de Brest ; Réseau épigénétique du cancéropôle Grand Ouest LabEx Immunothérapie Grand Ouest (IGO), Brest, France

<anne.bordron@univ-brest.fr>



Résumé

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) constitue la leucémie la plus répandue dans les pays occidentaux. Cette maladie est caractérisée par une accumulation progressive de cellules B matures dans la moelle osseuse, le sang et les organes lymphoïdes. Corrélés avec la lymphoprolifération, un risque accru d'infections et une incidence élevée de cancers solides sont mis en évidence, ainsi qu'un déficit de l'immunité acquise, devenue inefficace pour contrôler le développement des cellules B tumorales. Les cellules B de LLC jouent un rôle complexe avec les différents acteurs de la réponse immunitaire, et les signaux moléculaires impliqués sont extrêmement hétérogènes et encore mal connus. Un de ces rôles pourrait être lié à l'homologie observée entre les cellules B de LLC et les lymphocytes B régulateurs (LB regs). En effet, les cellules B de LLC partagent des caractéristiques phénotypiques (CD5, CD1d, CD21, CD23, CD24, CD38) et des caractéristiques fonctionnelles (production de l'interleukine 10) communes avec les LB regs. Toutefois, l'identification et le rôle des fonctions des LB en tant que LB regs dans le développement de la LLC ne sont pas connus. L'objectif de cette revue est de caractériser les cellules B de LLC, de mettre en évidence leurs dysfonctionnements immunitaires, et d'évaluer leur rôle potentiel comme LB regs.

Mots clés : lymphocytes B, leucémie lymphoïde chronique, cellule B régulatrice

Abstract

Chronic lympocytic leukaemia (CLL) constitutes the most frequent leukaemia in Western countries. CLL is characterized by a progressive accumulation of mature B cell in bone marrow, blood and lymphoid organs. Along with the lymphoproliferation come an increased risk of infections and an elevated incidence of solid cancers, as well as a deficit of the adaptative immunity that in turn became ineffective to control tumoral B cell development. CLL B cells play complex roles with the different actors of the immune responses, and the related molecular signals are extremely heterogeneous and still badly known. One these roles could be related to the observed homology between CLL B cells and regulatory B cells (B regs). Indeed, CLL B cells shared phenotypic (CD5, CD1d, CD21, CD23, CD24, and CD38) and functional characteristics (production of interleukine 10) with the B reg subset. However, the identification and the role of regulatory B CLL functions during the development of CLL are not known. Accordingly, this review will characterize CLL B cells, highlight their immune dysfunctions and their potential role as B regs.

Key words: B cells, chronic lympocytic leukaemia, regulatory B cells

Pour citer cet article : Mohr A, Renaudineau Y, Pers JO, Jamin C, Bordron A. Les lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique, des lymphocytes B régulateurs qui s'ignorent ? *Hématologie* 2016 ; 22 : 22-28. doi : 10.1684/hma.2016.1083 doi: 10.1684/hma.2016.1083

Hématologie

Tirés à part : A. Bordron

Hématologie vol. 22 n° 1, janvier-février 2016

© John Libbey Eurotext, 2016

a leucémie lymphoïde chronique (LLC), la plus fréquente des leucémies en Europe et aux États-Unis, s'accompagne d'une lymphoprolifération de lymphocytes B (LB) monoclonaux que l'on retrouve dans la moelle osseuse, le sang et les organes lymphoïdes. La LLC se caractérise par une lymphoprolifération B (> 5 × 10⁹ cellules/L de sang) et par un phénotype particulier des LB [1]. En effet, à la surface des LB de LLC, une forte expression des molécules CD5, CD19 et CD23 est retrouvée alors que les molécules CD20, CD79b et les immunoglobulines de surface y sont plus faiblement exprimées qu'à la surface des LB normaux. Chaque clone de LB de LLC exprime la même chaîne légère kappa (κ) ou lambda (λ) des immunoglobulines (Ig).

L'une des caractéristiques de la LLC est liée à son hétérogénéité clinique. En effet, cette maladie peut rester indolente pendant des années puis devenir subitement agressive, ou au contraire être d'emblée agressive et entraîner le décès des patients en deux ou trois ans. Afin de rendre compte de cette hétérogénéité clinique, de nombreux marqueurs clinicobiologiques à visée pronostique ont été proposés, ceci afin d'évaluer la survie des patients. Ainsi, à titre d'exemple, des corrélations ont été établies entre la survie des patients et l'âge (> 60 ans), le sexe, le statut mutationnel des chaînes lourdes des parties variables des immunoglobulines (IgVH), les anomalies cytogénétiques des cellules (délétions 13g14, 11g/ATM et 17p13/TP53), ainsi que l'expression de différents marqueurs tels que les récepteurs CD1d, CD5, CD27, CD38 et HLA-G [2]. Ces différents critères permettent de définir des patients ayant un bon pronostic (exemple IgVH muté, délétion 13g14 isolée, ou une absence d'expression de CD38) et des patients présentant une maladie agressive (IgVH non muté, délétion 17p13/TP53 ou une expression de CD38).

Une autre caractéristique des LB de LLC concerne l'effet de ces cellules tumorales sur le système immunitaire. Tout d'abord, l'immunité humorale est touchée, puisqu'une hypoglobulinémie portant sur toutes les sous-classes d'anticorps est observée chez 85 % des patients, et est associée avec des anomalies du système du complément [3]. Ce défaut permet d'expliquer, en partie, l'augmentation des infections bactériennes et en particulier des infections opportunistes au cours de la LLC, ainsi que l'augmentation du risque de cancers solides par rapport au reste de la population [4]. Toutefois, les infections et les tumeurs solides peuvent également apparaître au cours d'une LLC, même chez les patients immunocompétents et en abstention thérapeutique, ce qui suggère un effet du clone tumoral sur l'immunité cellulaire. Cette hypothèse est d'autant plus crédible que d'importantes anomalies qualitatives ou quantitatives portant sur différentes cellules du système immunitaire ont été mises en évidence, comme le défaut fonctionnel des lymphocytes T (LT). En conséquence, il est légitime de se demander si les LB de LLC sont capables de moduler l'activité des cellules du système immunitaire, à l'instar des LB régulateurs (LB regs) avec lesquels les LB de LLC partagent de nombreuses similitudes. En effet, les LB regs sont des cellules capables d'agir sur l'inhibition de la prolifération des LT [5] et de générer la production de LT appelés régulateurs (LT regs). Plusieurs équipes indiquent que les LB de LLC produisent de l'interleukine 10 (IL-10), comme observé chez les LB regs, encore appelés B10 [6].

Aussi, une meilleure connaissance du rôle des LB de LLC sur les cellules du système immunitaire pourrait orienter la prise en charge thérapeutique et prophylactique de cette pathologie incurable. L'objectif de cette revue est de faire un état des lieux des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des différentes cellules du système immunitaire dans la LLC, ceci afin de comprendre l'implication des LB malins dans les réponses immunosuppressives observées, la progression de maladie et de permettre le développement de nouveaux traitements.

Perturbation du système immunitaire cellulaire

Immunité innée

Granulocytes neutrophiles

Fantassins du système immunitaire et issus de la lignée myéloïde, les granulocytes neutrophiles ne présentent pas de défaut quantitatif, excepté en phase terminale de la maladie, mais ce sont leurs fonctions et leurs capacités antibactériennes qui sont déficientes dans la LLC. En effet, il a été montré que l'activité antibactérienne des granulocytes neutrophiles se trouvait diminuée du fait de leur migration aléatoire en raison d'une absence de réponse aux signaux chimiotactiques transmis par le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) et par la fraction C5a du complément [7] (figure 1).

Monocytes, moMDSC

Les cellules immunitaires innées comportent également les monocytes d'origine myéloïde, pour lesquels on note des anomalies qualitatives (et non quantitatives) qui portent sur la production des cytokines et sur leur capacité de présentation antigénique, ayant pour conséquence d'accélérer la progression de la maladie. Par ailleurs, au niveau de la tumeur et en particulier dans les ganglions lymphoïdes, il existe des monocytes particuliers, les moMDSC (pour *monocytes myeloid-derived suppressor tumor cells*). Dans la LLC, ces moMDSC sont caractérisés par un taux faible de molécules HLA-DR générant un défaut d'activation des lymphocytes, une production



Figure 1. Influence négative des lymphocytes B de LLC sur le système immunitaire inné. CPA : cellule présentatrice de l'antigène, LB de LLC : lymphocyte B de leucémie lymphoïde chronique, LT reg : lymphocyte T régulateur, moMDSC : monocyte myeloid-derivated suppressor cell, NK : natural killer, iNKT : invariant natural killer T, NKT-like cell : NKT like cell, T reg : regulatory T cell.

importante d'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO), molécule responsable de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes, ayant également un effet positif sur la promotion des LT regs [8] (*figure 1*).

· Cellules natural killer

Les cellules *natural killer* (NK) de lignage lymphoïde sont capables d'avoir une activité antitumorale. Toutefois, cet effet est limité sur les LB de LLC puisque ces derniers expriment la molécule tolérogénique HLA-G (*human leucocyte antigen-G*) [9], capable d'inhiber la fonction tueuse des cellules NK via l'activation du récepteur inhibiteur KIR (*NK inhibitory receptor*) (*figure 1*). Il est à noter que les cellules NK agissent également par ADCC (*antibody dependent cell cytotoxicity*) et que cette action nécessite un ratio cellule effectrice/cellule cible voisin de 1. Cependant, du fait de la lymphoprolifération B au cours de la LLC, ce ratio est relativement bas. Il est donc raisonnable de supposer que ce déséquilibre contribue à l'inefficacité des cellules NK et que cet effet perdure lors des traitements par anticorps monoclonaux anti-LB.

Cellules NKT

Les cellules NKT sont des cellules qui partagent des caractéristiques avec les cellules NK et les LT. Elles peuvent être divisées en trois sous-groupes, en se basant sur le TCR (*T cell receptor*), la réactivité à un antigène particulier le glycolipide α -galactosylcermaide (α GalCer) présenté par la molécule CD1d. Le premier sous-groupe est constitué par les cellules NKT invariables (iNKT), capables de reconnaître

vol. 22 n° 1, janvier-février 2016

© John Libbey Eurotext, 2016

Hematologie

la molécule αGalCer présentée par la molécule CD1d. Dans le second sous-groupe, les cellules NKT de type II sont également capables de reconnaître la molécule αGalCer présentée par CD1d mais ces cellules expriment une chaîne α du TCR plus variable que celle observée dans les iNKT. Une fois stimulées, ces deux types de cellules NKT produisent des cytokines TH1 (T helper 1) - interféron gamma (IFNy) – et TH2 (IL-4). Enfin, dans le troisième sousaroupe, les cellules NKT de type III sont des cellules appelées NKT-like cells dont le fonctionnement est indépendant du CD1d et qui expriment des TCR semiinvariants. Dans la LLC, il existe un défaut quantitatif des cellules iNKT dont le taux est inversement proportionnel au pourcentage de LB. D'après Fais et al., la réduction du nombre des iNKT serait liée à l'augmentation de la mort de ces cellules du fait de la reconnaissance de l'antigène αGalCer exprimé par les LB de LLC porteurs de l'antigène CD1d [10]. De même, les cellules NKT-like sont déficientes au cours de la LLC [11] et il a été proposé que cette réduction serait associée à l'augmentation des LT regs. Une corrélation inverse est observée entre le nombre des cellules NKT-like et la progression de la maladie (figure 1).

Immunité acquise

Cellules dendritiques

À l'interface de l'immunité acquise et de l'immunité spécifique, les cellules dendritiques assurent la présentation antigénique aux lymphocytes T et sont considérées à ce titre comme les principales cellules présentatrices d'antigènes (CPA) impliquées dans la réponse immunitaire acquise antitumorale. Il existe deux grands types de cellules dendritiques avec d'un côté les cellules dendritiques conventionnelles migratoires issues d'un progéniteur myéloïde (mCD), et de l'autre côté, les cellules dendritiques plasmocytoïdes (pCD) issues de précurseurs lymphoïdes. Dans le cadre de la LLC, si les CD semblent avoir une capacité normale de présentation de l'antigène associée à une expression normale des molécules du CMH II, des molécules de costimulations, ainsi qu'une capacité sécréter des cytokines inflammatoires, une seconde étude a révélé une diminution en nombre et en efficacité des pCD entraînant la réduction de la production d'interféron alpha (IFNα), cytokine primordiale dans le développement de la reponse immunitaire [12] (figure 2).

Lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) sont augmentés au cours de la LLC et cette augmentation touche principalement les LT CD8 ce qui entraîne une réduction du ratio CD4/CD8 dans le sang. Cette augmentation serait bénéfique pour la survie du clone tumoral puisque les LB de LLC utilisent les cellules T mémoires (CD4 et CD8) pour leur propre développement, avec pour conséquence une diminution de l'activité antitumorale des cellules T naïves [13]. Ainsi, il a été observé, entre autres, une incapacité des LT à former des synapses immunologiques avec les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), une inhibition des LT CD4 et CD8 avec des anomalies dans la différenciation cellulaire, des défauts dans la formation du cytosquelette et dans le trafic vésiculaire ainsi que des défauts fonctionnels de cytotoxicité cellulaire avec absence de granules contenant du granzyme et une dégranulation non polarisée [14].

TH17

Les TH17, un autre type cellulaire aidant à la réponse immunitaire, sont raréfiés dans la LLC, et ce déficit serait en lien avec l'augmentation de la sévérité de la maladie [15] (*figure 2*). De plus, il existe un nombre plus important de LT regs circulants (CD4 ou CD8) chez les patients atteints de LLC [16]. Ces cellules sont capables d'induire une inhibition des TH17 et une répression transcriptionnelle du TCR générant une expression défectueuse des cytokines de type TH1.

TfH

Enfin, il est à noter qu'une autre population régulatrice, les TfH (*T follicular helper cell*), au lieu de permettre la différenciation des LB en cellules plasmocytaires dans les centres germinatifs, est utilisée par les LB de LLC pour promouvoir leur survie et leur prolifération [17] (*figure 2*).

Les lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique sont-ils des lymphocytes B régulateurs ?

Prérequis

Une des premières questions concernant les lymphocytes B de LLC concerne l'origine cellulaire du clone tumoral. Différentes hypothèses ont été formulées durant ces dernières années. L'une de ces hypothèses est basée sur l'observation que tous les LB de LLC expriment la molécule CD5, comme environ 15 % des LB normaux appelés B1. Ainsi, cette hypothèse suggère que la contrepartie normale des LB de LLC pourrait être les cellules B1 qui sont observées majoritairement au niveau de la zone du manteau du centre germinatif du ganglion lymphatique [1]. De façon notable, il est également important de signaler que les LB CD5⁺ produisent physiologiquement des quantités importantes d'IL-10, ce qui explique le fort potentiel régulateur de ces cellules [18]. Bref, l'expression d'IL-10 par les LB CD5⁺ de LLC renforce l'idée que les LB de LLC pourraient être des LB regs (tableau 1).



Figure 2. Influence négative des lymphocytes B de LLC sur le système immunitaire adaptatif. LB de LLC : lymphocyte B de leucémie lymphoïde chronique, LT reg : lymphocyte T régulateur, TH : lymphocyte T helper, LT reg : regulatory T cell, moMDSC : monocyte myeloid-derivated suppressor cell, TfH : follicular helper T cell.

Molécule	LB regs		Fonction	Clinique
CD5	Exprimée	Exprimée	Production d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire)	Mauvais pronostic si fortement exprimée
CD27	Exprimée	Exprimée mais pas sur les LB de tous les patients	Marqueur du phénotype mémoire du LB	Mauvais pronostic si non exprimée
CD1d	Exprimée	Exprimée	 Présentation antigénique de glycolipides Production d'IL-10 Diminution du nombre d'iNKT 	Mauvais pronostic si exprimée
CD38	Exprimée	Exprimée		Mauvais pronostic si expression $>$ 30 $\%$
HLA-G	Expression non connue	Exprimée	 Inhibition de l'activité des NK Apoptose des LT 	Nouveau marqueur de la maladie Importance clinique à approfond

LT : lymphocyte T ; NK : natural killer ; iNKT : invariant natural killer T

Les caractéristiques phénotypiques des LB de LLC varient en fonction de la localisation tissulaire des cellules. Ainsi, Mittal *et al.* ont démontré que les LB de LLC du ganglion lymphatique [19] surexprimaient des gènes associés à la tolérance immune (*CAV1*, *MCM3* et *BATF*), par rapport aux LB de la moelle osseuse et du sang. Cela met en évidence le rôle du microenvironnement dans le comportement cellulaire des LB de LLC. Dans ce registre, certains récepteurs et ligands de chémokines intervenant dans la migration sont surexprimés sur les LB de LLC du sang, de même que le sont également leurs ligands ou récepteurs dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques.

De plus, il est important de souligner qu'une plasticité cellulaire est observée vis-à-vis de l'acquisition de propriétés régulatrices ou activatrices des LB de LLC. En effet, comme les cellules primaires, les LB de LLC peuvent, en culture, maintenir leurs activités régulatrices si elles sont stimulées notamment par les agonistes du TLR-9 (pour *Toll like receptor*), tels que les CpG-ODN. Cet effet régulateur est dépendant de la production d'IL-10. À l'inverse, la capacité des LB de LLC à stimuler la prolifération des LT sera favorisée par l'activation du TLR7 [20].

Démonstration

Phénotype mémoire CD27⁺

Pour Iwata et al., les LB regs humains portent un phénotype relatif aux LB mémoires, c'est-à-dire CD24^{hi}CD27⁺ [21]. Cette donnée nous oblige à nous interroger sur la possibilité pour les LB de LLC et en particulier des LB de LLC CD27⁺ d'être des LB regs. En effet, les études phénotypiques des cellules de LLC ont permis de mettre en évidence différentes sous-populations cellulaires en termes de progression de la maladie ou d'anomalies cytogénétiques. Ainsi, par une approche épigénétique et transcriptomique, Kullis et al. ont confirmé l'existence de deux groupes principaux de LLC, avec, d'un côté, des LLC dont le clone tumoral dérive des cellules B CD5⁺ matures (IgVH non muté et CD27⁻), et, de l'autre, des LLC qui dérivent d'un clone tumoral issu du centre germinatif (IgVH muté et CD27⁺) [22]. L'effet régulateur des LB de LLC CD27⁺ par rapport aux LB de LLC CD27⁻ n'est pas connu (tableau 1).

• Expression du CD1d

Mizoguchi *et al.* ont mis en évidence, dans un modèle murin d'inflammation chronique de l'intestin, qu'un sous-groupe de LB exprimant le CD1d pouvait agir comme des LB regs producteurs d'IL-10, cytokine connue pour jouer un rôle important dans la suppression de la réponse inflammatoire [23]. Les LB de LLC expriment davantage de molécules CD1d à leurs surfaces que les LB normaux et il a été montré que le taux de CD1d des LB de LLC était corrélé avec le stade de la maladie [24]. En effet, plus le pronostic est défavorable, plus le niveau de CD1d est augmenté (*tableau 1*).

• Voie des TLR et rôle de MYD88

La production d'IL-10 est induite par la stimulation des ligands du TLR4 et/ou du TLR9. Cela implique la transmission d'un signal médiée par MYD88 (pour myeloid differentiation primary response protein) et, en aval, l'activation des facteurs de transcription NFkB (pour nuclear factor $\kappa B - \alpha$ kinase) et STAT3 (pour signal transducer and activator of transcription 3). Concernant MYD88, son implication dans la fonction régulatrice des LB de LLC est délicate à identifier. En effet, une mutation (la substitution missense L265P) a été caractérisée dans les LB de LLC de 3 % des patients [25]. Cette mutation peut intervenir dans l'activation du signal de transduction transmis par l'activation des TLR avec pour conséquence d'augmenter la survie cellulaire du clone tumoral comme rapporté dans la maladie de Waldenström, un autre type de cancer hématologique B.

• Expressions de CD38, CD20 et HLA-G

Une autre caractéristique commune aux LB de LLC et aux LB regs concerne l'expression du récepteur CD38 [26]. Lorsqu'il est exprimé par un grand nombre de LB de LLC (> 30 %), le marqueur CD38 est également corrélé avec l'activité de la maladie du fait de son implication dans la croissance tumorale, la survie ainsi que la circulation des LB de LLC issus des ganglions lymphatiques [27]. Ainsi, les LLC ayant un fort taux de CD38 sont catégorisées comme des LLC avec un pronostic défavorable.

Par ailleurs, les LB de LLC ont été identifiés comme étant des LB avec une expression faible de CD20 et capables de sécréter du granzyme B après une stimulation par CpG et IL-21 [28], caractéristiques retrouvées chez certains LB regs. Enfin, nous voulons souligner que la molécule HLA-G, dont l'expression par les LB regs n'a pas été établie à ce jour, exerce, outre ses fonctions sur les cellules NK (voir précédemment), des fonctions immunes régulatrices portant sur l'apoptose des LT ainsi que sur l'activité cytotoxique des LT CD8. Cette molécule a été récemment évoquée, en tant qu'elle pourrait constituer un nouveau marqueur de la maladie, probablement en lien avec l'immunomodulation observée dans la LLC [29] (*tableau 1*).

Conclusions et perspectives

Le phénotypage des LB de LLC apporte des informations précieuses pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et ainsi pouvoir proposer des traitements efficaces aux patients dont la maladie reste incurable. Les premiers traitements proposés reposaient sur la chimiothérapie, mais des patients réfractaires à ce type de traitement existent. Aussi, d'autres thérapies ont été mises en place, notamment en ciblant certains marqueurs de surface du LB plus ou moins spécifiques par des anticorps monoclonaux. Ainsi, le rituximab fut le premier anticorps chimérique anti-CD20 approuvé par la Food and Drug Administration pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens (LNH) et de la LLC. Les très bons résultats observés plus particulièrement chez les patients atteints de LNH ont entraîné la production d'autres anticorps anti-CD20. Dans la LLC, les résultats cliniques sont contrastés. En effet, il a été démontré que les anticorps thérapeutiques anti-CD20 étaient capables d'induire une sélection positive des clones tumoraux exprimant faiblement la molécule CD20. Ceci souligne le rôle central joué par le microenvironnement puisqu'il est rapporté que les LB du sang expriment plus de molécules CD20 à leurs surfaces que ceux de la moelle osseuse ou des ganglions lymphatiques. Cet exemple pose la question d'un ciblage des cellules tumorales ainsi que de l'importance d'une meilleure connaissance du fonctionnement des LB de LLC sur le système immunitaire. Cela devrait, à terme, permettre d'adapter les stratégies thérapeutiques basées notamment sur la diminution de la fonction régulatrice de ces LB.

Remerciements: Les auteurs remercient vivement Geneviève Michel et Simone Forest pour la dactylographie de cet article ainsi que Catherine Riou. Ce travail est soutenu par la Région Bretagne, la Ligue contre le cancer, et l'association Laurette Fugain.

Conflits d'intérêt : Aucun.

Références

1. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011; 117: 1781-91.

2. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, *et al.* Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 124: 49-62.

3. Middleton O, Cosimo E, Dobbin E, et al. Complement deficiencies limit CD20 monoclonal antibody treatment efficacy in CLL. *Leukemia* 2015; 29: 107-14.

4. Tsimberidou AM, Wen S, McLaughlin P, et al. Other malignancies in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. J Clin Oncol 2009 ; 27 : 904-10.

5. Jamin C, Morva A, Lemoine S, Daridon C, de Mendoza AR, Youinou P. Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2008 ; 58 : 1900-6.

6. Garaud S, Morva A, Lemoine S, *et al.* CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol* 2011 ; 186 : 4835-44.

7. Kontoyiannis DP, Georgiadou SP, Wierda WG, *et al.* Impaired bactericidal but not fungicidal activity of polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013 ; 54 : 1730-3.

8. Jitschin R, Braun M, Buttner M, *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.

9. Maki G, Hayes GM, Naji A, *et al.* NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia* 2008 ; 22 : 998-1006.

10. Fais F, Morabito F, Stelitano C, *et al.* CD1d is expressed on B-chronic lymphocytic leukemia cells and mediates alpha-galactosylceramide presentation to natural killer T lymphocytes. *Int J Cancer* 2004 ; 109 : 402-11.

11. Jadidi-Niaragh F, Jeddi-Tehrani M, Ansaripour B, Razavi SM, Sharifian RA, Shokri F. Reduced frequency of NKT-like cells in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol* 2012; **29**: 3561-9.

12. Saulep-Easton D, Vincent FB, Le Page M, *et al.* Cytokine-driven loss of plasmacytoid dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014 ; 28 : 2005-15.

13. Brusa D, Serra S, Coscia M, *et al.* The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013; 98: 953-63.

14. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, *et al.* T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013 ; 121 : 1612-21.

15. Hus I, Bojarska-Junak A, Chocholska S, *et al.* Th17/IL-17A might play a protective role in chronic lymphocytic leukemia immunity. *PLoS One* 2013; 8 : e78091.

16. Piper KP, Karanth M, McLarnon A, *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells. *Clin Exp Immunol* 2011; 166: 154-63.

17. Ahearne MJ, Willimott S, Pinon L, *et al.* Enhancement of CD154/IL4 proliferation by the T follicular helper (Tfh) cytokine, IL21 and increased numbers of circulating cells resembling Tfh cells in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **2013**; 162: 360-70.

18. 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 : 467-77.

19. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rai KJ, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells in a lymph node microenvironment depict molecular signature associated with an aggressive disease. *Mol Med* 2014 ; 20 : 290-301.

20. Tomic J, White D, Shi Y, et al. Sensitization of IL-2 signaling through TLR-7 enhances B lymphoma cell immunogenicity. J Immunol 2006 ; 176 : 3830-9.

21. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. Characterization of a rare IL-10competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood 2011 ; 117 : 530-41.

22. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queiros AC, Navarro A, Clot G, *et al.* Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2012 ; 44 : 1236-42.

23. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002; 16: 219-30.

24. Bojarska-Junak A, Hus I, Chocholska S, et al. CD1d expression is higher in chronic lymphocytic leukemia patients with unfavorable prognosis. *Leuk Res* 2014 ; 38 : 435-42.

25. Rossi D, Ciardullo C, Spina V, Gaidano G. Molecular bases of chronic lymphocytic leukemia in light of new treatments. *Immunol Lett* 2013 ; 155 : 51-5.

26. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, 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.

27. Audrito V, Serra S, Brusa D, *et al.* Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2015; 125: 111-23.

28. Jahrsdorfer B, Blackwell SE, Wooldridge JE, et al. B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood* 2006 ; 108 : 2712-9.

29. Attia MA, Nosair NA, Gawally A, Elnagar G, Elshafey EM. HLA-G expression as a prognostic indicator in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 2014 ; 132 : 53-8.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

4 Les patients et contrôles

Cinquante six patients atteints de LLC âgés entre 40 et 84 ans, ont été inclus dans cette étude. L'ensemble des patients était en abstention thérapeutique au moment de l'inclusion. Parallèlement, 29 volontaires sains ont été recrutés. Le sang périphérique de chaque individu a été obtenu par le service d'hématologie clinique après consentement et suite à l'établissement d'un protocole approuvé par le Comité de Protection des Personnes du CHRU de Brest sous la référence 2008-214.

5 La purification cellulaire

L'isolement des cellules mononuclées du sang (PBMC) est réalisé à partir des échantillons de sang. Le sang collecté est préalablement déplaquetté, puis dilué au demi dans du tampon phosphate salin (PBS) avant d'être déposé sur un gradient de Ficoll-Hypaque (Eurobio, Courtaboeuf, France). Après centrifugation, l'anneau cellulaire contenant les PBMC est récupéré, lavé dans du PBS puis les cellules sont comptabilisées sur cellule de Malassez en présence de bleu trypan (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA).

La purification des LT et des LB de témoins tout comme celle des LB de LLC est réalisée par la technique des rosettes qui consiste à incuber les PBMC en présence de globules rouges de mouton (GRM) (Thermo scientific, Hampshire, United Kingdom) prétraités à la neuraminidase (Sigma Aldrich). L'enzyme va permettre de découvrir les récepteurs LFA-3 à la surface des GRM, permettant ainsi les interactions avec le récepteur CD2 des LT. Pour ce faire, les GRM sont incubés 5 minutes dans une solution d'Alsevers (pour 1 litre d'H₂O: 20,5g Dextrose (114mM), 7,9g citrate de sodium (27mM), 4,2g NaCl (71mM), pH=6,1), puis lavés dans du PBS. De la neuraminidase est alors ajoutée à raison de 1U/ml de culot cellulaire. Après 1h d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées dans du PBS puis repris dans du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 complet (Sigma Aldrich) contenant 2mM de L-glutamine (Gibco life Technology, Paisley, Écosse), 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVFdec) (Sigma Aldrich), 200U/ml de streptomicine et 100µg/ml de pénicilline (Panpharma, Fougère, France). Les PBMC resuspendues à une concentration maximale de 1.10⁸ cellules / 10ml de SVFdec sont ajoutées à un volume identique de GRM prétraités. La suspension cellulaire est alors centrifugée et incubée pendant 1h minimum dans de la glace. Les LT vont former des complexes avec les GRM, permettant de les isoler de la

fraction LB/monocytes sur un gradient de Ficoll-Hypaque. Les deux fractions cellulaires sont récupérées et lavées dans du PBS. Afin d'éliminer les GRM, les différents culots cellulaires sont incubés dans une solution de lyse Ammonium/ Chloride/ Potassium (ACK) (pour 1 litre d'H₂O= 8,2g NH₄Cl (0,15M), 1g KHCO₃ (10mM), 37,2mg Na₂EDTA (0,1mM), pH=7,4) pendant 5 minutes sur glace, puis lavés dans du PBS. La pureté des cellules est alors évaluée par cytométrie en flux (Navios, Beckman Coulter, Villepinte, France) par un marquage avec un anticorps anti-CD14 conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), un anticorps anti-CD5 conjugué à la phycoérythrine - Texas red (ECD) et un anticorps anti-CD19 conjugué à l'allophycocyanine (APC) (Beckman Coulter, Marseille, France). La technique des rosettes permet d'obtenir une population lymphocytaire T pure à plus de 95%. Concernant les LB, un enrichissement supplémentaire est nécessaire afin d'éliminer les monocytes.

Cet enrichissement est effectué grâce à l'utilisation d'un kit pan-B cells, selon le protocole établi par le fabricant (Miltenyi Biotec, Paris, France). Les cellules sont incubées dans un cocktail d'anticorps couplés à la biotine ciblant l'ensemble des cellules non-B puis avec des anticorps anti-biotine fixés à des microbilles magnétiques. Les cellules non-B sont directement retenues sur une colonne MACS dans un champ magnétique. Cette déplétion permet d'obtenir une pureté de LB \geq 95%.

Les LT de LLC sont quant à eux isolés directement à partir de sang total par la technologie MACSxpress pan-T cells, d'après les recommandations du fournisseur (Miltenyi Biotec). Les érythrocytes sont éliminés par sédimentation. Les cellules non-T marquées par des anticorps monoclonaux couplés à des billes magnétiques sont retenues par aimantation. Les globules rouges résiduels sont ensuite éliminés par un tampon de lyse ACK. La pureté LT évaluée par cytométrie est > 95%.

6 La culture cellulaire

6.1 Analyse de la prolifération des LT

Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans des plaques 96 puits en milieu RPMI 1640 complet contenant 2mM de L-glutamine (Gibco life Technology), 10% de sérum humain AB décomplémenté (SHABdec) (Sigma Aldrich), 200U/ml de streptomicine et 100µg/ml de pénicilline (Panpharma). Des IgG F(ab')₂ anti-Ig de souris (Jackson Immunoresearch, Baltimore, USA) sont déposées préalablement dans chaque puits à la concentration de 10μ g/ml. Afin d'induire la prolifération des LT, 4.10^4 cellules sont stimulées par deux anticorps anti-CD3 (0.2μ g/ml, Clone OKT3, Biolegend, San Diego, USA) et anti-CD28 (0.2μ g/ml, Clone CD28.2, Beckman Coulter, Marseille, France). Les LT et LB sont cultivés à un ratio 1 : 1 pendant 4 jours. Les LB sont stimulés ou non avec du CpG-ODN 2006 (0.25μ M, Invivogen, Toulouse, France) afin d'induire leur fonction régulatrice. Pour suivre la prolifération par cytométrie en flux, les LT sont marqués avec un agent intercalant de l'ADN, le CellTrace Violet (CTV, ThermoFisher scientific, Waltham, USA) avant la mise en culture à raison de 1 μ l de marqueur pour 1.10⁶ cellules / ml. L'inhibition de la prolifération induite par les LB est évaluée par le logiciel FlowJo (FlowJo, Ashland, USA). Dans certaines expériences, un anticorps bloquant anti-CD40L (1 μ g/ml, R&D system, Minneapolis, USA) est ajouté à la co-culture afin de bloquer l'induction de la fonction régulatrice et d'évaluer le rôle de la signalisation CD40 dans ce processus.

Afin de tester l'impact de l'hyperlymphocytose B sur la fonction régulatrice, des cultures à ratio multiple sont également réalisées (ratio T/B= 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4). Le rôle du microenvironnement tumoral est quant à lui évalué en utilisant un milieu complet contenant du sérum autologue décomplémenté.

6.2 Analyse de l'activation des LB

Les LB de LLC sont cultivés dans des plaques de 48 puits pendant 48h à raison de 5.10^5 cellules / puits avec ou sans anticorps anti-CD40 activateur (2µg/ml, Beckman Coulter) ou CpG-ODN 2006 (0,25µM). L'activation des LB est caractérisée par l'induction de l'expression des marqueurs de surface CD86, CD69 et CD25 par cytométrie en flux.

7 La cytométrie en flux

L'expression des marqueurs de surface des LB est réalisée directement à partir des PBMC isolées, par cytométrie en flux. 5.10⁵ cellules sont marquées avec des anticorps couplés à différents fluorochromes (Tableau 6.). Les cellules sont incubées 30 min à 4°C avec les anticorps en condition saturante, puis lavées dans du PBS avant d'être analysées. La caractérisation des protéines intra-cytoplasmiques nécessite une étape préalable de perméabilisation à l'aide du kit Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization (BD Biosciences). Le phénotypage des LT est réalisé sur sang total. 50µl de sang sont marqués avec les anticorps pendant 10 min puis incubés dans un tampon Versalyse (Beckman Coulter)

pendant 15 min, afin d'éliminer les globules rouges. Avant lecture, les cellules sont lavées dans du PBS. L'intensité moyenne de fluorescence est évaluée et les résultats analysés avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

Pour l'analyse de la prolifération des LT, après 4 jours de culture, les cellules sont récupérées, lavées dans du PBS puis incubées en présence d'un anticorps anti-CD19 couplé à la phycoérythrine-cyanine 7 (PC7) et un marqueur de mort cellulaire, le DRAQ7 DNA staining dye (DRAQ7 Biostatus, Beckman Coulter). L'analyse est réalisée sur les cellules CD19⁻ DRAQ7⁻. L'index de prolifération des LT dans chaque condition de culture est déterminé grâce au logiciel FlowJ0. Le pourcentage d'inhibition de la prolifération est ensuite calculé selon la formule: ((Index T seuls – Index T+B)/Index T seuls) x100.

Cibles	Fluorochrome	Spécificité	Hôte	Isotype	Fournisseurs	Clones
CD57	FITC	Human	Mouse	IgM	BC	NC1
TCR Pan y/δ	FITC	Human	Mouse	IgG1	BC	IMMU510
TLR9	FITC	Human	Mouse	IgG1	Imgenex	26C593.2
CD268 (BR3)	FITC	Human	Mouse	IgG1	Biolegend	11c1
IgD	FITC	Human	Mouse	IgG2a	BC	IA6-2
CD80	FITC	Human	Mouse	Iga2a IgG1	BC	MAR104
Isotype IgC1	FITC	N/A	Mouse	IgC1	BC	679 1Mc7
Isotype Igu I	IIIC	N/A	Mouse	igui	DC	079.11007
IgG2a	FITC	N/A	Mouse	IgG2a	BC	7T4-1F5
CD14	FITC	Human	Mouse	IgG2a	BC	RM052
CD25	FITC	Human	Mouse	IgG1	BD	2A3
CD45RA	PE	Human	Mouse	IgG1	BC	ALB11
TCR pan α/β	PE	Human	Mouse	IgG1	BC	IP26A
IL-21R	PE	Human	Mouse	IgG1	BD	17A12
IgM	PE	Human	Mouse	IgG1	BC	SA-DA4
CD267				0		
(TACI)	PE	Human	Mouse	IgG2a	Biolegend	1A1
Isotype IgG2a	PE	N/A	Mouse	IgG2a	BC	7T4-1F5
Isotype IgG1	PE	N/A	Mouse	IgG1	BC	6791Mc7
CD69	PE	Human	Mouse	IgG2b	BC	TP1.55.3
CD5	ECD	Human	Mouse	IgG2a	BC	19
Isotype IgG2a	ECD	N/A	Mouse	IgG2a	BC	7T4-1F5
CD27	PC5.5	Human	Mouse	IgG1	BC	1A4CD27
CD25	PC5.5	Human	Mouse	IgG2a	BC	B1.499
CD79b	PC5.5	Human	Mouse	IgG1	BC	CB3-1
CD5	PC5.5	Human	Mouse	IgG1	BC	BL1a
Isotype IgG1	PC5.5	N/A	Mouse	IgG1	BC	679.1MC7
CD62L	PC7	Human	Mouse	IgG1	BC	DREG56
CD127	PC7	Human	Mouse	IgG1	BC	R34.34
CD23	PC7	Human	Mouse	IgG1	BC	9P25
CD38	PC7	Human	Mouse	IgG1	BC	LS198-4-3
CD86	PC7	Human	Mouse	IgG2h	BC	HA5-2B7
Isotype IgG1	PC7	N/A	Mouse	IgG1	BC	679.1MC7
CD4	PC7	Human	Mouse	IgG1	BC	SEC112T4D1
CD19	PC7	Human	Mouse	IgG1	BC	I4 119
CD28	PF vio770	Human	Mouse	IgG1	Miltenvi	15 F8
CD38	APC	Human	Mouse	IgG1	BC	LS198-4-3
CD69	APC	Human	Mouse	IgG2b	BC	TP1.55.3
CD40	APC	Human	Mouse	IgG1	BC	MAB89
CD24	APC	Human	Mouse	IgG1	BC	ALB9
ICOSL (CD275)	APC	Human	Mouse	IgG2b	Biolegend	2D3
IL-21R	APC	Human	Mouse	IgG1	BD	17A12
Isotype IgG1	APC	N/A	Mouse	IgG1	BC	679.1MC7
CD19	APC	Human	Mouse	IgG1	BC	J4.119
CD19	AF700	Human	Mouse	IgG1	BC	J3-119
Isotype IgG1	af700	N/A	Mouse	IgG1	BC	679.1MC7
CD3	AF750	Human	Mouse	IgG1	BC	UCHT1
CD5	AF750	Human	Mouse	IgG2a	BC	BL1a
Isotype IgG1	AF750	N/A	Mouse	IgG1	BC	679.1mc7
CD4	PB	Human	Mouse	IgG1	BC	13B8.2

Tableau 6.Liste des anticorps utilisés pour le phénotypage des lymphocytes B et T.

FITC: Isothiocyanate de fluorescéine, PE: phycoérythrine, ECD: phycoérythrine texas red, PC5: phycoérythrine - cyanine 5, PC5.5: péridinine chlorophylle protéine – cyanine 5, PC7: phycoérythrine - cyanine 7, APC: allophycocyanine, AF700: alexa fluor 700, AF750: alexa fluor 750, PB: pacific blue, KO: krome orange, BD: BD Bioscience, BC: Beckman coulter, N/A: non applicable.

8 Le dosage des cytokines par Elisa

Le dosage des cytokines est réalisé par ELISA dans le surnageant des co-cultures, selon les recommandations des fabricants (Tableau 7.).

Cytokines	Dilutions des surnageants de culture	Kits et fabricants
IL-10	1/10	OptEIA [™] Human IL-10 (BD Biosciences)
TGF-β	1/2	Human TGF-beta 1 Quantikine (R&D system)
TNF-α	1/50	OptEIA [™] Human TNF (BD Biosciences)
IFN-γ	1/400	OptEIA [™] Human IFN-γ (BD Biosciences)

Tableau 7.Liste des cytokines dosées par ELISA

9 L'analyse quantitative par RT-PCR

9.1 L'extraction de l'ARN total

Après 3 jours de co-culture, les LB stimulés par CpG-ODN 2006 sont triés grâce à une sélection positive à l'aide d'un kit CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec). Pour ce faire, les cellules sont récupérées, lavées dans du PBS puis incubées directement avec des anticorps monoclonaux anti-CD19 couplés à des microbilles magnétiques pendant 15 min. Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS, puis resuspendues dans un tampon spécifique et déposées sur colonne. Afin d'éliminer les LT, plusieurs lavages de la colonne sont effectués, les LB maintenus dans la colonne sont ensuite récupérés grâce au piston prévu à cet effet. Cette technique permet d'obtenir une pureté en LB \geq 98%. L'extraction de l'ARN total est alors effectué à l'aide du kit d'extraction RNeasy plus micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), d'après le protocole du fabricant. L'ARN est dosé avec le nanodrop (ThermoFisher Scientific).

9.2 La rétro-transcription

650ng d'ARN total est utilisé pour la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc). L'ARN est incubé avec 100ng de random primers (Promega, Madison, USA) et 10mM de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) (Invitrogen, Courtaboeuf, France) pendant 5 min à 65°C puis 1 min sur glace. Ensuite, 4μL de tampon de réaction (5x) (Invitrogen) et 0,1M de dithiothréitol (DTT) (Promega) sont ajoutés. Après 2 min d'incubation à température

Matériel et Méthodes

ambiante, 50U d'enzyme Superscript II (Invitrogen) sont ajoutés. La rétro-transcription est alors réalisée par thermocycleur (Applied Biosystems) avec une première incubation de 10 min à 25°C, puis 50 min à 42°C et enfin 15 min à 70°C afin d'inactiver l'enzyme. L'efficacité de la rétro-transcription est ensuite vérifiée grâce à une réaction en chaîne par polymérase (PCR) et l'amplification du gène de ménage GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). 1µl d'ADNc est incubé avec 5µl de tampon de réaction (5x), 0,25µl d'enzyme Taq polymérase (Invitrogen), 1,5µl de MgCL₂ (25mM), 0,5µl de dNTP (10mM), 1µl de chaque amorce (0,5 pmol) (GAPDH Sens: TGCCCTCAACGACCACTTT; GAPDH Reverse: GGTCCAGGGGTCTTACTCCTT) dans un volume final de 25µl. L'amplification est réalisée selon le programme suivant: une dénaturation pendant 5 min à 94°C, 35 cycles d'amplification à 94°C pendant 30s, 59°C pendant 1 min, 72°C pendant 1 min, puis une extension pendant 5 min à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 2%. Le poids moléculaire attendu est d'environ 37Kd.

9.3 La PCR quantitative

L'expression des gènes des voies TLR est évaluée par TaqMan array plate (Applied Biosystems, Foster City, USA). La plaque contient 96 gènes comprenant des gènes associés aux voies de signalisation TLR ainsi que des gènes de ménage (Tableau 8.).

Tableau 8.	Liste des gènes inclus dans la plaque TaqMan array 96 Human Toll-like
Receptors pa	nthway

	Housseking gene
18S-Hs99999901_s1	18S ribosomal RNA
GAPDH-Hs99999905_m1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1-Hs99999999_m1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

Target Name

Matériel et Méthodes

GUSB-Hs99999908_m1	Glucuronidase beta
ACTB-Hs99999903_m1	Actin, beta
B2M-Hs99999907_m1	Beta-2-microglobulin
RPLP0-Hs99999902_m1	Ribosomal protein lateral stalk subunit PO
	TLR Pathway
HMBS-Hs00609297_m1	Hydroxymethylbilane synthase
TBP-Hs99999910_m1	TATA-box binding protein
PGK1-Hs99999906_m1	Phosphoglycerate kinase 1
UBC-Hs00824723_m1	Ubiquitin C
PPIA-Hs99999904_m1	Peptidylprolyl isomerase A
TFRC-Hs99999911_m1	Transferrin receptor
YWHAZ-Hs00237047_m1	Tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta
ATF2-Hs00153179_m1	Activating transcription factor 2
ATF4-Hs00909568_g1	Activating transcription factor 4
BTK-Hs00163761_m1	Bruton tyrosine kinase

CD14-Hs02621496_s1	CD14 molecule
CHUK-Hs00175141_m1	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CREB1-Hs00231713_m1	cAMP responsive element binding protein 1
CREB3-Hs00197255_m1	cAMP responsive element binding protein 3
CREB3L4-Hs00370116_m1	cAMP responsive element binding protein 3-like 4
ECSIT-Hs00213167_m1	ECSIT signalling integrator
IKBKB-Hs00233287_m1	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon
IKBKE-Hs01063858_m1	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
IKBKG-Hs00415849_m1	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
IL1RL1-Hs00249384_m1	Interleukin 1 receptor like 1
IRAK1-Hs00155570_m1	Interleukin 1 receptor associated kinase 1
IRAK2-Hs00176394_m1	Interleukin 1 receptor associated kinase 2
IRAK3-Hs00200502_m1	Interleukin 1 receptor associated kinase 3
IRAK4-Hs00211610_m1	Interleukin 1 receptor associated kinase 4

IRF3-Hs01547282_m1	Interferon regulatory factor 3
IRF7-Hs00185375_m1	Interferon regulatory factor 7
IRF8-Hs01128710_m1	Interferon regulatory factor 8
JUN-Hs99999141_s1	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
LBP-Hs00188074_m1	Lipopolysaccharide binding protein
LY96-Hs00209771_m1	Lymphocyte antigen 96
MAP2K3-Hs00177127_m1	Mitogen-activated protein kinase kinase 3
MAP2K6-Hs00992389_m1	Mitogen-activated protein kinase kinase 6
MAP2K7-Hs00178198_m1	Mitogen-activated protein kinase kinase 7
MAP3K3-Hs00176747_m1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
MAP3K7-Hs00177373_m1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
MAP3K7IP1-Hs00196143_m1	TGF-beta activated kinase 2 (TAB2)/MAP3K7 binding protein 1
MAP3K7IP2-Hs00248373_m1	TGF-beta activated kinase 1 (TAB1)/MAP3K7 binding protein 2
MAPK10-Hs00373461_m1	Mitogen-activated protein kinase 10
MAPK11-Hs00177101_m1	Mitogen-activated protein kinase 11

MAPK12-Hs00268060_m1	Mitogen-activated protein kinase 12
MAPK13-Hs00234085_m1	Mitogen-activated protein kinase 13
MAPK14-Hs00176247_m1	Mitogen-activated protein kinase 14
MAPK8-Hs01548508_m1	Mitogen-activated protein kinase 8
MAPK9-Hs00177102_m1	Mitogen-activated protein kinase 9
MYD88-Hs00182082_m1	Myeloid differentiation primary response 88
NFKB1-Hs00765730_m1	Nuclear factor kappa B subunit 1
NFKB2-Hs00174517_m1	Nuclear factor kappa B subunit 2
NFKBIA-Hs00153283_m1	NFKB inhibitor alpha
NFKBIB-Hs00182115_m1	NFKB inhibitor beta
NFKBIE-Hs00234431_m1	NFKB inhibitor epsilon
PIK3C2A-Hs00153223_m1	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha
PIK3C2B-Hs00153248_m1	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta
PIK3C2G-Hs00362135_m1	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 gamma

PIK3C3-Hs00176908_m1	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3		
PIK3CA-Hs00180679_m1	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha		
PIK3CB-Hs00927728_m1	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta		
PIK3CD-Hs00192399_m1	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide		
PIK3R1-Hs00381459_m1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1		
PIK3R2-Hs00178181_m1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2		
PIK3R3-Hs00177524_m1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3		
PIK3R4-Hs00300795_m1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4		
PIK3R5-Hs00204803_m1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5		
RAC1-Hs01025984_m1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)		
REL-Hs00968436_m1	REL proto-oncogene, NF-kB subunit		
RELA-Hs00153294_m1	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit		
RELB-Hs00232399_m1	RELB proto-oncogene, NF-kB subunit		
RIPK1-Hs00169407_m1	Receptor interacting serine/threonine kinase 1		
RIPK2-Hs01572690_m1	Receptor interacting serine/threonine kinase 2		
----------------------	---	--	--
RIPK3-Hs00179132_m1	Receptor interacting serine/threonine kinase 3		
RNF216-Hs00219248_m1	Ring finger protein 216		
SIGIRR-Hs00222347_m1	Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain		
TANK-Hs00370305_m1	TRAF family member associated NFKB activator		
TBK1-Hs00179410_m1	TANK binding kinase 1		
TICAM1-Hs01090712_m1	Toll like receptor adaptor molecule 1		
TICAM2-Hs00899439_m1	Toll like receptor adaptor molecule 2		
TIRAP-Hs00364644_m1	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein		
TLR1-Hs00413978_m1	Toll like receptor 1		
TLR10-Hs01675179_m1	Toll like receptor 10		
TLR2-Hs01014511_m1	Toll like receptor 2		
TLR3-Hs00152933_m1	Toll like receptor 3		
TLR4-Hs00152939_m1	Toll like receptor 4		
TLR5-Hs00152825_m1	Toll like receptor 5		

TLR6-Hs00271977_s1	Toll like receptor 6		
TLR7-Hs00152971_m1	Toll like receptor 7		
TLR8-Hs00152972_m1	Toll like receptor 8		
TLR9-Hs00152973_m1	Toll like receptor 9		
TOLLIP-Hs01553188_m1	Toll interacting protein		
TRAF6-Hs00377558_m1	TNF receptor associated factor 6		
UBE2N-Hs00854751_s1	Ubiquitin conjugating enzyme E2 N		

Pour chaque groupe d'individus, un mélange de 3 ADNc dilués au 1/40^{ème} est réalisé, puis 5µl sont déposés sur la plaque en présence de 5µL de TaqMan Master Mix (Applied biosystems). L'amplification est réalisée dans un thermocycleur QuantStudio 6 Flex (Applied biosystems) selon un programme standard (2 min à 50°C, 10 min à 95°C, puis 40 cycles de 15s à 95°C, 1 min à 60°C). L'expression relative des gènes est normalisée sur la moyenne de l'ensemble des CTs (Cycle Threshold). Chaque groupe d'individus est comparé aux autres par la méthode des fold changes [249]. Les gènes présentant un CT supérieur à 35, reflétant une absence d'expression, sont écartés de l'analyse. La quantification des gènes TLR-9, MYD-88, IRAK-4, IRF-7, IRAK-1 est également réalisée sur des échantillons individuels d'ARN de LB isolés avant et après culture, selon les mêmes conditions citées précédemment.

10 Le statut mutationnel des gènes IGVH

Le statut des gènes codant le domaine IGVH est déterminé après amplification et séquençage de ces derniers selon les recommandations du consortium BIOMED-2 [250, 251]. L'ADN génomique (ADNg) des LB de LLC est isolé à partir du kit BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen). 100ng d'ADNg sont amplifiés en présence de 0,25µl d'enzyme Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystem), 10pmol de chaque amorce (Tableau 9.), 0,2mM de

Matériel et Méthodes

dNTP x, 1,5mM de MgCl₂ et 1x de tampon de reaction dans un volume final de 50µl. Une PCR multiplex est réalisée selon le programme suivant : une dénaturation à 95°C pendant 10 min; 34 cycles à 95°C pendant 45s, 60°C pendant 45s, 72°C pendant 90s et une extension à 72°C pendant 10 min. Les produits de PCR sont ensuite purifiés avec le Kit ExoSAP-IT PCR product cleanup KIT (Affymetrix, High Wycombe, United Kingdom) selon les recommandations du fabricant. Ils sont ensuite séquencés à l'aide du kit Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied biosystem). Les produits de séquençage sont purifiés par précipitation. Les produits sont incubés avec 16 µl d'H2O et 64 µl d'éthanol absolu pendant 15 min à température ambiante. Après 20 min de centrifugation à 9000 rpm, 250µl d'éthanol à 70% sont ajoutés sur le culot et une nouvelle centrifugation est réalisée. Les culots sont ensuite séchés et repris dans 20µl d'H2O. Les séquences obtenues sont vérifiés sur le logiciel sequencher puis les résultats sont analysés sur la base de données IMGT/HighV-Quest (The international ImMunoGeneTics information system, Montpellier) [252]. Un pourcentage d'homologie avec la séquence germinale supérieur à 98% permet de définir une séquence non-mutée.

IgVH	Primer sequences	
VH1 and VH7 Leader	ATGGACTGGACCTGGAGG	Sens
VH2 Leader	CAC(GA)CTCCTGCTGCTGACCA	sens
VH3a Leader	GCTGGGTTTTCCTTGTTGC	sens
VH3b Leader	ATGGAGTT(TG)GG(AG)CTGAGCTG	sens
VH4 Leader	GCTCCCAGATGGGGTCCTG	sens
VH5 Leader	CTCCTCCTGGCTGTTCTCC	sens
VH6 Leader	CTGTCTCCTTCCTCATCTTCC	sens
VH1/7-FR1	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG	sens
VH2-FR1	GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC	sens
VH3-FR1	CTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG	sens
VH4-FR1	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG	sens
VH5-FR1	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT	sens
VH6-FR1	TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG	sens
JH consensus-FR1	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	reverse

 Tableau 9.
 Amorces permettant l'amplification des gènes IGVH.

11 Les statistiques

Les résultats sont représentés graphiquement et analysés statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism. L'ensemble des résultats est exprimé en moyenne \pm SEM. Les tests statistiques de Mann-Whiney, de Wilcoxon ou le Chi-square ont été utilisés pour les analyses. La significativité des résultats est évalué avec une *P* value < 0,05.



12 Caractérisation de la fonction régulatrice des lymphocytes B de LLC

12.1 Spontanément les LB de LLC sont incapables de réguler la prolifération des LT

La première étape de ce projet a été de caractériser la fonction régulatrice spontanée des LB de témoins et de LLC par la mise en place d'un modèle de co-culture *in vitro*. Pour ce faire, des LB périphériques purifiés ont été incubés en présence de LT autologues activés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pendant 4 jours dans un milieu RPMI complet. Les LT ont été préalablement marqués avec un agent intercalant, le CTV, afin de suivre leur prolifération par cytométrie en flux. La fonction régulatrice des LB est alors évaluée par leur capacité à inhiber la prolifération des LT.

Nos résultats confirment l'acquisition d'un potentiel régulateur des LB de témoins, capables de contrôler la prolifération des LT autologues ($+2,7 \pm 1,3\%$). Cependant, contrairement à eux (P > 0,001), les LB de LLC sont dans l'incapacité de réguler spontanément la prolifération des LT autologues ($-5,5 \pm 1,4\%$) (Figure 10A et B). La présence des LB dans la co-culture semble même accentuer la prolifération des LT. De surcroît, l'augmentation du ratio de LB de LLC en co-culture ne permet pas d'observer significativement l'accroissement de leur potentiel régulateur (Figure 10C), suggérant ici que l'activité régulatrice des LB de LLC n'est pas dépendante de l'hyperlymphocytose caractéristique de ces patients (P > 0,05).



Figure 10. Spontanément les LB de LLC sont incapables de réguler la prolifération des LT.

Les LT et LB sont isolés à partir de sang périphérique de témoins sains et de patients atteints de LLC. Les LT ont été marqués avec un agent intercalant, le CellTrace Violet (CTV). La prolifération a été stimulée avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et évaluée à 4 jours de culture avec ou sans LB par cytométrie en flux. (A) Illustration représentative de la prolifération des LT de témoins ou de LLC en culture seuls ou co-culture avec des LB autologues ajoutés à un ratio 1 : 1. (B) Evaluation de l'activité régulatrice des LB de témoins (n=16) et de LLC (n=30). (C) Mesure de l'activité régulatrice des LB de LLC sur la prolifération des LT autologues en co-culture à différents ratio T : B pendant 4 jours. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ****P*< 0,001; ns: non significatif.

12.2 L'absence d'activité régulatrice des LB de LLC n'est pas due à un défaut de prolifération ou de sensibilité de réponse des LT de LLC

Nous avons voulu déterminer si les LT de LLC peuvent influencer l'absence d'activité régulatrice des LB de LLC ou si cette dernière résulte uniquement d'un défaut intrinsèque des LB.

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps caractérisé phénotypiquement les LT par cytométrie en flux (Figure 11). Nous avons ainsi pu établir des disparités entre les LT de témoins et de LLC. En effet, un plus faible pourcentage de cellules activées $CD4^+$ $CD38^+$ ($42,1 \pm 3,1\%$ vs $52,0 \pm 2,7\%$; P < 0,05) et $CD8^+$ $CD38^+$ ($17,5 \pm 2,0\%$ vs $24,3 \pm 2,3\%$; P < 0,05) est retrouvé parmi les LT de LLC. Tandis que la proportion de LT $CD8^+$ cytotoxiques ($49,0 \pm 2,9\%$ vs $29,1 \pm 3,8\%$; P < 0,001) et de LT $CD4^+$ $CD57^+$ ($8,7 \pm 2,3\%$ vs $2,6 \pm 0,7\%$; P < 0,01) est plus élevée. La répartition des sous-populations lymphocytaires semble également

différer, les patients présentant une plus forte proportion de LT $CD8^+$ de la mémoire centrale $(23,7 \pm 2,0\% \text{ vs } 14,3 \pm 1,7\% \text{ ; } P < 0,01)$ et une plus faible proportion de LT $CD8^+$ naïfs $(28,1 \pm 2,7\% \text{ vs } 44,9 \pm 4,1\% \text{ ; } P < 0,01)$ que les témoins. Le compartiment $CD4^+$ quant à lui semble peu impacté, avec un pourcentage identique de Treg.



Figure 11. Comparaison des sous-populations lymphocytaires T entre témoins et patients LLC.

50µl de sang total de témoins ou de patients atteints de LLC sont incubés avec différents anticorps pendant 10 min à température ambiante puis 15 min dans une solution de versalyse afin d'éliminer les érythrocytes. La densité des récepteurs CD4, CD8 et du TCRαβ ainsi que le pourcentage des différentes sous-populations de LT CD4⁺ et CD8⁺ sont ensuite déterminées par cytométrie en flux: les LT activés CD38⁺, les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ CD57⁺, les LT naïfs CD45RA⁺ CD62L^{fort} CD27⁺, les LT effecteurs CD45RA⁺ CD62L^{faible} CD27⁻, les LT de la mémoire centrale CD45RA⁻ CD62L^{fort} CD27⁺, les LT de la mémoire effectrice CD45RA⁻ CD62L^{faible} CD27⁻, les LT régulateurs CD4⁺ CD25^{fort} CD127^{faible}. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. **P*< 0,05; ***P*< 0,01; ns: non significatif; IMF: intensité moyenne de fluorescence. Dans un second temps, nous avons cherché à savoir si ces disparités phénotypiques pouvaient influer sur la capacité proliférative des LT de LLC par rapport aux LT de témoins. De ce fait, leur prolifération a été évaluée en absence de LB après activation pendant 4 jours. Les résultats montrent que les LT de LLC et les LT de témoins présentent un index de prolifération identique $(2,8 \pm 0,1 \text{ et } 2,9 \pm 0,1; P > 0,05)$ démontrant ainsi l'absence de défaut de prolifération des LT de LLC (Figure 12).



Figure 12. Les LT de LLC et de témoins présentent la même capacité proliférative. Mesure de la prolifération des LT de témoins (n=29) et des LT de LLC (n=56) stimulés par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en absence de LB. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. ns: non significatif.

Enfin, la sensibilité de réponse des LT de LLC vis-à-vis de la régulation des LB a été déterminée dans un modèle de co-culture hétérologue. Il s'avère que la prolifération des LT de LLC et celle des LT de témoins est inhibée de façon similaire par les LB de témoins (+0,7 \pm 2.1 et +3,8 \pm 2,5 ; *P*> 0,05) (Figure 13). Ces observations démontrent que l'absence de fonction régulatrice des LB de LLC ne peut pas être attribuée à un défaut de prolifération ou de sensibilité de leur LT autologues. Le défaut intrinsèque des LB de LLC se révèle par l'absence d'inhibition de la prolifération des LT de LLC et des LT de témoins (Figure 13).

<u>Résultats</u>



Figure 13. Les LT de LLC tout comme les LT de témoins sont sensibles à la régulation par les LB témoins.

La fonction régulatrice des LB de LLC (=7) et des LB de témoins (n=7) est évaluée en co-culture hétérologue pendant 4 jours. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **P*< 0,05; ns: non significatif.

12.3 Les LB de LLC présentent une faible densité de CD40 à leur surface en comparaison aux LB de témoins

Afin de caractériser plus précisément les LB de LLC et de comprendre leur défaut de régulation, nous avons analysé phénotypiquement les LB de LLC dans le but de rechercher des disparités avec les LB de témoins, notamment sur des marqueurs associés à la fonction régulatrice.

Sans surprise, les LB de LLC présentent un phénotype unique. Nous confirmons d'abord le diagnostic de la LLC établi par Matutes *et al*, avec une expression plus élevée du marqueur CD5 et une faible expression des récepteurs CD22, CD79b, IgM, IgD et FMC7 en comparaison avec les LB de témoins (P < 0,001) (Figure 14) [10]. Ensuite, en s'intéressant à l'expression de marqueurs décris sur les Breg tels que CD23, CD24, BR3 ou TLR-9, nous avons pu constater que leur densité était similaire pour les LB de LLC et les LB de témoins (P > 0,05). Tandis que d'autres récepteurs, associés également à la fonction régulatrice sont significativement sous-exprimés à la surface des LB de LLC (P < 0,01) à l'image de TACI, CD38, CD25 et IL-21R. On notera également la sous-expression de CD19 et CD20. Fait intéressant, l'expression de CD40, un marqueur crucial dans la génération du potentiel régulateur des LB, est fortement diminuée à la surface des LB de LLC (P < 0,01).



Figure 14. Phénotypage des LB de LLC et LB de témoins.

Les PBMC de témoins ou de LLC, isolés à partir de sang total sont marqués avec des anticorps monoclonaux. (A) Exemples représentatifs de l'expression de chaque marqueur évaluée par cytométrie en flux. (B) Evaluation de l'intensité moyenne de fluorescence de chaque marqueur des LB de témoins (n=19) et des LB de LLC (n=41). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **P*< 0,05; ***P*< 0,01; ****P*< 0,001; ns: non significatif, IMF: intensité moyenne de fluorescence.

12.4 L'interaction CD40-CD40L joue un rôle primordial dans l'induction de la fonction régulatrice des LB de témoins

Notre groupe a mis en évidence que le contrôle de la prolifération des LT par les LB nécessite un contact cellulaire impliquant l'interaction des molécules CD40-CD40L. Pour confirmer cette observation, des co-cultures ont été réalisées en présence d'un anticorps bloquant anti-CD40L (Figure 15A). Ainsi nous avons pu corroborer ces résultats, en démontrant que le blocage de l'interaction CD40-CD40L inhibe l'induction de la fonction régulatrice des LB de témoins (de $+1,9 \pm 1,0\%$ à $-2,7 \pm 0,8\%$; *P*< 0,05). Les résultats sont même comparables à ceux obtenus avec les LB de LLC ($-1,9 \pm 2,1\%$; *P*> 0,05). Pour vérifier que l'anticorps bloquant n'affecte pas directement la prolifération des LT, son effet a été testé sur des LT seuls stimulés par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Figure 15B). Or, en

présence ou non de l'anticorps bloquant, les LT de témoins $(2,7 \pm 0,04 \text{ vs } 2,7 \pm 0,03 \text{ ; } P > 0,05)$ et les LT de LLC $(2,9 \pm 0,1 \text{ vs } 3,0 \pm 0,1 \text{ ; } P > 0,05)$ prolifèrent de façon similaire, confirmant ainsi l'action de l'interaction CD40-CD40L sur le potentiel régulateur des LB. De plus, nous avons observé que plus l'expression de CD40 à la surface des LB de témoins est élevée, plus leur contrôle sur la prolifération des LT est importante (Figure 16). Cet effet n'étant pas observé chez les patients, ces résultats suggèrent qu'une signalisation défectueuse de CD40 associée à sa faible expression sur les LB de LLC pourrait être à l'origine de l'absence de fonction régulatrice spontanée.



Figure 15. Le blocage de l'interaction CD40-CD40L inhibe l'activité régulatrice des LB de témoins.

Les LT et LB sont isolés à partir de sang périphérique de témoins sains et de patients atteints de LLC. Les LT sont marqués avec un agent intercalant, le CellTrace Violet (CTV). La prolifération des LT est stimulée avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et évaluée à 4 jours de culture avec ou sans LB par cytométrie en flux. (A) Exemples représentatifs (gauche) de la prolifération des LT en absence ou présence de LB autologues avec ou sans anticorps bloquant anti-CD40L. Détermination de l'activité régulatrice des LB de témoins (n=5) et des LB de LLC (n=5) (droite). (B) Exemples représentatifs (gauche) et évaluation de la prolifération (droite) des LT de témoins (n=5) et de LLC (n=5) en culture seul avec ou sans anticorps bloquant anti-CD40L. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **P*< 0.05; ns: non significatif.



Figure 16. L'expression du récepteur CD40 à la surface des LB de témoins tend à être corrélée avec le pourcentage d'inhibition de la prolifération.

L'expression de CD40 est caractérisée par cytométrie en flux. Une corrélation entre l'activité régulatrice des LB témoins et la densité du récepteur CD40 est établie. La courbe de régression est représentée. P > 0,05; non significatif. IMF: intensité moyenne de fluorescence.

12.5 La signalisation CD40 semble déficiente dans les LB de LLC

Afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle la signalisation CD40 est défectueuse dans les LB de LLC, nous avons évalué la compétence de cette voie à générer l'activation des cellules. Dans cette optique, les LB de témoins et de LLC ont été incubés seuls avec un anticorps stimulant anti-CD40 pendant 48h et l'activation été déterminée par cytométrie en flux en mesurant l'induction de l'expression des marqueurs CD86 et CD25 ainsi que l'augmentation du pourcentage de LB CD69⁺. Contrairement aux LB de témoins, sur lesquels la stimulation anti-CD40 permet d'entraîner une exacerbation de la densité de la molécule CD86 et de la proportion de cellules CD69⁺, l'activation des LB de LLC ne semble pas être modulée (Figure 17A). L'expression du récepteur CD25, reflétant l'activation tardive des cellules, n'est quant à elle pas impacté (Figure 17B). Ces résultats suggèrent donc que le signal est CD40 défectueux dans les LB de LLC, rendant ces derniers incapables de générer spontanément une activité régulatrice.



Figure 17. La stimulation CD40 ne permet pas d'activer les LB de LLC.

L'induction de l'activation des LB de témoins (n=5) et de LLC (n=5) isolés est réalisée par une stimulation avec un anticorps anti-CD40 pendant 48h. L'activation est évaluée par cytométrie en flux en évaluant l'induction de l'expression des marqueurs CD86 et CD25 ainsi que le taux d'induction du pourcentage de LB CD69⁺ entre les cellules activées et non activées. (A) Exemples représentatifs. (B) Taux d'induction. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **P*< 0,05; ns: non significatif.

12.6 L'induction de l'activité régulatrice par la stimulation TLR-9 permet de discriminer deux groupes de patients

Outre le signal CD40, la voie de signalisation du TLR-9 joue un rôle primordial dans l'établissement de la fonction suppressive des LB. L'expression de TLR-9 étant identique entre les LB de témoins et les LB de LLC, nous avons cherché à déterminer si ces signaux sont également défectueux dans les LB de LLC, en réalisant des co-cultures autologues en présence de LB stimulés par CpG-ODN, le ligand naturel du TLR-9 (Figure 18). Comme attendu, la stimulation TLR-9 permet d'augmenter significativement l'activité régulatrice des LB de témoins en comparaison des conditions de culture en induction spontanée (+18,5 \pm 1,5% vs +2,7 \pm 1,3%; *P*< 0,001). Etonnement chez les patients LLC, l'induction de la fonction suppressive par stimulation du TLR-9 nous permet de discriminer deux groupes.

Dans le premier groupe, une faible inhibition de la prolifération des LT a été détectée (+8,0 \pm 1,2%), démontrant une induction modérée de la fonction régulatrice, que l'on nommera LLC reg faible. Cette régulation est moins efficace que celle développée par des LB de témoins (*P*< 0,001). Dans le second groupe, aucune inhibition de prolifération n'a été induite (-8,2 \pm 1,3%), reflétant l'incapacité de ces LB à amorcer une activité suppressive. Ce groupe est appelé LLC reg neg.



Figure 18. L'induction de l'activité régulatrice par la stimulation TLR-9 permet de discriminer deux groupes de patients.

Les LT et LB sont isolés à partir de sang périphérique de témoins sains et de patients atteints de LLC. Les LT ont été marqués avec un agent intercalant, le CellTrace Violet (CTV). La prolifération a été stimulée avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et évaluée à 4 jours de culture avec ou sans LB stimulés par du CpG-ODN 2006 en cytométrie en flux. (A) Illustration représentative de la prolifération des LT de témoins ou de LLC en absence ou présence de LB autologues ajoutés à un ratio 1 : 1. (B) Activité régulatrice des LB de témoins (n=29), des LB de LLC Reg faible (n=30) et des LB de LLC Reg neg (n=26) évaluée par l'inhibition de la prolifération des LT. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ****P*< 0,001.

Des cultures hétérologues ont permis de confirmer ces observations, en démontrant que les LB de LLC reg faible contrôlent la prolifération des LT autologues et des LT de témoins à un même niveau modérée d'inhibition (Figure 19). Tandis que les LB du groupe reg neg sont toujours dans l'incapacité de réguler la prolifération des LT quel que soit leur provenance. Ces résultats nous permettent également de confirmer la sensibilité des LT de LLC à la réponse des LB de témoins quel que soit les groupes de patients dont ils sont issus, les LB de témoins inhibant la prolifération des LT de témoins et des LT de LLC de façon similaire.



Figure 19. La prolifération des LT de témoins et des LT de LLC est régulée de façon identique par les LB de LLC et les LB de témoins.

La fonction régulatrice des LB de LLC reg faible (=8), des LB de LLC reg neg (n=16) et des LB de témoins (n=15) est évaluée en co-culture hétérologue pendant 4 jours. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **P*< 0,05; ****P*< 0,001; ns: non significatif.

Enfin, l'analyse de la viabilité cellulaire (Figure 20), nous permet d'écarter l'éventualité qu'une mortalité exacerbée des LT soit responsable de l'effet régulateur différentiel des LB de LLC. En effet, le taux de mortalité des LT observé en présence de LB activés de LLC reg faible bien que significatif, ne diffère pas de celui des témoins. Il semblerait donc que ces deux groupes de patients se différencient uniquement par un défaut de régulation intrinsèque des LB.



Figure 20. Les LB de LLC stimulés avec du CpG-ODN n'induisent pas une mortalité exacerbée des LT quel que soit le groupe de patients.

Le pourcentage de LT morts CD19⁻ DRAQ7⁺ est évalué par cytométrie en flux après 4 jours de culture en présence ou non de LB non-stimulés ou stimulés avec du CpG-ODN 2006. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **P*< 0,05; ***P*< 0,01; ns: non significatif.

12.7 Les facteurs sériques n'influencent pas l'activité régulatrice des LB de LLC

Nous savons de part la littérature que le microenvironnement tumoral de la LLC permet le maintien de la survie des cellules et participe activement à leur échappement au sein du système immunitaire. Le microenvironnement pourrait générer des signaux inducteurs de la fonction suppressive des LB contribuant ainsi à l'échappement tumoral. Afin de déterminer, l'influence sur l'activité régulatrice des LB de LLC stimulés par CpG-ODN des facteurs microenvironnementaux, des co-cultures ont été réalisées en présence de milieu RPMI complet contenant du sérum autologue décomplémenté de chaque individu. Tout d'abord en culture simple, nous avons pu observer que la prolifération des LT de témoins ou de LLC seuls reste identique à celle en présence de sérum autologue (Figure 21A). Il semblerait donc qu'aucun facteur présent dans le sérum des patients n'influe particulièrement sur l'activation des LT. Cependant, nous avons pu constater, que la présence de sérum autologue semblait accroître la fonction suppressive des LB de LLC. En effet, dans le groupe LLC reg faible, le sérum autologue accentue l'inhibition de la prolifération des LT (+11,0 \pm 4,2%), qui se situe au même niveau que celle des LB de témoins (+16,89 ± 1,5%; P> 0,05). Autre fait surprenant, les LB de LLC du groupe reg neg acquièrent une faible activité régulatrice en présence de leur sérum autologue (+3,8 \pm 1,7%) (Figure 21B). L'ensemble de ces observations, nous permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle un facteur soluble présent dans les sérums de patients peut moduler l'activité B régulatrice.



Figure 21. Le sérum autologue des patients LLC semble augmenter leur activité régulatrice.

Les LT et LB sont isolés à partir de sang périphérique de témoins sains et de patients atteints de LLC. Les LT ont été marqués avec un agent intercalant, le CellTrace Violet (CTV), stimulés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et mis en culture autologue 4 jours dans un milieu RPMI complet contenant 10% de sérum autologue en présence ou non de LB stimulés par du CpG-ODN 2006. (A) La prolifération des LT seuls et (B) la fonction régulatrice des LB de LLC reg faible (n=8), des LB de LLC reg neg (n=18) et des LB de témoins (n=11) sont évaluées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ****P*< 0,001; ns: non significatif.

Afin de tester cette hypothèse, la fonction régulatrice des LB de témoins, de LLC reg faible et de LLC reg neg induite par le TLR-9 en présence de sérum décomplémenté humain AB («industriel»), a été comparée à celle de sérum décomplémenté de LLC ou de sérum décomplémenté de témoins (Figure 22). Les résultats montrent que la fonction suppressive des LB de témoins et des LB de LLC reg faible est identique quel que soit le sérum utilisé (P> 0,05). Concernant les LB de LLC reg neg, leur fonction suppressive est supérieure en présence de sérum de LLC et de témoins par rapport au sérum humain AB (+4,2 ± 1,8% et +1,1 ± 1,2% vs -8,2 ± 1,3%; P< 0,001). Cependant l'inhibition de prolifération des LT induite par le sérum de LLC est similaire à celle induite par le sérum de témoin, démontrant de ce fait que la modulation de la fonction suppressive n'est pas spécifique à un facteur qui serait uniquement présent dans le sérum des patients. Ces résultats nous permettent donc de conclure que le microenvironnement tumoral soluble de la LLC ne permet pas d'influencer l'activité régulatrice des LB. Dans un but de simplifier l'implication potentiel des facteurs non connus, les expériences suivantes, ont donc été réalisées en SHAB afin d'utiliser un sérum dit standardisé.



Figure 22. Le sérum de LLC et le sérum de témoins agissent de façon identique sur l'activité régulatrice des LB.

La fonction régulatrice des LB de LLC reg faible, des LB de LLC reg neg et des LB de témoins en coculture autologue stimulés par le CpG-ODN 2006 est évaluée en présence de SHAB, de sérum de LLC et de sérum témoins. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ****P*< 0,001; ns: non significatif.

12.8 Les LB de LLC reg faible et les LB de LLC reg neg présentent un phénotype identique

Afin de caractériser plus précisément nos deux groupes de patients LLC, une nouvelle étude phénotypique a été réalisée par cytométrie en flux (Figure 23). Aucun marqueur testé ne permet de les distinguer. De plus, les LB de LLC reg faible et de LB de LLC reg neg présentent une densité d'expression du TLR-9 comparable, malgré leur activité suppressive différente suite à la stimulation de ce dernier par du CpG-ODN 2006.



Figure 23. Les LB de LLC présentent un phénotype identique quel que soit leur activité régulatrice.

Les PBMC de LLC, isolés à partir de sang total sont marqués avec des anticorps monoclonaux. L'expression des marqueurs est évaluée par cytométrie en flux. (A) Exemples représentatif de l'expression de chaque marqueur. (B) Evaluation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) de chaque marqueur sur les LB de LLC reg faible (n=21) et de LLC reg neg (n=20). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ns: non significatif.

12.9 L'activité régulatrice des LB de témoins est corrélée à la sécrétion de TGF-β

Au-delà de leur contrôle sur la prolifération des LT, les Breg sont également responsables de l'expansion d'autres cellules immunosuppressives, les Treg et de la polarisation Th1/Th2. Afin d'évaluer ces différents aspects, la sécrétion des cytokines TGF- β (caractéristique des Treg), IFN- γ et TNF- α (caractéristique des Th1) a été mesurée par ELISA dans les surnageants des co-cultures (Figure 24). Une corrélation positive a été établie entre la concentration de TGF- β et le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT générée par les LB de témoins. En revanche, aucune corrélation n'a pu être déterminée avec l'activité suppressive des LB de LLC (Figure 24A), suggérant ainsi que les LB de LLC activés par leur TLR-9 sont aussi dans l'incapacité de générer des Treg. Néanmoins, la fonction régulatrice des LB de LLC est corrélée négativement avec la concentration d'IFN- γ (Figure 24B), démontrant la capacité des LB de LLC stimulés à moduler la polarisation Th1/Th2. Bien que non significatif, le potentiel régulateur des LB de témoins apparait comme associé avec une diminution de la sécrétion de TNF- α (Figure 24C). Enfin comme attendu, nous confirmons, l'absence de corrélation entre la production d'IL-10 et l'inhibition de la prolifération des LT induite par les LB de témoins et les LB de LLC (Figure 24D).



Figure 24. La fonction régulatrice des LB de témoins est corrélée positivement à la sécrétion de TGF-β en co-culture tandis que celle des LB de LLC est négativement corrélée au taux d'IFN-γ.

Le taux de TGF- β (A), d'IL-10 (B), d'IFN- γ (C) et de TNF- α (D) est mesuré dans les surnageants de co-culture autologues de témoins et de LLC par ELISA. Une corrélation entre l'activité régulatrice et la concentration de cytokines dans les surnageants est établie. Les courbes de régressions sont déterminées pour chacune des conditions. *P*< 0,05: significatif.

12.10 La stimulation TLR-9 par du CpG ODN permet d'activer les LB de LLC reg faible et les LB de LLC reg neg

Afin de comprendre la dichotomie existante entre les deux groupes de patients, nous avons ensuite évalué la capacité des LB de LLC à être activés par une stimulation CpG-ODN. Pour ce faire, les LB de témoins et de LLC seuls ont été incubés pendant 48h avec du CpG-ODN. L'activation des cellules a été caractérisée par l'analyse de l'expression des marqueurs CD86, CD69 et CD25 en cytométrie en flux (Figure 25A et B). Une augmentation de la densité des marqueurs CD86 et CD25 et un accroissement de la proportion de cellules CD69⁺ sont observés pour les de LB témoins, les LB de LLC reg faible et les LB de LLC reg neg, reflétant l'activation effective des cellules suite à la stimulation TLR-9. L'absence de fonction régulatrice des LB de LLC reg neg ne résulte donc pas d'un défaut d'activation de la cellule.



Figure 25. Les LB de LLC sont capables de répondre à une stimulation CpG-ODN quel que soit leur groupe d'appartenance.

Les LB de témoins (n=6), de LLC reg faible (n=3) et de LLC reg neg (n=4) seuls sont mis en culture stimulés ou non par du CpG-ODN 2006 pendant 48h. L'activation est évaluée par cytométrie en flux en évaluant l'induction de l'expression des marqueurs CD86 et CD25 ainsi que le taux d'induction du pourcentage LB CD69⁺. (A) Exemples représentatifs. (B) Taux d'induction. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.

Fait intéressant, nous avons pu constater que la stimulation par le CpG-ODN, permet d'augmenter l'expression du récepteur CD40 à la surface des LB de témoins et des LB de LLC reg faible ou reg neg (Figure 26A et B). Néanmoins, la surexpression de CD40 ne semble pas être responsable du potentiel régulateur modéré des LB de LLC reg faible. En effet, le blocage de l'interaction CD40-CD40L par l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-CD40L dans les co-cultures ne permet pas de limiter l'inhibition de la prolifération des LT générée par les LB de LLC reg faible stimulés (Figure 27). Ces résultats suggèrent donc que le défaut de la voie de signalisation de CD40 persiste après stimulation du TLR-9 dans les LB de LLC et qu'il ne peut en aucun cas expliquer la génération de deux groupes fonctionnellement distincts.



Figure 26. L'expression du récepteur CD40 est induite sous stimulation CpG-ODN à la surface des LB de témoins et des deux groupes de patients LLC.

Les LB de témoins, de LLC reg faible et de LLC reg neg seuls sont mis en culture avec ou sans CpG-ODN 2006 pendant 48h. L'expression du récepteur CD40 est évaluée par cytométrie en flux. (A) Exemples représentatifs. (B) Taux d'induction. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ***P*< 0,01.



Figure 27. Le blocage de l'interaction CD40-CD40L n'influence pas la fonction régulatrice de LB de LLC reg faible en présence de CpG-ODN.

Les LT et LB sont isolés à partir de sang périphérique de témoins sains et de patients atteints de LLC. Les LT sont marqués avec un agent intercalant, le CellTrace Violet (CTV), stimulés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et mis en culture autologue 4 jours avec des LB stimulés par CpG-ODN. L'activité régulatrice des LB de témoins (n=6), des LB de LLC reg faible (n=3) et des LB de LLC reg neg (n=2) est évaluée sur la prolifération des LT autologues en présence ou non d'anticorps bloquant anti-CD40L. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **P*< 0,05; ns : non significatif.

12.11 La signalisation TLR-9 diffère entre les LB de témoins et les deux groupes de patients

La stimulation TLR-9 permet de différencier deux groupes de patients basés sur le potentiel régulateur de leur LB, indépendamment de l'expression du récepteur TLR-9. Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle l'engagement de la signalisation TLR-9 pouvait être altéré ou être différent entre témoins et groupes de patients. Afin de valider cette hypothèse, nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans les voies TLR dans les LB activés par CpG-ODN pendant 3 jours en co-culture, en utilisant la technologie TaqMan array Plate. Dans un premier temps, l'expression différentielle des gènes a été évaluée entre les LB de témoins et les LB de LLC (Figure 28). Parmi les 66 gènes des voies TLR analysés, il s'avère que 22 gènes se trouvent sur-exprimés et 29 sous-exprimés dans les LB de LLC reg faible par rapport aux témoins. Tandis que 31 gènes sont sur-exprimés et 22 sous-exprimés dans les LB de LLC reg neg en comparaison avec les LB de témoins (Tableau 10.). Parmi ces gènes différentiellement exprimés, certains comme MYD-88, IRAK-1, IRAK-4 ou IRF-7 sont directement impliqués dans la voie de signalisation TLR-9. Ces résultats pourraient expliquer en partie les différences de régulation observés entre les témoins et les patients.



Figure 28. Les LB de témoins et les LB de LLC présentent une expression différentielle des gènes associée aux voies TLR et notamment de la signalisation TLR-9.

L'ARN total des LB de témoins et de LLC stimulés par le CpG-ODN a été isolé après trois jours de co-culture en présence de LT autologues. L'expression des gènes des voies TLR a été évaluée par TaqMan array plate et interprétée en fold change. Les résultats sont représentés sous forme de Heatmap (logiciel R) comparant l'expression des gènes dans les LB de LLC reg faible ou reg neg avec celle observée dans les LB de témoins.

		Fold change		
Gene		LLC reg	LLC reg neg	Comparé au
Gene		témoins	vs témoins	témoins
IRF7	Interferon regulatory factor 7	-3.71	-4.96	
TLR10	Toll like receptor 10	-3.4	-3.18	
PIK3R5	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5	-2.53	-3.05	
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	-2.42	-2.73	
IRAK4	Interleukin 1 receptor associated kinase 4	-2.27	-1.65	
	TGE bots setivated kinges 2 (TAB2) (MAD2//7 binding protein 1	-2.14	-1.33	
	Activating transcription factor 4	-2.05	-1.07	
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88	-1.81	-1.66	Sous-
ATF2	Activating transcription factor 2	-1.76	-1.47	expression
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	-1.74	-2.06	dans les
РІКЗСА	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	-1.63	-1.29	groupes
YWHAZ	Tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	-1.62	-1.29	Broupes
МАРК9	Mitogen-activated protein kinase 9	-1.58	-1.19	
PIK3C2B	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta	-1.53	-1.52	
CREB3	CAMP responsive element binding protein 3	-1.43	-1.42	
	cAMP responsive element binding protein 2-like 4	-1.41	-1.5	
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	-1.26	-1.3	
PIK3CD	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide	-1.13	-1.15	
RIPK2	Receptor interacting serine/threonine kinase 2	-1.1	-1.08	Everageieg
втк	Bruton tyrosine kinase	-1.09	-1.02	Expression similaire
RELA	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit	-1.05	-1.03	dans les
ECSIT	ECSIT signalling integrator	-1.04	-1.06	deux
MAP2K7	Mitogen-activated protein kinase kinase 7	-1	1.07	groupes
MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12	-1	1.03	- ·
IKBKG	Innibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase gamr	1.11	1.26	
PIK3R4	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4	1.14	1.16	
RNF216	Ring finger protein 216	1.21	1.54	
Lyn96	Lymphocyte antigen 96	1.24	1.5	
NFKBIB	NFKB inhibitor beta	1.28	1.58	
IRF3	Interferon regulatory factor 3	1.29	1.28	
IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	1.41	1.81	-
IRAK1	Interleukin 1 receptor associated kinase 1	1.42	1.97	Sur-
RIPK3	Receptor interacting serine/threonine kinase 3	1.46	1.69	expression dans los
	Toll-interleukin 1 recentor (TIB) domain containing adaptor protein	1.45	1.75	deux
MAPK11	Mitogen-activated protein kinase 11	1.61	1.44	groupes
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	1.7	2.28	о ,
NFKB2	Nuclear factor kappa B subunit 2	1.76	1.84	
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	1.82	1.79	
PIK3R2	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2	1.94	2.39	
TLR1	Toll like receptor 1	2	1.59	
MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 13	2.14	1.41	
RELB	RELB proto-oncogene, NF-kB subunit	2.47	2.06	
	TANK binding kinase 1	4.42	4.97	
TFRC	Transferrin receptor	-1.45	1.04	
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	-1.25	1.22	
TLR2	Toll like receptor 2	-1.24	1.33	
TLR7	Toll like receptor 7	-1.23	1.03	
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	-1.18	1.05	
PIK3C2A	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha	-1.17	1.07	
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsil	-1.14	1.09	Expression
TICAM1	Toll like receptor adaptor molecule 1	-1.14	1.06	différentiel
IKF8 MAD242	Interferon regulatory factor 8 Mitogon activated protein kinese kinese kinese 2	-1.06	-1.3	dans les
CREB1	cAMP reconsive element hinding protoin 1	-1.04	1.48	groupos
TIRQ	Toll like recentor 9	-1.02	1.19	Broupes
REL	REL proto-oncogene, NF-kB subunit	1	1.7	
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	1.03	-1.67	
TANK	TRAF family member associated NFKB activator	1.06	1.59	
NFKB1	Nuclear factor kappa B subunit 1	1.07	1.17	
TOLLIP	Toll interacting protein	1.07	1.37	
UBC	Ubiquitin C	1.22	1.07	

Tableau 10.Expression différentielle des gènes associés à la signalisation TLR dans
les LB de LLC reg faible et LLC reg neg en comparaison aux LB de témoins.

L'ARN total des LB de témoins et de LLC stimulés par le CpG-ODN a été isolé après trois jours de co-culture en présence de LT autologues. L'expression des gènes des voies TLR a été évaluée par TaqMan array plate. Les résultats sont représentés en fold change.

Afin de confirmer les différences observées, l'expression des gènes TLR-9, IRAK-1, IRAK-4, IRF-7 et MYD-88 est déterminé par qRT-PCR avant et après stimulation des LB par CpG-ODN (Figure 29). Nous démontrons tout d'abord qu'avant mise en culture, l'expression de ces gènes diffère entre témoins et LLC avec une expression fortement diminuée pour les gènes TLR-9 et IRF-7 dans les LB de LLC. Après co-culture autologue, la plus forte disparité repose sur la sous-expression du gène IRF-7 dans les LB de LLC quel que soit le groupe. Ces observations renforcent l'idée selon laquelle l'engagement différentiel de la voie TLR-9 serait à l'origine d'une réduction du potentiel régulateur des LB de LLC.



Figure 29. Expressions différentielles des gènes associés à la voie TLR-9 dans les LB de LLC reg faible et reg neg en comparaison aux LB de témoins.

L'ARN total des LB de témoins ou de LLC est isolé à partir de cellules avant la mise en culture (A) et des cellules triées après 3 jours de co-culture avec des LT autologues (B). L'expression des gènes TLR-9, IRAK-1, IRAK-4, IRF-7 et MYD-88 est déterminée par qRT-PCR individuelle. Les résultats sont représentés en fold change en comparant les LB de LLC reg faible (n=3) avec les LB de témoins (n=3) et les LB de LLC reg neg (n=3) avec les LB de témoins. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.

12.12 L'expression des gènes de la voie TLR-9 suggère des disparités entre les deux groupes

Dans un deuxième temps, afin de mieux comprendre la dichotomie entre les deux groupes de patients, nous avons analysés l'expression des gènes des voies TLR entre les LB de LLC reg faible et reg neg (Figure 30). Nous avons comptabilisé 35 gènes sur-exprimés et 12 sous-exprimés dans les LB de LLC reg neg par rapport aux LB de LLC reg faible parmi lesquels, nous avons retrouvé IRAK-1, IRAK-4, MYD-88 et IRF-7 (Tableau 11.). On notera tout de même que la différence d'expression de ces gènes entre les deux groupes de patients est faible (Figure 31). Toutefois, l'ensemble de ces observations laissent envisager que l'engagement de la voie TLR-9 diffère entre les patients. De plus amples investigations

seraient donc à envisager pour préciser les mécanismes modulant la fonction régulatrice dans ces deux groupes.



Figure 30. Les différences d'expression des gènes des voies TLR entre les deux groupes de patients suggèrent des disparités dans leur signalisation.

L'ARN total des LB stimulés par le CpG-ODN de LLC reg faible et de LLC reg neg a été isolé après trois jours de co-culture en présence de LT autologues. L'expression des gènes des voies TLR a été évaluée par TaqMan array plate et interprétée en fold change. Les résultats sont représentés sous forme de Heatmap (logiciel R) comparant l'expression des gènes dans les LB de LLC reg neg avec celle des LB de LLC reg faible.

	Fold Change	
Gènes	LLC Reg neg vs	LLC reg faible
TLR2	2.26	
REL	1.68	
TFRC	1.65	
твр	1.6	
TBK1	1.56	
МАРЗКЗ	1.55	
МАРЗК7	1.52	
TANK	1.49	
IRAK1	1.38	
IRAK4	1.37	
JUN	1.33	
МАРК9	1.32	
CREB1	1.28	
TLR7	1.28	
TOLLIP	1.28	
IKBKE	1.27	
PIK3C2A	1.26	
РІКЗСА	1.26	dens lo groupe la Cones
RNF216	1.26	dans le groupe LLC reg neg
PIK3R1	1.25	
YWHAZ	1.25	
ІКВКВ	1.24	
NFKBIB	1.22	1
PIK3R2	1.22	
TICAM1	1.22	
TLR9	1.22	
Lyn96	1.21	
ATF2	1.19	
MAP3K7IP2	1.19	
RIPK3	1.15	
IKBKG	1.13	
IRAK2	1.13	
NFKBIA	1.12	
TIRAP	1.12	
MAP3K7IP1	1.11	
MYD88	1.09	
NFKB1	1.09	
MAP2K7	1.07	
втк	1.06	
TLR10	1.06	
NFKB2	1.04	
MAPK12	1.03	
RELA	1.02	
PIK3R4	1.01	Expression similaire
RIPK2	1.01	dans les deux groupes
CREB3	1	-
PIK3C2B	1	
HMBS	-1.01	
IKF3	-1.01	4
PIK3CD	-1.01	4
ECSII	-1.02	4
	-1.03	4
	-1.05	
DIV2C2	-1.11	4
PIKSUS	-1.12	4
DCK1	-1.13	4
PGKI	-1.18	4
	-1.19	4
P1K3K5	-1.2	Gènes sous-exprimés
	-1.21	dans le groupe LLC reg neg
	-1.21	4
	-1.25	4
UKEB3L4	-1.33	4
	-1.33	4
MADK13	-1.51	4
WAPK14	-1./3	1

Tableau 11.Expression différentielle des gènes associés à la signalisation TLR dans
les LB de LLC reg neg en comparaison aux LB de LLC reg faible.

L'ARN total des LB de LLC reg neg et LLC reg faible stimulés par le CpG-ODN a été isolé après trois jours de co-culture en présence de LT autologues. L'expression des gènes des voies TLR a été évaluée par TaqMan array plate. Les résultats sont représentés en fold change.



Figure 31. Expressions différentielles des gènes associés à la signalisation TLR-9 dans les LB de LLC reg faible et reg neg.

L'ARN total des LB de LLC est isolé à partir de cellules avant la mise en culture (A) et des cellules triées après 3 jours de co-culture avec des LT autologues (B). L'expression des gènes TLR-9, IRAK-1, IRAK-4, IRF-7 et MYD-88 est déterminée par qRT-PCR individuelle. Les résultats sont représentés en fold change en comparant les LB de LLC reg neg (n=3) avec les LB de LLC reg faible (n=3). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM.

13 Etude des caractéristiques cliniques des patients en fonction

de l'activité régulatrice des lymphocytes B

Dans la seconde partie de ce projet, nous avons voulu déterminer si l'activité régulatrice des LB des deux groupes de patients pouvait être corrélée avec des caractéristiques cliniques.

13.1 Les données cliniques des patients

Pour ce faire, nous avons comparé nos deux groupes de patients sur plusieurs aspects cliniques (Tableau 12.): le sexe, le stade clinique de Binet, l'âge au diagnostic, l'hyperlymphocytose, le statut mutationnel des gènes IGVH, les anomalies cytogénétiques ou encore l'expression du marqueur CD38 à la surface des cellules. Aucune corrélation entre ces critères et la fonction suppressive n'a pu être établie.

	LLC reg faible	LLC reg neg	P value
Nombre	n=30	n=26	
H/F	16/14	17/9	0.36
Binet A B/C	17 13	18 8	0.33
≥ 65 ans au diagnostic	13/30	14/26	0.43
≥50Giga/L ≤50Giga/L	13 17	5 21	0.06
Gènes IGVH Muté Non muté IND	21 5 4	11 3 12	1.00
Cytogénétique normal Del13q Tri12 Del11q Del17p IND	2 22 4 3 1 0	3 11 2 0 1 8	0.52
CD38 IMF ± SEM	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.5	0.86

 Tableau 12.
 Caractéristiques cliniques des patients atteints de LLC.

IND= indéterminé, IMF = intensité moyenne de fluorescence.

13.2 Caractérisation du statut mutationnel des gènes IGVH

Parmi les facteurs pronostiques de la LLC, le statut mutationnel des gènes *IGVH* est sans doute le moins discutable. Afin de le caractériser dans nos groupes de patients, un séquençage a été réalisé à partir d'ADNg. Les résultats obtenus ont été comparés sur la base de données IMGT (Tableau 13.). Un pourcentage d'homologie supérieur à 98% par rapport à la séquence germinale permet de caractériser un gène non muté, associé à une pathologie agressive. Aucune corrélation n'a pu être établie entre le statut mutationnel et la fonction régulatrice puisque 81% des patients LLC reg faible et 78% des patients LLC reg neg présentent des gènes *IGVH* mutés (P > 0,05) (Figure 32).

<u>Résultats</u>



Figure 32. L'activité régulatrice des LB de LLC n'est pas corrélée avec le statut mutationnel des gènes *IGVH*.

L'ADN génomique des LB des patients atteints de LLC a été isolé. Les gènes *IGVH* ont été amplifiés par PCR multiplexe, puis séquencés. Les résultats ont été vérifiés avec le logiciel sequencher puis analysés sur la base de donnés IMGT. Un pourcentage d'homologie avec la séquence germinale \geq 98% définit un gène *IGVH* non muté. Les résultats sont représentés en pourcentage d'individus présentant des gènes mutés ou non dans les deux groupes de patients.

Patients	Groupe	IGVH	% identité	Statut	Jonction
LLC#72	Reg Faible	IGHV3-23*01	94.39	М	CAGRDGNIPW
LLC#204	Reg Faible	IGHV4-34*01	96.45	M	CARAQTTAGFFDPW
LLC#212	Reg Faible	IGHV2-5*02	94.16	М	CAHRLRAGSPWGWGNFDYW
LLC#7	Reg Faible	IGHV3-74*03	90.2	M	CARSRYPYYFDYW
LLC#117	Reg Faible	IGHV3-47*02	89.55	Μ	CATQVARYYDILTGLL##YYYYYGMDV W
LLC#211	Reg Faible	IGHV2-5*02	89.65	М	CVHRRVQVLDQW
LLC#60	Reg Faible	IGHV3-21*01	94.1	М	CVRGEAGEPRDHYYYGMDVW
LLC#91	Reg Faible	IGHV1-3*01	90.1	М	CARGRRGIFRYNYGD#YFDHW
LLC#16	Reg Faible	IGHV3-21*01	96.77	М	CARDANGMDVW
LLC#69	Reg Faible	IGHV4-34*01	91.94	М	CARGDNWDDAGSFDSW
LLC#218	Reg Faible	IGHV3-33*01	94.79	М	CARVGGSFPGWIDPW
LLC#80	Reg Faible	IGHV4-34*01	97.01	М	CARVQVVNMVVMHIPHYFDYW
LLC#68	Reg Faible	IGHV4-34*01	96	М	CARGRWVGLIPLPVTGTATGSWFDPW
LLC#53	Reg Faible	IGHV3-11*01	90.52	М	CARRHSDLRGFWSDTSPR#YW
LLC#216	Reg Faible	IGHV3-47*02	90.94	М	?
LLC#54	Reg Faible	IGHV3-74*01	91.67	М	CARAPTTRPFDFW
LLC#55	Reg Faible	IGHV3-23*01	94.12	М	CAKVSNTTMDTPYYYYGMDVW
LLC#88	Reg Faible	IGHV3-53*01	90.71	М	CARAPAVGSDRWYGWLDPW
LLC#41	Reg Faible	IGHV3-43*02	93.2	М	?
LLC#77	Reg Faible	IGHV5-51*03	94.79	М	CARLPYGSGSYLDPW
LLC#94	Reg Faible	IGHV3-15*01	91.5	М	CMTRPPPYNDILTGTSDYW
LLC#74	Reg Faible	IGHV3-21*01	100	NM	CARDHKGGYYDFWSGFLGDWFDPW
LLC#50	Reg Faible	IGHV1-2*04	100	NM	CAREQWLPQISFDYW
LLC#71	Reg Faible	IGHV3-74*01	100	NM	CARDFPGDSSGYYYYYYGMDVW
LLC#90	Reg Faible	IGHV3-30*03	98.26	NM	CAKGGDSGTSYYYGMDVW
LLC#208	Reg neg	IGHV3-33*01	92.36	М	CAKELGPFDGFDVW
LLC#95	Reg neg	IGHC4-30*01	92.26	М	?
LLC#5	Reg neg	IGHV1-69*06	95.49	М	CAFGYQLQYLPHKG#GMDVW
LLC#87	Reg neg	IGHV3-15*07	93.24	М	CTTRSVVGWV#LDYW
LLC#206	Reg neg	IGHV3-23*01	82.43	М	CTTTLMGPGVNQFDCW
LLC#93	Reg neg	IGHV4-59	88.2	М	CARDPGYYDTSVRVNFYYYIDVW
LLC#29	Reg neg	IGHV3-21*01	96.53	М	CARDWSPPALRAVPYNYYGMDVW
LLC#40	Reg neg	IGHV3-11*01	93.56	М	CARKAYCSSTSCYMDYYYYIDV*
LLC#82	Reg neg	IGHV4-34*01	92.35	М	CVRRDATDTFAMDVW
LLC#89	Reg neg	IGHV3-15	86.02	М	CVTGAWGHGGYFDYW
LLC#194	Reg neg	IGHV3-15*01	91.5	М	CMTRPPPYNDILTGTSDYW
LLC#1	Reg neg	IGHV1-3*01	100	NM	CAREQWLVLEAFDYW
LLC#31	Reg neg	IGHV3-30*02	99.52	NM	CAKDLILRFLEWPYYYYYGMDVW
LLC#79	Reg neg	IGHV1-18*01	100	NM	CARDPREGYYDFW
LLC#96	Reg neg	IGHV1-2*02	100	NM	CARVYWNDLYYYYGMDVW

Tableau 13.Le statut mutationnel des gènes IGVH des patients.

M= muté, MN= non muté

13.3 L'activité régulatrice des LB de LLC est corrélée au temps avant l'entrée du patient en traitement et au temps de doublement lymphocytaire

Enfin, deux autres critères cliniques ont été étudiés, le temps écoulé entre le diagnostic et l'entrée en traitement des patients ainsi que le temps de doublement lymphocytaire. Nous avons ainsi pu établir que les patients ayant une faible activité B régulatrice présentent une entrée en traitement plus précoce que les patients n'en ayant aucune (Figure 33). De manière cohérente, le temps de doublement lymphocytaire intervient plus rapidement dans ce même groupe de patients (Figure 34). Ces observations laissent suggérer que les patients LLC reg faible développent une pathologie plus agressive que les patients LLC reg neg.



Figure 33. Les patients ayant des LB avec une faible activité régulatrice nécessite une entrée en traitement plus précoce que les patients n'en ayant aucune.

Le temps avant l'entrée en traitement est comparée entre les deux groupes de patients. Les résultats sont représentés sous la forme d'un graphique de Kaplan-Meier. P < 0,05: significatif.



Figure 34. Les patients ayant des LB avec une faible activité régulatrice présentent un doublement lymphocytaire plus rapide que les patients n'en ayant aucune.

Le temps de doublement est comparé entre les deux groupes de patients. Les résultats sont représentés sous la forme d'un graphique de Kaplan-Meier. P < 0,05: significatif.

Une partie des résultats que nous venons de décrire à fait l'objet d'une publication soumise à Leukemia (Annexe 3).

14 Etude longitudinale

Dans la dernière partie de ce projet, nous avons réalisé une étude longitudinale afin de déterminer l'évolution du potentiel régulateur des LB de LLC au cours de l'évolution de la pathologie. La fonction régulatrice des LB a été évaluée au cours de deux consultations distinctes à plus de 6 mois d'intervalles. Parallèlement, une caractérisation phénotypique ainsi qu'une évaluation clinique ont été déterminées. Les résultats montrent que 40% (6/15) des patients étudiés ont évolué d'un stade LLC reg neg vers un stade LLC reg faible, 47% (7/15) des patients n'ont pas présenté de changement d'activité régulatrice tandis que seulement 13% (2/15) sont passés d'un groupe LLC reg faible à un groupe LLC reg neg (Tableau 14.). Ces changements ne sont pas imputables à une évolution phénotypique (Figure 35) ni à une évolution clinique franche (Figure 36 et Figure 37). Cependant, les patients passant d'un groupe LLC reg neg à un groupe LLC reg faible présentent majoritairement une augmentation de l'hyperlymphocytose ou encore un accroissement du nombre d'aires ganglionnaires. Cependant l'incrémentation du nombre de patients est indispensable pour confirmer cette tendance.
Regneg	149		6	36.18	4.53	16	0	A	2	>125	>124	IND	120	-	76
	155	0.41	050	34.56	5.93	16	0	A	1						
	309	0.64	<50	16.86	3.75	13.2	2	Þ	2			-	i		
Regfaible	280	0.54	-50	14.81	5.79	14.7	2	A	1	>78	>28	M	>27	2	
	346	0.91	\$0	8.53	7.98	13.3	0	A	2	11		.00	-	3	
	419	1.27	\$	6.49	5.92	13.2	0	A	1	513	×17	×	514	6	
	238	0.26	6	6.98	2.92	13.3	0	Þ	2						
	273	0.12	\$	8.11	3.4	13.9	0	Þ	1	>52	>52	IND	¥	61	
	196	1.33	>50	121.86	9.99	13.7	>3		2	i			3		
	170	0.8	>50	126.01	6.14	13.9	u	80	ц	VIN	8	м	24	ž	
changement	160	0.71	>50	60.98	7.76	14.8	0	88	2	ł	3	and a		-	
Pas de	154	0.62	>50	114.12	9.35	14.3	0	80	1	42	24	NM	7	46	
	255	1.12	<50	7.06	10.16	14.3	3	80	2						
	249	0.65	60	8.43	9.35	14.8	ω	89	1	хř	X	IND	274	ና የ	
	286	0.3	>50	54.87	4.5	13.7	>3	8	2	7447	5	-	ar.	5	
	282	1.8	<50	37.27	11.5	14.7	>3	8	1	5115	82	M	35	5	
	128	1.7	>50	82.5	5.11	15	2		2				3	3	
	142	0.43	>50	81.84	4.33	15.5	3	80	1	>120	8	×	24	Z.	
	179	0.58	>50	105.29	9.26	12.6	33	80	2	se	~		•	5	
	217	0.83	60	38.52	42	12.6	w	89	1	25	26	ĸ	71	6	_
	196	0.37	>50	66.67	6.23	15.1	0	A	w					1	
	215	1.9	>50	71.99	2.29	14	0	A	2	>10	>120	IND	\$	55	
	227	1.57	>50	56.63	2.17	14.3	0	Þ	1						
Regfaible	240	0.46	< <u>5</u> 0	38.67	6.21	13.1	3	8	2	ł	4		;	2	
Regneg	276	0.36	\$	27.37	7.33	13	1	Þ	H	¥4	40	NM	13	6	
	182	0.47	<50	42.93	3.77	14.5	2	A	2			-	- AVV	4	1
	193	1.38	\$	45.2	4.47	14.5	0	A	1	× S	> 96 <	×	2100	47	
	138	0.47	\$0	10.14	2.77	13	2	Þ	2	ory			È	44	
	165	0.52	-S0	9.72	4.27	13	2	A	1	955	SCA	N	533	51	
	203	1.06	>50	98.52	5.3	15.2	2	A	2	-			1	*	
	238	1.07	>50	66.83	2.82	15	1	A	1	5	5	NN	16	5	
0 Evolution	/mm3*1000	Monocytes	>50 giga/I	(giga/l)	PNN/mm3	Hb (g/dl)	Aires ganglionnaires	Binet	Consultation	IFI	TFS	statut mutationnel	doublement	Age au agnostique	<u>e.</u>

Tableau 14.Tableau clinique de l'étude longitudinale.

M= muté, NM=non muté, IND= indéterminé, TFT= time to first treatment.

<u>Résultats</u>



Figure 35. Le phénotype des LB de LLC n'évolue pas au cours du temps.

Les PBMC de LLC, isolés à partir de sang total sont marqués avec des anticorps anti-CD19, anti-CD5 et anti-CD40. L'expression de ces marqueurs est évaluée par cytométrie en flux, chez un même patient au cours de deux consultations réalisées entre 6 et 12 mois d'intervalles.



Figure 36. Numération lymphocytaire des patients au cours des deux consultations réalisées entre 6 et 12 mois d'intervalles.



Figure 37. Nombre d'aires ganglionnaires déterminées chez les patients au cours de deux consultations réalisés entre 6 et 12 mois d'intervalles.

DISCUSSION

15 La caractérisation de la fonction régulatrice

La LLC est une pathologie complexe pour laquelle le rôle du LB leucémique à l'encontre des autres cellules du système immunitaire n'est que très peu connu. La principale question reste: comment ces LB contribuent-ils aux défauts de la réponse immunitaire observés chez les patients?

Afin de tenter d'apporter quelques éclaircissements, nous avons dans ce projet envisagé le LB de LLC dans le rôle d'un LB régulateur, suppresseur de la réponse immunitaire innée et adaptative.

15.1 Les indices laissant présager une fonction régulatrice

En effet, il est maintenant clairement établi que les LB peuvent contrôler la réponse immunitaire dans les cancers, les infections ou encore les maladies auto-immunes. Leur phénotype prête cependant toujours à débat. L'une des principales populations régulatrices identifiées est le LB «B10» sécréteur d'IL-10 [188]. Cette population, exprimant les molécules CD5⁺, CD24⁺ et CD27⁺ à sa surface, présente des caractéristiques phénotypiques communes avec les LB de LLC [246]. Par ailleurs, les LB de LLC tout comme les Breg ont la capacité de sécréter *in vitro* de l'IL-10 sous stimulation TLR-9 et CD40.

D'un point de vue fonctionnel, les LB de LLC semblent responsables de l'inhibition de l'activité cytokinique des LT CD4⁺ ainsi que de l'activité cytotoxique des LT CD8⁺. De plus, la forte proportion de Treg présents chez les patients suggère un rôle des LB dans l'expansion de ces derniers [149]. Ces arguments sous-entendent fortement que les LB de LLC peuvent présenter une capacité à supprimer la réponse cellulaire adaptative. Or, il en est de même pour les Breg, qui vont inhiber la prolifération des LT via un contact cellulaire, supprimer la différentiation Th1 par sécrétion d'IL-10 ou favoriser l'augmentation des Treg [181]. Autre point crucial, nous savons à présent que les Breg sont capables de développer l'ensemble de ces fonctions afin de supprimer la réponse anti-tumorale [245].

Au vu de ces observations, il semble pertinent d'envisager que les anomalies de la réponse immunitaire des patients soient liées à une fonction régulatrice de la part des LB de LLC.

15.2 Les indices laissant envisager l'absence de fonction régulatrice

A contrario, d'autres arguments tendent à évoquer le contraire. En effet, si l'on regarde d'un peu plus près les différents phénotypes des Breg, ces cellules peuvent également exprimer fortement le marqueur CD38, qui est majoritairement sous-exprimé dans la LLC [19, 180]. De plus, la faible expression de CD19 et du BCR sur les LB de LLC, deux molécules inductrices de la fonction suppressive des Breg, tend à suggérer une incapacité des cellules à pouvoir une activité suppressive [121, 202]. De ce fait, on retiendra également que le LB de LLC est souvent associé à une cellule anergique, incompatible avec la modulation des réponses immunitaires.

A la lumière de ces arguments, nous pouvons clairement nous interroger quant au rôle réel des LB de LLC au sein du système immunitaire.

15.3 Le choix du modèle expérimental

Le but de ce projet a donc été de démontrer le rôle régulateur éventuel des LB de LLC, susceptible de participer à la progression de la pathologie. Pour ce faire, nous avons décidé d'étudier l'activité des LB sur le contrôle de la prolifération des LT autologues, nécessitant un contact cellulaire via l'interaction CD40-CD40L, un mécanisme indépendant de l'IL-10 [181]. En effet, aucune donnée n'a encore été apportée à ce jour sur ce sujet. De plus, la forte similitude des LB de LLC avec les LB B10 ainsi que les défauts de sécrétions cytokiniques des LT de LLC laisse fortement présager un rôle des LB de LLC sur la polarisation Th1/Th2, bien que rien n'ait été démontré d'un point de vue fonctionnel [246].

Afin d'étudier, la fonction B régulatrice, un système de co-culture autologue *in vitro* a été mis en place, basé sur les précédentes études menées par notre groupe [181]. Cependant, les cultures ont été réalisées sans pré-activation des LB par anti-IgM, au vu de leur faible expression à leur surface, ni pré-stimulation par le CD40, qui se met en place au cours du contact avec les LT durant la co-culture, permettant ainsi de limiter le risque de mortalité cellulaire lié à la sortie des LB de leur microenvironnement tumoral.

16 Le défaut de régulation des lymphocytes B de LLC

16.1 L'absence de fonction régulatrice spontanée

Dans un premier temps, nous avons pu démontrer que les LB de LLC étaient dans l'incapacité d'inhiber spontanément la prolifération des LT autologues ou hétérologues. Cette régulation nécessite une interaction directe LT/LB via les molécules CD40-CD40L. Or, nous avons pu constater que l'expression de CD40 était significativement plus faible à la surface des LB de LLC par rapport aux LB de témoins. Ce défaut d'expression de CD40 apparait comme une possible explication de l'absence de fonction régulatrice dans la LLC. Jusqu'à présent une seule autre étude a fait état de cette observation [253]. Cette équipe a également démontré une expression de CD40 chez les patients ayant un gène *IGVH* muté, résultats que nous retrouvons dans notre étude (Figure 38), nous permettant ainsi de conforter nos observations.



Figure 38. L'expression de CD40 est augmentée à la surface des LB ayant un gène *IGVH* non muté.

Les PBMC de LLC, isolés à partir de sang total sont marqués avec des anticorps monoclonaux. Evaluation de l'intensité moyenne de fluorescence de chaque marqueur des LB de LLC ayant un gène *IGVH* muté (n=15) et des LB de LLC ayant un gène *IGVH* non muté (n=6). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **P*< 0,05; IMF: intensité moyenne de fluorescence.

De plus, nous avons pu constater que contrairement aux LB de témoins pour lesquels la stimulation avec un anticorps anti-CD40 permet un accroissement important de la densité des molécules CD86 et CD69, cette stimulation ne permet pas l'activation les LB de LLC. Ces résultats semblent refléter une transduction du signal CD40 défectueuse dans les LB de LLC. Toutefois, ce résultat peut s'avérer surprenant au vu de la littérature. En effet, une seule étude

fait état d'un défaut de transduction du signal de CD40 dans les LB de LLC, résultant en un défaut d'induction de la phosphorylation des protéines tyrosines kinases et d'entrée en apoptose [254]. Hormis cette étude, le CD40 est souvent associé à un signal positif pour les LB en termes de maturation, prolifération ou survie. De plus, une stimulation des LB de LLC par le CD40 a été décrite comme permettant l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 [255]. Cependant, si l'on regarde d'un peu plus près ces résultats, on constate qu'ils ont été obtenus par stimulation avec un anticorps anti-CD40L et avec un effet maximal après 3 jours de culture sur 12 patients. Dans une autre étude, l'activation des cellules de 5 patients est réalisée à partir de fibroblastes murins transfectés avec le CD40L après 22h de co-culture [256]. Il se pourrait donc que notre système de stimulation ne soit pas optimal pour pouvoir induire ces effets ou qu'un engagement du CD40 inadéquat puisse résulter en une transduction du signal insuffisante pour induire une fonction régulatrice.

Cette hypothèse est confortée par une étude parue en 2011. En effet, les auteurs ont mis en évidence deux groupes de patients après stimulation de CD40 [257]. Dans le premier groupe, les LB de LLC sont répondeurs à la stimulation CD40L, se traduisant par l'augmentation de l'expression de CD80 et CD95 ou l'activation de NF-κB. Dans le second groupe, les LB de LLC sont peu, voire pas activables par la stimulation CD40L. Ce groupe est par ailleurs associé à une maladie plus agressive. Ces résultats suggèrent donc un problème d'engagement de la signalisation CD40 dans certains LB de LLC qui pourrait dépendre des signaux environnants.

De ce fait, l'augmentation du nombre d'inclusions ainsi que la caractérisation de la stimulation CD40 sur l'ensemble de nos patients seraient nécessaires afin de déterminer si deux groupes peuvent se détacher, associés au défaut de la fonction suppressive et nous permettraient de mieux appréhender la modulation du signal CD40.

Enfin, il est à noter que la communication entre les LT et LB de LLC pourrait être affectée par le défaut de formation des synapses immunologiques. La forte expression des molécules costimulatrices CD200, PD-L1 et B7H3 serait la principale actrice de ce dysfonctionnement synaptique [164]. Bien qu'aucune étude n'a pu établir une corrélation entre l'induction de la fonction régulatrice et ces molécules, nous ne pouvons cependant pas

exclure que ce défaut de communication puisse impacter l'activité suppressive des LB de LLC.

16.2 Discrimination de deux groupes de patients sous stimulation CpG-ODN

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des co-cultures autologues en présence de CpG-ODN afin de stimuler le TLR-9 des LB. Nous avons pu constater que la moitié des patients possèdent des LB ayant la capacité d'induire une faible fonction régulatrice par activation du TLR-9, en comparaison avec les LB de témoins. D'autre part, dans 46% des cas, les LB de LLC demeurent dans l'incapacité de développer une activité suppressive à l'encontre des LT et ce malgré une expression similaire du TLR-9 dans les LB des deux groupes de patients et des témoins. Ces LB semblent par ailleurs contribuer à l'augmentation de la prolifération des LT.

Cette hétérogénéité de la réponse au CpG-ODN a été précédemment décrite, générant soit la prolifération des LB de LLC soit leur entrée en apoptose [258, 259]. Il a par ailleurs été démontré que le CpG-ODN induisait la prolifération des LB de LLC ayant un gène IGVH non-muté et une maladie progressive, tandis que l'entrée en apoptose des LB de LLC suite à la stimulation du TLR-9 a été corrélée à un statut muté [260]. Ces réponses distinctes à la stimulation CpG-ODN semblent pouvoir s'expliquer par l'ampleur de la signalisation Akt, suggérant donc que la variation des signaux intracellulaires peut déterminer l'engagement et la réponse du TLR-9. La corrélation entre le statut mutationnel des gènes IGVH et la fonction suppressive induite ou non par le CpG-ODN n'a pu être démontrée dans notre étude. Cependant, nos deux groupes de patients diffèrent tout de même d'un point de vue clinique. Les patients présentant des LB avec une faible activité régulatrice se caractérisent par un temps de doublement lymphocytaire rapide associé à une entrée en traitement plus précoce, soit une maladie plus agressive que les patients dont les LB demeurent sans activité régulatrice. De même, aucune augmentation de l'apoptose des LB de LLC n'a été observée dans nos deux groupes de patients, probablement du fait de la présence des LT apportant des signaux de survies aux cellules leucémiques.

16.3 Disparités d'expression des gènes associés aux voies TLR

Toutefois, nous avons pu clairement mettre en évidence par qRT-PCR, des disparités d'expression des gènes associés aux voies TLR et notamment TLR-9 entre les LB de LLC reg faible, reg neg et témoins activés par CpG-ODN, suggérant bien une modulation des signaux intracellulaires entre ces cellules. La question restant : comment peut-on expliquer le défaut de réponse du TLR-9 dans les LB de LLC reg faible et reg neg ?

Tout d'abord, nous pouvons supposer que ce défaut de signalisation TLR-9 ne soit que partiel et spécifique à un signal précis, les LB LLC des deux groupes de patients étant parfaitement activables par une stimulation par le CpG-ODN, comme le démontre l'augmentation de l'expression des marqueurs d'activation CD86, CD69 et CD25.

Ensuite, nous pouvons nous demander si le défaut de la voie de signalisation de la molécule CD40 peut impacter la voie TLR-9. En effet, il semblerait que plusieurs publications démontrent une communication et une synergie entre ces deux voies. Buhtoiarov et al ont mis en évidence qu'un traitement des souris par un anticorps anti-CD40 permettait d'induire une augmentation de l'expression intracellulaire du TLR-9 dans les macrophages [261]. Une synergie entre ces deux molécules a alors été identifiée en constatant un accroissement de l'activation des macrophages reflété par l'augmentation de la sécrétion d'IFN- γ , l'IL-12 et le TNF- α . Cette réponse synergique est à l'origine de l'augmentation de la réponse anti-tumorale in vitro et in vivo des macrophages. Dans une autre étude, la stimulation des LB naïfs par le CpG-ODN et un anticorps anti-CD40 entraîne, la prolifération des cellules ainsi que la commutation de classe des Ig et la production d'IgG1 et IgE [262]. L'étude confirme également que le CpG-ODN est responsable de l'induction de l'expression de CD40 sur les LB. Cependant, des effets inverses de cette synergie CD40 et TLR-9 ont été relatés par d'autres groupes. D'après les auteurs, les discordances constatées entre les études pourraient être dues à la concentration des molécules utilisées pour induire les voies de signalisation. Ils se pourraient donc que selon la nature ou l'amplitude des signaux reçus, la réponse CD40/CpG-ODN soit affectée ou induite différemment sur une même population cellulaire donnée.

Autre élément à prendre en compte, la faible expression de CD19 sur les LB de LLC par rapport aux LB de témoins pourrait être à l'origine du défaut de signalisation du TLR-9. En

effet, une étude récente montre qu'une altération de l'expression de CD19 entraîne une absence de phosphorylation de la voie PI3K/Akt/BTK après stimulation par du CpG-ODN. Ceci suggère que la présence de CD19 influence la qualité de la signalisation TLR-9 Akt et BTK dépendante [263]. Ce qui n'est pas sans rappeler l'incrimination de la signalisation Akt il y a presque dix ans déjà dans la dichotomie de réponse des LB au CpG-ODN [260]. De plus, le blocage de PI3K dans les LB provoque une altération de l'activation des cellules après stimulation par le CpG-ODN, démontrant que PI3K et CD19 sont deux molécules clés de la réponse TLR-9 [263]. Enfin, comme l'activité PI3K/Akt est également régulée par la molécule CD40 [264], il semble bien y avoir une communication entre les voies CD40 et TLR-9. Or, notre étude de l'expression des gènes associés aux voies TLR révèle un certain nombre de gènes de la famille PI3K sous-exprimés dans les LB de LLC en comparaison aux LB de témoins après stimulation des cellules par le CpG-ODN.

Enfin, lorsque l'on compare l'expression des gènes de la voie TLR-9 entre nos deux groupes de patients, nous constatons de faibles disparités. D'ailleurs, les résultats obtenus en qRT-PCR classique ne reflètent pas à 100% ceux obtenus par la technologie Taqman array, notamment pour les gènes IRAK-1 et IRAK-4. Nous pouvons très certainement attribuer ces disparités au faible nombre de patients testés ainsi qu'à l'utilisation respective d'ADNc individuel dans un cas et d'un pool d'ADNc dans l'autre cas. Malgré ces observations, trois gènes ont retenu notre attention:

- IRF-7 (interféron regulator factor 7): une protéine qui est directement impliquée dans la transduction du signal TLR-9.
- TOLLIP (toll interacting protein): une protéine inhibitrice des voies de signalisation TLR et notamment de TLR-9 [265].
- TANK (tumor necrosis factor receptor-associated factor): une protéine inhibitrice de l'ubiquitination de la molécule TRAF6 impliqué dans les voies de signalisation de TLR-9 et de CD40 [266].

La sous-expression de la molécule activatrice IRF-7 ainsi que la sur-expression des molécules inhibitrices TOLLIP et TANK identifiées dans les LB de LLC reg neg par rapport aux LB reg faible pourraient expliquer l'absence totale de fonction régulatrice dans ce groupe.

17 L'élimination des facteurs extérieurs pouvant influencer la fonction régulatrice

Notre étude a permis de mettre en lumière le défaut de régulation des LB de LLC sur la prolifération des LT. Afin de mieux comprendre l'absence de fonction suppressive, nous avons évalué l'impact de différents facteurs «physiopathologiques» susceptibles d'influencer positivement ou négativement la fonction régulatrice.

17.1 L'impact de l'hyperlymphocytose

Le ratio T : B influence la fonction régulatrice des LB de témoins. En effet, plus le nombre de LB de témoins augmente, plus l'inhibition de la prolifération des LT autologues est importante [181]. Cette observation est confirmée dans notre étude (résultats non montrés). De ce fait, nous avons voulu évaluer si l'hyperlymphocytose supportée par les patients, pouvait accroître les signaux immunosuppresseurs sur les LT et ainsi influencer la fonction régulatrice des LB de LLC. Pour ce faire, nous avons réalisé des co-cultures autologues à différents ratio T : B. Nous avons ainsi pu constater que le nombre de LB de LLC ne permettait pas d'améliorer significativement leur fonction suppressive, ni spontanée ni après stimulation avec du CpG-ODN, suggérant donc que le défaut de régulation est indépendant de l'hyperlymphocytose. Ces résultats nous ont permis dans un même temps de confirmer l'absence de signaux immunosuppresseurs membranaires par les LB de LLC.

17.2 L'impact du microenvironnement

Le microenvironnement de la LLC influe sur la survie et la prolifération des LB de LLC via différents contacts cellulaires ou facteurs solubles [129]. Il a également été établi que certains facteurs solubles tels que BAFF ou l'IL-21 jouent un rôle dans l'induction de la fonction B régulatrice. Il se pourrait alors que le taux ou la présence d'un facteur soluble sécrété par les cellules des patients LLC puissent influencer l'activité régulatrice des LB. Afin de tester cette hypothèse, nous avons évalué l'impact des différents sérums de LLC et de témoins sur l'inhibition de la prolifération des LT par les LB de LLC et les LB de témoins. Alors que les premiers résultats des cultures en sérums autologues suggéraient la présence d'un facteur permettant d'accentuer la fonction suppressive des LB de LLC, la comparaison de l'effet des différents sérums sur les mêmes cellules, nous a permis d'observer que les

sérums de LLC et ceux de témoins ont le même impact sur les cellules quel que soit leur groupe. Nous supposons donc que les différences observées entre les sérums de patients et de témoins d'un coté et le sérum standard de l'autre sont dues aux traitements subis par ce dernier lors de sa préparation.

17.3 L'impact des LT

Après avoir constaté le défaut d'activité régulatrice des LB de LLC, l'une des principales questions a été de déterminer si celui-ci était uniquement du à une déficience intrinsèque du LB. En effet, les LT de LLC présentent certaines immunodéficiences comme une diminution de la sécrétion de leur cytokine ou un défaut d'activité cytotoxique [149]. Il se pourrait donc que les LT de LLC puissent également présenter un défaut de réponses aux LB. Cette hypothèse a toutefois été écartée. Tout d'abord les LT de LLC et les LT de témoins prolifèrent de façon similaire. Ensuite, la prolifération de ces deux types cellulaires est régulée de manière identique par les LB de témoins. Enfin, aucun argument phénotypique ne laisse envisager l'incapacité des LT de LLC à être régulé. Bien qu'un pourcentage plus important de cellules mémoires ait pu être observé, aucune étude à ce jour ne permet d'affirmer que des Breg ont une capacité à réguler différemment la prolifération de LT naïfs et celle des LT mémoires. Des tris cellulaires pourraient alors être envisagés afin d'écarter cette possibilité, cependant le faible pourcentage de LT dans le sang périphérique des patients rend cette expérimentation difficile à réaliser. De plus, le fort pourcentage de LT de LLC cytotoxiques CD8⁺ CD57⁺ ne semble pas avoir d'impact sur la mortalité des LB de LLC en co-culture, le taux mortalité des LB de LLC étant inférieur à celui des LB de témoins (Figure 39). Le taux de viabilité moindre des LB ne peut donc pas expliquer l'absence de fonction régulatrice.



Figure 39. Le taux de mortalité des LB de LLC est inférieur à celui des LB de témoins. Le pourcentage de LB morts $CD19^+ DRAQ7^+$ est évalué par cytométrie en flux après 4 jours de culture en présence de CpG-ODN 2006. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ***P*< 0,01; ns: non significatif.

Enfin, un marquage des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ après culture a permis de constater une inhibition identique de leur prolifération, démontrant que le ratio CD4/CD8 ne peut influer sur l'efficacité de la fonction suppressive des LB (résultats non présentés).

18 L'implication clinique

Dans la seconde partie de notre projet, une analyse des paramètres cliniques des patients a été réalisée en fonction de l'activité régulatrice de leur LB. L'ensemble des données nous a permis d'établir que les patients présentant un temps de doublement lymphocytaire réduit et une entrée en traitement précoce, possédaient des LB capables de développer une propriété suppressive après stimulation du TLR-9. Ce résultat suggère que l'activité régulatrice des LB est associée plus spécifiquement à une maladie plus agressive. De plus, l'étude longitudinale laisse envisager que cette fonction régulatrice pourrait être acquise progressivement avec l'évolution de la pathologie. Cependant, le nombre peu important de patients inclus dans cette étude ne permet pas de conclure avec certitude.

Ces observations posent de nombreuses interrogations. La première est de savoir ce qu'implique réellement *in vivo* la fonction régulatrice des LB de LLC dans la réponse antitumorale et dans le développement de la pathologie. En effet, nous serions tentés d'affirmer que la présence de B régulateurs accentue l'inhibition de la fonction anti-tumorale générée par les LT en les empêchant de s'activer et de se développer. Cet effet serait tout à fait en adéquation avec l'établissement d'une maladie plus agressive. D'un autre coté, nous avons pu voir que la présence des LT était bénéfique pour les LB LLC, de par l'apport de signaux nécessaires à leur survie. Les LB de LLC auraient-ils alors un intérêt à freiner la prolifération de ces LT ? Toutefois, il est à noter que l'amplitude de la fonction régulatrice des LB de LLC est fortement réduite par rapport à celle des LB de témoins. Enfin, bien que les conditions de culture *in vitro* ne mettent pas en évidence une influence d'un ratio plus élevé de LB, l'hyperlymphocytose *in vivo* a probablement une influence difficile à reproduire *in vitro*. Un nombre important de Breg au contact des LT au sein des niches tumorales peut vraisemblablement avoir une influence sur les dysfonctionnements immunitaires observés chez les patients. D'autres investigations seront nécessaires afin d'apporter de plus amples explications.

19 Conclusion et perspectives

La LLC est une pathologie hétérogène et très complexe touchant près de 3000 individus par an en France. Malgré les avancées dans le développement des thérapies, il s'agit d'une maladie qui reste encore aujourd'hui incurable. Au-delà de l'accumulation exacerbée de LB CD5⁺ dans le sang, les organes lymphoïdes secondaires et la moelle osseuse, les patients souffrent également de désordres immunitaires résultant en l'absence de réponses antitumorales. Certains LB partageant des critères phénotypiques avec les LB de LLC possèdent des propriétés régulatrices leur permettant de contrôler le système immunitaire. L'implication directe des LB de LLC dans les dysfonctionnements immunitaires n'est cependant que peu décrite. Afin d'apporter une meilleure compréhension de la pathologie pouvant aider à la prise en charge des patients, notre travail a eu pour objectif de caractériser la fonction régulatrice des LB de LLC sur la prolifération des LT autologues.

Nous avons pu ainsi démontrer que les LB de LLC ne possèdent pas de fonction régulatrice spontanée contrairement aux LB de témoins. Ce défaut de régulation semble provenir d'une déficience partielle de la voie CD40, dont le signal et l'interaction avec la molécule CD40L est indispensable à l'induction de la fonction suppressive des LB.

Après stimulation du TLR-9 par le CpG-ODN, nous avons pu identifier deux groupes de patients. Dans le premier groupe, les LB de LLC sont capables d'acquérir une faible activité régulatrice en comparaison aux LB de témoins. Dans le second groupe, aucune fonction suppressive n'a pu être induite. En analysant l'expression des gènes associés à la voie TLR-9, nous avons tout d'abord pu mettre en évidence de fortes disparités entre les LB

de témoins et les LB de LLC, après co-culture, pouvant expliquer le défaut de régulation dans les LB de LLC en association avec la déficience du signal CD40. Enfin, nous avons également observé une surexpression des gènes inhibiteurs de la voie TLR-9, TOLLIP et TANK, dans les LB des patients ne présentant aucune fonction régulatrice, pouvant expliquer la distinction fonctionnelle des deux groupes de patients (Figure 40). Afin de confirmer ces observations et comprendre cette hétérogénéité de réponse au CpG-ODN, de plus amples investigations devront être réalisées. Ainsi, il conviendra d'augmenter le nombre de patients afin de confirmer l'expression différentielle des gènes impliqués dans la voie TLR-9. Ensuite, il pourrait être intéressant d'observer les effets de l'inhibition des gènes TOLLIP et TANK sur l'induction de la fonction régulatrice des LB de LLC et à contrario l'impact d'une surexpression de ces gènes sur celles des LB de témoins.

Discussion



Figure 40. Les mécanismes de régulation des LB de témoins et des LB de LLC.

Les LB de témoins développent une activité régulatrice sous la stimulation CD40 et TLR-9, leur permettant d'inhiber la prolifération des LT. La stimulation par le CpG-ODN permet de différencier deux groupes de patients LLC. Dans le premier groupe, les LB possèdent une faible fonction suppressive, probablement associée à un défaut partiel de la signalisation CD40 ainsi qu'à la faible expression de CD19 responsable de la déficience du signal TLR-9. Dans le second groupe, l'absence totale de fonction régulatrice pourrait être due à une surexpression des molécules inhibitrices de la voie TLR-9, TOLLIP et TANK.

De nouvelles investigations viseront à évaluer cette fois l'activité régulatrice des LB de LLC dépendante de l'IL-10. En effet, nous avons pu constater que les LB de témoins peuvent à la fois inhiber la prolifération des LT, augmenter l'expansion des Treg et inhiber la polarisation des LT Th1 [181, 218]. Les similitudes phénotypiques et fonctionnelles des cellules de LLC avec les B10 suggèrent que les LB de LLC sont capables de moduler la polarisation Th1/Th2 par un mécanisme dépendant de l'IL-10. L'évaluation du taux de cytokines dans les surnageants de nos co-cultures a par ailleurs permis de démontrer une corrélation négative entre l'inhibition de prolifération des LT de LLC et le taux d'IFN-y. Les LB qui développent une activité régulatrice IL-10 indépendante (inhibition de la prolifération) sont-ils les mêmes que ceux qui exercent une fonction suppressive IL-10 dépendante (polarisation Th1) ? Une caractérisation de l'expression des différents facteurs de transcription, T-bet, GATA-3, IFN-y après co-culture, permettrait d'apporter des éclairages sur ces différents mécanismes de régulation. En ce qui concerne l'expansion des LT régulateurs dans nos co-cultures, une corrélation positive entre le taux de sécrétion de TGF-B et l'activité régulatrice des LB de témoins suggère que ces derniers sont capables d'induire cette expansion. Ce qui ne semble pas être le cas pour les LB de LLC. Nos premières évaluations phénotypiques du pourcentage de LT CD4⁺ Foxp3⁺ ne permettent pas pour le moment de confirmer ces observations. Cet aspect est également à poursuivre.

Pour finir, l'étude clinique longitudinale suggère que l'acquisition de la fonction régulatrice semble survenir avec la progression de la pathologie. Dans la mesure où différents mécanismes de régulation pourraient cohabiter chez les patients, des investigations seront nécessaires afin de déterminer si ces différents évènements apparaissent simultanément ou non au cours du développement de la pathologie. Se pourrait-il que l'apparition ou la disparition de la fonction régulatrice puissent influencer la sévérité de la pathologie ? Comprendre comment sont amorcés et contrôlés ces différents mécanismes pourrait aider à évaluer l'évolution de la pathologie et ainsi à ajuster les thérapies.



The regulatory capacity of B cells from patient with CLL is defective

A Mohr, C Laot, Y Renaudineau, C Berthou, A Tempescul, H Saad, C Riou, J-O Pers, A Bordron, C Jamin

Leukemia, 2016, Submitted

THE REGULATORY CAPACITY OF B CELLS FROM 1 PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA IS 2 DEFECTIVE 3 4 Running Title: Defective regulatory function of CLL B cells 5 6 7 8 Audrey Mohr,¹ Charlotte Laot,¹ Yves Renaudineau,^{1,2} Christian Berthou,^{1,3} 9 Adrian Tempescul,^{1,3} Hussam Saad,³ Catherine Riou,² 10 Jacques-Olivier Pers,¹ Anne Bordron,^{1*} and Christophe Jamin^{1,2*} 11 12 13 14 15 ¹INSERM 16 ESPRI ERI29, EA2216 Laboratoire d'Immunothérapies et Pathologies Lymphocytaires B. Université de Brest : Labex IGO 17 "Immunotherapy, Graft, Oncology", Brest, France ; ²Laboratoire d'Immunologie 18 et Immunothérapie, CHRU Morvan, Brest, France ;³Department d'Hématologie, 19 CHRU Morvan, Brest, France 20 21 22 *These authors contributed equally to the work. 23 24 25 26 27 28 29 30 Correspondence: Dr Christophe Jamin, INSERM ESPRI ERI29, EA2216, CHRU Morvan, 31 BP824, F29609, Brest, France; Tel: +332 98 22 33 84 ; christophe.jamin@univ-brest.fr 32 33 **Conflict of interest**: The authors declare no conflict of interest. 34 35 Support: This work was supported by the "Ligue Contre le Cancer" and the "Association 36 Laurette Fugain". A.M. was supported by the Agence Nationale de la Recherche under the 37 "Investissement d'Avenir" program with the reference ANR-11-LABX-0016-001, and the 38 "Region Bretagne".

39 ABSTRACT

Regulatory B (Breg) cells negatively control the immune responses. The clinical 40 heterogeneous chronic lymphocytic leukemia (CLL) is associated with abnormal 41 immune responses responsible for defective anti-tumor activities. Intriguingly, CLL B 42 cells share some phenotypical characteristics with Breg cells suggesting that the 43 disturbances in patients may result from suppressive activities of CLL B cells. We 44 developed an autologous in vitro co-culture system and provided evidence of a 45 defective spontaneous regulatory function for all CLL B cell patients compared to 46 healthy controls. After stimulation of the Breg activity following Toll-like receptor 9 47 (TLR9) engagement, B cells from half of the patients exhibited regulatory capacities, 48 49 whilst B cells from the remaining patients were still unable to acquire a regulatory 50 function. TLR-dedicated gene expression assays highlighted differential gene expression signatures in controls and CLL patients, but also a distinct negative 51 regulation signature of the TLR9 pathway between the two groups of patients. 52 Correlations between the double time of lymphocytosis, the time to first treatment and 53 the low Breg activity indicate that these patients have more aggressive CLL than 54 55 patients without any Breg capacity. Our in vitro observations could be integrated into the follow-up of the patients and may open new therapeutic strategies. 56

57

58 INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a clinically heterogeneous disease 59 characterized by the accumulation of CD5⁺ tumor B cells originated either from naïve 60 B cells,¹ marginal zone B cells,² mature CD5⁺ B cells,³ or from the CD27⁺ memory B 61 cell compartment.⁴ The development of the disease is associated with abnormal 62 immune responses that may be responsible for the defective anti-tumor activity.⁵ T 63 cells display abnormal functions and are unable to trigger, sustain and complete an 64 immune response against the tumor cells.⁶ Furthermore, the frequency of regulatory T 65 (Treg) cells is increased in progressive CLL patients compared with indolent patients 66 and normal individuals suggesting a down-regulation of the tumor-specific response.⁷ 67

Moreover, it is now widely demonstrated that some B cells have regulatory 68 properties which lead to control adaptive as well as innate immune responses in 69 autoimmunity,⁸⁻¹⁰ infections,¹¹ allergy^{12,13} and also in cancer.¹⁴⁻¹⁷ The identification of 70 71 the regulatory B (Breg) cells remained challenging since multiple Breg subsets that are phenotypically distinct can exhibit suppressive functions, mainly through IL-10-72 dependent and -independent mechanisms.^{14,18-20} Thus, one of the predominant 73 regulatory factors secreted by Breg cells is IL-10.²¹ The IL-10 producing Breg cells, 74 called B10 cells in mice,²² represent less than 5% of the B-cell pool in humans.^{23,24} 75 They differentiate from CD24^{hi} CD27⁺ memory B cells expressing the CD5 molecule 76 following BCR and subsequent CD40 signaling,²⁵ suggesting that antigen exposure 77 and T-cell contact are key components for their generation.²⁶ However, TLR9 and IL-78 21R signals are able to generate effector B10 cells^{22,27} indicating that innate 79 stimulations can also activate efficient regulatory activities. Other Breg cells can be 80 functionally defined by their IL-10-independent control of the immune responses. 81 Thus, CD24^{hi}CD38^{hi}CD5⁺ B cells suppress the proliferative response of T cells²⁸ and 82 the function of dendric cells²⁹ mainly by cellular interactions, TGF-β production and 83 Treg expansion.³⁰ Their regulatory properties are acquired following CD40 activation 84 and are up-regulated following TLR9 engagement. 85

CLL B cells share phenotypical characteristics with Breg cells. Both human 86 B10 cells and CLL cells express CD5, CD24 and CD27³¹ and low levels of surface 87 IgM.^{23,32} They also share physiological analogies. While non-stimulated CLL cells 88 produce low levels of IL-10,³³ in vitro stimulations through CD40L or TLR9 induce 89 significant production of IL-10,³¹ similarly to human Breg cells.^{8,22,28} Finally, a subset 90 of CLL cells express PD-L1 known to be expressed by Breg cells to regulate humoral 91 immune responses in an IL-10-independent manner³⁴ suggesting that some CLL B 92 cells could also regulate humoral immunity.³⁵ Furthermore, CLL B cells are unable to 93 stimulate the T cell proliferation or their Th1 polarization³⁶ while the Treg frequencies 94 are increased in patients.³⁷ These observations indicate that they could exhibit 95 regulatory capacity to the cellular immunity similarly to Breg cells which inhibit the T 96 cell proliferation through an IL-10-independent mechanism,^{28,38} suppress the Th1 97 polarization due to IL-10 production^{26,39} and expand the Treg cells.^{28,30} Taken together, 98 the disturbance of the immune responses observed in CLL patients may result from the 99 development of Breg functions by CLL B cells.⁴⁰ 100

While CLL B cells may share immunosuppressive functions with B10 cells 101 leading to the control of Th1 polarization due to an IL-10-dependent mechanism,⁴¹ 102 their IL-10-independent regulatory properties to control the T cell proliferation during 103 immune responses have never been identified. To evaluate these capacities, we 104 developed an autologous in vitro co-culture system. We showed a defective 105 spontaneous regulatory function for all CLL B cell patients in the absence of activating 106 signals. However, after TLR9 stimulation, B cells from half of the patients exhibit 107 modest regulatory capacities, whilst B cells from the remaining patients are still unable 108 to develop regulatory function. Differential gene expression signatures between 109 110 patients and healthy controls and diverse regulatory control of the TLR9 pathway may explain the distinct behavior of the two groups of patients. Moreover, low Breg 111 activity is associated with clinical evolution suggesting that the IL-10-independent 112 regulatory control of the CLL B cells might be associated with the aggressive outcome 113 of the disease. 114

116 MATERIALS AND METHODS

117 **Patients and normal controls**

Fifty-six untreated patients fulfilling the criteria for the diagnosis of CLL were enrolled in the study and were scored clinically according to Matutes and colleagues.⁴² Twenty male and 15 female ranging in age from 40 to 84 were scored at stage A, 10 male and 8 female ranging in age from 43 to 79 scored at stage B and 3 males ranging in age from 54 to 71 scored at stage C. Blood was also taken from 29 healthy controls (HC). Consent was obtained from all individuals and the protocol approved by the Institutional Review Board at the Brest University Hospital under the reference 2008-

125 214.

126 Cell preparation

Peripheral blood mononuclear cells were separated by density-gradient centrifugation 127 128 on Ficoll-Hypaque (Eurobio, Courtaboeuf, France). T lymphocytes from HC were 129 isolated with neuraminidase-treated sheep red blood cells (Thermo scientific, 130 Hampshire, United Kingdom), and B lymphocytes were further enriched with a pan B-131 cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France). Due to the weak frequency in CLL, 132 T cells were directly isolated from the patients' peripheral blood using the 133 MACSxpress Pan T cell isolation kit (Miltenvi Biotec). The purity was over 90% in all 134 conditions.

135 Cell culture

Cells were cultured at 37°C onto 96-well plates coated with a goat affiniPure F(ab')₂ 136 137 anti-mouse IgG fragment (Jackson Immunoresearch, Baltimore, USA) in RPMI1640 medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine. 138 antibiotics and 10% of human AB serum (Sigma Aldrich). 4.10⁴ T cells were 139 stimulated with mouse anti-human CD3 (0.2µg/ml, Clone OKT3, Biolegend, San 140 141 Diego, USA) and anti-human CD28 (0.2µg/ml, Clone CD28.2, Beckman Coulter, 142 Marseille, France) mAb to induce their proliferation. B cells were activated or not with 143 CpG-ODN 2006 (0.25 µM, Invivogen, Toulouse, France). T and B cells were co-

cultured at a 1:1 ratio as previously described,²⁸ unless otherwise indicated, for four 144 days. For the proliferation assays, T cells were preliminary labeled with the 145 CellTrace[™] Violet Cell Proliferation Kit (ThermoFisher scientific, Waltham, USA) 146 and analyzed by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter, Villepinte, France). The 147 inhibition of proliferation in the presence of B cells was evaluated using the FlowJo 148 149 software (FlowJo, Ashland, USA). Blocking experiments of the Breg cell activity were performed with an anti-CD40L mAb (1µg/ml, R&D system, Minneapolis, USA). To 150 study the B cell activation, 5.10^5 CLL B cells or HC B cells were cultured alone for 151 48h in a 48-well plate with or without anti-CD40 activating mAb (2ug/ml. Beckman 152 153 Coulter) or CpG-ODN (0.25µM).

154 Flow cytometry

All antibodies were from Beckman Coulter unless otherwise specified: FITC-155 conjugated anti-TLR9 (Imgenex, San Diego, USA), CD268 (B-cell activating factor-156 receptor (BAFF-R, Biolegend), IgD, CD19, CD25 (BD Biosciences, San Jose, USA), 157 phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD5, CD19, CD86, IL21R (BD Biosciences, 158 Grenoble, France), IgM, CD267 (TACI, Biolegend), CD69, CD40, PE-cvanin(Cv)5.5-159 conjugated anti-CD27, CD25, CD79b, PE-Cy7-conjugated anti-CD19, CD23, CD38, 160 allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD40, CD24, APC-Alexa Fluor 700 161 (AF700)-conjugated anti-CD19, APC-AF750-conjugated anti-CD5, Pacific blue (PB)-162 conjugated anti-CD22, CD20 and FMC7 mAbs. 5x10⁵ lymphocytes were incubated for 163 30 min at 4°C with saturating concentrations of mAbs. The determination of the mean 164 fluorescence intensity (MFI) of all markers required a minimum of 5,000 events. The 165 results were standardized to those obtained with isotype controls. For intracellular 166 stainings, a preliminary permeabilization was performed with the cytofix/cytoperm kit 167 168 (BD Biosciences). For the proliferation evaluation after co-culture, the fluorescence 169 intensity of Cell Trace Violet was analyzed on CD19-negative T cells. Their viability was assessed using the DRAQ7 DNA staining dye (DRAQ7 Biostatus, Beckman 170 171 Coulter).

172 Elisa

173 Concentrations of IL-10 and TGF- β from the supernatants of co-cultures were 174 measured with OptEIATM IL-10 (BD Biosciences) and Human TGF-beta 1 Quantikine 175 (R&D System) ELISA kits, respectively.

176 Real Time quantitative PCR (qRT-PCR)

177 After 3 days of co-culture with T cells, CLL and HC CpG-simulated-B cells were 178 positively selected with the CD19 MicroBeads Kit (Miltenvi Biotec). Total RNA was 179 extracted with the RNeasy plus micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reversely 180 transcribed to cDNA with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Gene 181 expressions of TLR pathways were evaluated with the TagMan Array Plate (Applied 182 Biosystems, Foster City, USA). For each group defined below, 3 samples of cDNA 183 were diluted (1/40), mixed and added on one plate. Relative expression was normalized with the mean of all CTs (Cycle Threshold) and compared to each other 184 with the fold change method.⁴³ CT values greater than 35 reflected no expression and 185 were excluded from analysis. 186

187 Mutational Status of IgVH

188 Immunoglobulin variable heavy chain (IgVH) gene mutation status was determined 189 after PCR amplification and sequencing based on the BIOMED-2 consortium guidelines.^{44,45} 100ng of genomic DNA isolated with BioSprint 15 DNA Blood Kit 190 (Qiagen), 0.25µl of Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystem), 10pmol 191 of each primer,⁴⁵ 0.2mM dNTP Mix, 1.5mM MgCl₂, 1x PCR Buffer II, and qs 50µl of 192 water were used to perform the multiplex PCR amplifications. PCR products were 193 194 controlled through 2% agarose gel, purified with ExoSAP-IT PCR product cleanup 195 KIT (Affymetrix, High Wycombe, United Kingdom) and sequenced with a Big Dye 196 Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied biosystem). Results were analyzed with 197 the data base IMGT/HighV-Quest (The international ImMunoGeneTics information system, Montpellier).⁴⁶ A homology sequence >98% defined an un-mutated status. 198

199 Statistics

- All the results were analyzed with GraphPad Software and presented as Mean \pm SEM.
- 201 Analyses were performed using Mann-Whitney and Chi-square statistical tests, with
- 202 significances assessed at P < 0.05.

203

204 **RESULTS**

The spontaneous regulation of the T cell proliferative response by CLL B cells is defective

To assess their spontaneous IL-10-independent Breg function, purified B cells are 207 incubated for 4 days with autologous activated T cells.²⁸ Compared to HC B cells 208 which efficiently inhibit the HC T cell proliferation (+2.7±1.3% P<0.01), CLL B cells 209 do not control the CLL T cell proliferation (-5.5 \pm 1.4%, P>0.05) (Figure 1a). This 210 defective regulatory activity is not due to a defect of the CLL T cell proliferative 211 212 response since CLL T cells and HC T cells have a similar proliferation index when 213 activated alone (2.8 \pm 0.1 vs 2.9 \pm 0.1, respectively; P>0.05). In heterologous co-cultures, 214 HC B cells similarly inhibit the CLL T cell and the HC T cell proliferation, while CLL 215 B cells are unable to inhibit neither the CLL T cell nor the HC T cell proliferation 216 (Figure 1b). These observations indicate that the CLL T cells like HC T cells are 217 sensitive to the HC B cell regulation. Moreover, as shown in Figure 1c, no significant 218 upregulation of the inhibition can be observed when the CLL B cell ratio increases 219 (P>0.05), suggesting that the CLL B cell deficiency is independent on 220 hyperlymphocytosis. Taken together, all these results indicate that CLL B cells exhibit 221 an intrinsic defective regulatory capacity compared with HC B cells.

222 Differential expression of Breg-associated markers between CLL and HC B cells

To understand the defective regulatory capacity of CLL B cells, we searched for 223 224 phenotypic discrepancies with HC B cells. CLL B cells displayed a unique cell surface 225 phenotype with reduced expression of CD22, CD79b, IgM, IgD and FMC7, and higher level of CD5 (Figure 2a and 2b), confirming the CLL diagnosis established by Matutes 226 et al.42,47 As previously described, decreased level of CD19 and CD20 are also found 227 228 confirming the cellular origin of these cells. The evaluation of molecules associated 229 with Breg function revealed that CD23, TLR9, CD24, and BR3 densities on CLL B 230 cells are similar to those on HC B cells (P>0.05). In contrast, MFIs of TACI, CD38, CD25 and IL-21R are significantly diminished (P<0.05 to P<0.01). Because CD27-231 negative naive B cells were depicted to possess a greater regulatory capacity than 232

CD27-positive memory B lymphocytes,³⁸ we thought that the CD27 expression might 233 be higher on CLL B cells. Though CD27 MFI is similar on CLL and HC B cells 234 $(4.6\pm0.4vs4.9\pm0.3, \text{ respectively; } P>0.05)$, all CLL B cells are CD27⁺ (Figure 2a and 235 2b). However, the levels of the suppressive activity in HC are not correlated with the 236 frequencies of CD27⁺ B cells (Figure 2c), suggesting that the density of CD27 on CLL 237 238 B cells is unlikely associated with the regulatory effect. Moreover, the expression of 239 CD40 is lowered on CLL B cells ($P \le 0.05$) (Figure 2a and 2b). Interestingly, the more 240 the CD40 expression is elevated, the greater the inhibition of the T cell proliferation is 241 important for the HC B cells. However, such tendency cannot be observed for CLL B 242 cells (Figure 2c).

243 Partial defective CD40 signaling pathway in CLL B cells

The B cell regulation of the T cell proliferation requires cell-to-cell contacts with 244 CD40/CD40L interaction.²⁸ The blockade of this interaction leads to decrease the 245 regulatory activity of HC B cells from $+1.9\pm1.0\%$ to $-2.7\pm0.75\%$ (P<0.05), whilst it 246 has no effect on the CLL co-cultures (Figure 3a). When the anti-CD40L blocking mAb 247 is added to activated HC T cells or CLL T cells cultured alone, the T cell proliferative 248 responses are not affected (P>0.05) (Figure 3b), suggesting that the blockade of 249 250 CD40L does not influence the T cell proliferation induced by anti-CD3 and anti-CD28 251 stimulation. Moreover, to evaluate the ability of a CD40 signaling to efficiently 252 activate the B cells, the latter were stimulated alone using an anti-CD40 stimulating 253 mAb for 48h. In these conditions, the CD86 molecules are efficiently upregulated on HC B cells associated with an increased frequency of the early CD69-positive 254 255 activated B cells but not the late CD25-positive activated B cells, in contrast to the 256 CLL B cells that are barely activated (Figure 3c). These results are consistent with a 257 defective CD40 signaling pathway in CLL B cells that may be responsible for their 258 inability to develop spontaneous regulatory activity in close contact with the T cells.

259 TLR9-induced Breg activity discriminates two groups of CLL patients

To go further, we investigated whether the TLR9 pathway involved in the induction of strong regulatory capacity^{28,48} was disrupted in CLL B cells using autologous co-

cultures performed in the presence of CpG-ODN. TLR9-activated HC B cells exhibit 262 enhanced regulatory activity with up to $18.5\pm1.5\%$ of inhibition of the T cell 263 proliferation (Figure 4a) compared with the spontaneous condition $(2.7\pm1.3\%)$; 264 P < 0.001). TLR9 stimulation of CLL B cells identifies two groups of patients. A 265 modest reproducible regulatory capacity is induced in the first group, classified as Reg 266 267 low CLL patients, for which the inhibition of the T cell proliferation increases to 268 $+8.0\pm1.2\%$ (P<0.001). In the second group, the patients were classified as Reg neg 269 CLL patients since no inhibition of the T cell proliferation can be detected (-270 8.2±1.3%). Heterologous co-cultures between CLL cells and HC cells were performed 271 in the presence of CpG-ODN. Proliferation of CLL T cells and HC T cells are 272 similarly regulated by the TLR9-activated HC B cells as well as by the TLR9-273 activated Reg low CLL B cells, while neither CLL T cell nor HC T cell proliferative 274 response is controlled by the Reg neg CLL B cells (Figure 4b). Moreover, there are no 275 increases of the T cell mortality in the presence of TLR9-activated HC, Reg low CLL or Reg neg CLL B cells (Figure 4c). These observations confirm the similar T cell 276 277 sensitivities and suggest that the differential TLR9-induced Breg effect of CLL B cells 278 between the two groups of patients is due to intrinsic B cell regulatory differences.

279 Reg low CLL B cells and Reg neg CLL B cells share common phenotype

To better characterize the CLL B cell patients, the phenotypic study was conducted 280 281 focusing on this new classification. Reg low CLL B cells and Reg neg CLL B cells 282 share common phenotype with identical TLR9 expression level (Figure 5a) despite their differential TLR9-dependent Breg capacities. Breg cells were described to 283 increase the Treg cells in co-cultures in a TGF-β-dependent manner to enhance the 284 inhibition of the T cell proliferation.³⁰ A striking correlation is found between the 285 286 concentration of TGF-B in the co-culture's supernatants and the level of the inhibitory capacity for HC B cells (Figure 5b), but not with either group of CLL. These findings 287 suggest that TLR9-activated CLL B cells lack the capacity to induce Treg cells. 288 Finally, as expected, there is no correlation between the concentration of IL-10 and the 289 inhibition of T cell proliferation mediated by HC and CLL B cells (Figure 5c). 290

291 Differential TLR9 signaling pathway

We characterized the ability of CLL B cells to be efficiently activated by TLR9 292 293 stimulation, using HC B cells as positive controls. As shown by the up-regulated MFI 294 of CD86 and CD25 molecules or by the increased frequencies of CD69-positive cells, 295 Reg low CLL B cells as well as Reg neg CLL B cells can be activated by CpG-ODN (Figure 6a). Interestingly, stimulated CLL B cells increase also the CD40 expression 296 297 on their surface as observed for HC B cells although to a lesser extent for the Reg neg 298 CLL cells (Figure 6a). However, the blockade of CD40-CD40L interaction during co-299 cultures affects the TLR9-induced HC Breg capacity but not those of the CLL B cells 300 (Figure 6b), suggesting that their defective CD40 signaling pathway persisted after 301 CpG-ODN stimulation.

302 Because the TLR9-induced regulatory activity describes two groups of CLL patients independently of TLR9 expression, we asked the question as to whether TLR9 303 304 pathway could be differentially engaged or controlled. Among the 66 genes analyzed 305 in the TLR-dedicated TaqMan gene expression assays, 22 are over-expressed and 29 306 under-expressed in Reg low CLL cells compared to HC cells, whereas 31 genes are 307 up-regulated and 22 down-regulated in Reg neg CLL cells (Figure 6c, SI 1). To better 308 assess the differences between the two groups of patients, we compared both gene 309 expression profiles together (Figure 6c). Distributed in 4 main clusters, 29 genes are 310 over-expressed and 10 under-expressed in Reg neg CLL B cells, among which 12 genes are relevant to the TLR9 pathways. Associated with activation signals, 4 genes 311 (TBK1, IRAK-4, IRAK-1 and REL) are over-expressed when 6 genes (IRF-7, IRF-8, 312 MAPK14, MAPK13, RELB and UBC) are under-expressed. Moreover, 2 genes 313 314 (TOLLIP and TANK) associated with inhibitory signals of the TLR9 pathway are 315 over-expressed when none are found under-expressed compared to Reg low CLL B 316 cells (SI 2). These discrepancies may explain the inability for the Reg neg CLL B cells 317 to develop a Breg function following TLR9 stimulation.

Correlation of CLL Breg capacities, the time to first treatment and the doubling time of lymphocytosis

320 Finally, the correlation of the regulatory capacities of the CLL B cells with clinical aspects was assessed (Table 1). Breg activities were not correlated with either sex, age 321 322 of diagnosis, the Binet stage, lymphocytosis, CD38 expression, or cytogenetic 323 mutations, and the TLR9-induced suppressive function can neither be associated with 324 the IgVH mutational status (Figure 7a) (P>0.05). However, Reg low CLL patients are more quickly treated than Reg neg CLL patients (Figure 7b) and consistent with this 325 326 consideration, the double time of lymphocytosis occurred more quickly for the Reg 327 low CLL patients than for the Reg neg CLL patients (Figure 7c). These observations 328 indicate that Reg low CLL patients have more aggressive CLL than Reg neg CLL 329 patients.

330

331 **DISCUSSION**

Breg cells turn off the anti-tumor immune responses in solid cancers by the inhibition 332 of the T cell proliferation and the expansion of the Treg cells.^{49,50} Nevertheless, their 333 role in the development of CLL are not fully clarified and the question as to whether 334 335 CLL B cells can be considered as Breg cells contributing to disease progression has 336 not vet been elucidated. Two main mechanisms defining distinct subsets of Breg cells 337 have been distinguished to date. The first corresponds to B cells expressing IL-10 (ref. 23) leading to the control of the Th1 polarization and inflammatory responses.⁵¹ CLL 338 B cells share the functional capacity to express IL-10 (ref. 33) although the 339 340 identification and characterization of the IL-10 competent CLL cells remain to be established.³¹ The second mechanism is IL-10-independent and requires cell-to-cell 341 contact⁵² with CD40/CD40L interaction leading to the control of the T cell 342 proliferation.^{28,38} We have evidenced in the current study that, without stimulatory 343 signals, CLL B cells cannot regulate T cell proliferative responses. Their phenotypic 344 345 characterization highlighted a lowered CD40 expression compared to HC implying 346 inappropriate conditions to be efficiently activated during the close contact with T 347 cells that may explain the lack of development of Breg activities. Thus, the blockade 348 of CD40/CD40L interaction affected only the HC B cell regulation. While strong long-349 term stimulation of CLL B cells with CD40L induces up-regulation of co-stimulatory molecules,³⁶ indicating the activability of the CD40 pathway, a short stimulation with 350 351 anti-CD40 mAb performed in our experiments confirms that inadequate CD40 engagement results in poor and defective CD40-mediated transductions⁵³ that are 352 insufficient to induce suppressive function during the B cell-to-T cell interactions. All 353 354 these observations suggest that non-stimulated CLL B cells are not prone to generate 355 IL-10-independent Breg properties.

TLR9 engagement, which triggers efficient IL-10-independent regulatory activities in B cells²⁸ defined two groups of patients classified as Reg low and Reg neg CLL. No evident association could be found with either clinical aspect or with the IgVH mutational status of any patients, suggesting that defective IL-10-independent Breg activity is not associated with specific antigen-specificities. Heterogeneous 361 responses to CpG-stimulation have already been reported with proliferation of CLL B cells in half of the cases but also with apoptosis in some cases.⁵⁴⁻⁵⁶ It is likely that the 362 variation of intra-cellular signaling pathways might determine different CLL B cell 363 behaviors in response to TLR9 engagement as shown for example by the variable 364 magnitude of the Akt signaling.⁵⁷ Regarding regulatory capacities, how can the TLR9 365 defective responses in the Reg low CLL B cells and the TLR9's absent effect on the 366 367 Reg neg CLL B cells be explained? It has been recently demonstrated that the levels of 368 CD19 expression and the associated intracellular pathways are key elements in the 369 efficient TLR9-induced B cell activation. CD19 abrogated expression and/or altered PI3K/Akt/BTK-dependent CD19 pathway result in TLR9 activation defect.⁵⁸ As 370 previously observed,^{59,60} we found lower CD19 surface expression on all CLL B cell 371 patients compared with HC B cells. Furthermore, gene expression studies herein 372 revealed under-expression of PI3K family members in all patients compared with HC 373 374 after CpG-stimulation (SI 1). The lowered and lacking TLR9-dependent Breg effects of the Reg low CLL and Reg neg CLL cells suggest a Breg-associated specific 375 deficient pathway likely involving the PI3K axis for both groups of patients. 376 377 Furthermore, the supplementary over-expression of the inhibitors TOLLIP and TANK genes in the Reg neg CLL B cells participating in the inhibition of the TLR9 signals 378 379 may explain the complete missing Breg activities in the second group.

380 There are arguments indicating that CLL B cells may lose their IL-10dependent regulatory capacities with the disease's progression, which suggest that IL-381 10-dependent Breg competence appears more common in less aggressive CLL cells.³¹ 382 Our observations indicate that the TLR9-induced Breg control of the T cell 383 384 proliferation develops in patients with shorter double time of lymphocytosis and with 385 earlier time to first treatment suggesting that IL-10-independent Breg properties may be more readily in more aggressive CLL B cells. This raises the question as to whether 386 IL-10-independent control of the T cell proliferation can evolve with disease 387 388 progression. These Breg functions may control anti-tumor immune responses over time and may explain why time from diagnosis is associated with the severity of 389 immune suppression.⁵ Further studies will be required to evaluate whether IL-10-390 dependent and -independent Breg activities may be the properties of distinct or 391

392 common CLL cells and whether these regulatory mechanisms may jointly occur or 393 appear separately during disease progression. The emergence or disappearance of 394 these effects might influence the outcome of the disease's severity. Ultimately, 395 understanding how these mechanisms are controlled may help in the settings of 396 targeted therapies that could be adjusted along with the evolution of the disease.

397

398 ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Valérie Olivier and Stéphanie Deshayes for their help in collecting
the clinical information and in experimental support, respectively. We are grateful to
Geneviève Michel and Simone Forest for their help typing the manuscript and to JeanMarc Serme for its editorial assistance.
409 **REFERENCES**

410 1. Forconi F, Potter KN, Wheatley I, Darzentas N, Sozzi E, Stamatopoulos K et 411 al. The normal IGHV1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic 412 patterns characteristic of unmutated CLL. Blood 2010; 115: 71-77. 413 414 2. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. Blood 2011; 415 **117:** 1781-1791. 416 417 418 3. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Durig J et al. 419 Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. J Exp 420 Med 2012; 209: 2183-2198. 421 4. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H et al. Gene 422 expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a 423 424 homogeneous phenotype related to memory B cells. J Exp Med 2001; 194: 425 1625-1638. 426 5. Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with 427 CLL. Blood 2015; 126: 573-581. 428 429 Scrivener S, Goddard RV, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell 430 6. 431 function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Leuk Lymphoma 2003; 44: 432 383-389. 433 434 7. Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A, Hojjat-Farsangi M, Khoshnoodi J, 435 Razavi SM et al. Increased frequency of CD8+ and CD4+ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. Cancer 436 437 Invest 2013; 31: 121-131. 438 439 8. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work? Ann NY Acad Sci 2009; 1173: 260-267. 440 441

- 442 9. Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases.
 443 *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 122-132.
- 444
- In Jamin C, Morva A, Lemoine S, Daridon C, de Mendoza AR, Youinou P.
 Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 1900-1906.
- 448
- 449 11. Fillatreau S. Novel regulatory functions for Toll-like receptor-activated B cells
 450 during intracellular bacterial infection. *Immunol Rev* 2011; 240: 52-71.
- 451
- 452 12. Smits HH. B cells in allergic diseases: bad or better? *Autoimmunity* 2012; 45:
 453 415-426.
- 454
- 455 13. Drolet JP, Frangie H, Guay J, Hajoui O, Hamid Q, Mazer BD. B lymphocytes
 456 in inflammatory airway diseases. *Clin Exp Allergy* 2010; **40:** 841-849.
- 457

- 462
- 463 15. Zhang Y, Gallastegui N, Rosenblatt JD. Regulatory B cells in anti-tumor
 464 immunity. *Int Immunol* 2015; 27: 521-530.
- 465
- 466 16. He Y, Qian H, Liu Y, Duan L, Li Y, Shi G. The roles of regulatory B cells in cancer. *J Immunol Res* 2014; 2014: 215471.
- 468
- 469 17. Balkwill F, Montfort A, Capasso M. B regulatory cells in cancer. *Trends*470 *Immunol* 2013; 34: 169-173.
- 471
- 472 18. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol* 2015; 27: 479-486.

^{458 14.} Gorosito Serran M, Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Acosta Rodriguez EV,
459 Montes CL, Gruppi A. The regulatory role of B cells in autoimmunity,
460 infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. *FEBS Lett* 2015;
461 589: 3362-3369.

474		
475 476	19.	Ray A, Wang L, Dittel BN. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. <i>Int Immunol</i> 2015; 27: 531-536.
477		
478 479	20.	Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. <i>Immunity</i> 2015; 42: 607-612.
480		
481 482	21.	Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. <i>Annu Rev Immunol</i> 2012; 30: 221-241.
483		
484 485 486	22.	Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. <i>J Immunol</i> 2009; 182 : 7459-7472.
487		
488 489 490	23.	Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM <i>et al.</i> Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. <i>Blood</i> 2011; 117: 530-541.
491		
492 493 494	24.	Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. <i>Joint Bone Spine</i> 2013; 80: 18-22.
495		
496 497	25.	Tedder TF. B10 Cells: A Functionally Defined Regulatory B Cell Subset. J Immunol 2015; 194: 1395-1401.
498		
499 500 501 502	26.	Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. <i>J Immunol</i> 2010; 185 : 2240-2252.
503		
504 505 506	27.	Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI <i>et al.</i> Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. <i>Nature</i> 2012; 491 : 264-268.

507		
508 509	28.	Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. <i>J Autoimmun</i> 2011; 36: 228-238.
510		
511 512 513	29.	Morva A, Lemoine S, Achour A, Pers JO, Youinou P, Jamin C. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. <i>Blood</i> 2012; 119: 106-114.
514		
515 516 517	30.	Nouel A, Pochard P, Simon Q, Segalen I, Le Meur Y, Pers JO <i>et al.</i> B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner. <i>J Autoimmun</i> 2015; 59: 53-60.
518		
519 520 521	31.	DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y <i>et al</i> . Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. <i>Leukemia</i> 2013; 27: 170-182.
522		
523 524 525	32.	Coelho V, Krysov S, Steele A, Sanchez Hidalgo M, Johnson PW, Chana PS <i>et al</i> . Identification in CLL of circulating intraclonal subgroups with varying B-cell receptor expression and function. <i>Blood</i> 2013; 122 : 2664-2672.
526		
527 528 529 530	33.	Rossi M, Gentile M, Toscano R, Recchia AG, Bossio S, Caruso N <i>et al.</i> Enumeration of interleukin-10-positive B cells from peripheral blood of patients with chronic lymphocytic leukemia. <i>Leuk Lymphoma</i> 2014; 55 : 1394- 1396.
531		
532 533 534	34.	Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. <i>Nat Commun</i> 2015; 6 : 5997.
535		
536 537 538 539	35.	Sampalo A, Navas G, Medina F, Segundo C, Camara C, Brieva JA. Chronic lymphocytic leukemia B cells inhibit spontaneous Ig production by autologous bone marrow cells: role of CD95-CD95L interaction. <i>Blood</i> 2000; 96 : 3168-3174.

540		
541 542 543 544	36.	Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B, Hallek M. CD40-activated B- cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. <i>Blood</i> 1999; 93 : 1992-2002.
545		
546 547 548 549	37.	Piper KP, Karanth M, McLarnon A, Kalk E, Khan N, Murray J <i>et al</i> . Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells. <i>Clin Exp Immunol</i> 2011; 166 : 154-163.
550		
551 552 553 554	38.	Nouel A, Segalen I, Jamin C, Doucet L, Caillard S, Renaudineau Y <i>et al.</i> B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. <i>Kidney Int</i> 2014; 85: 590-599.
555		
556 557 558 559	39.	Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR <i>et al.</i> CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. <i>Immunity</i> 2010; 32: 129-140.
560		
561 562 563	40.	Mohr A, Renaudineau Y, Bagacean C, Pers J-O, Jamin C, Bordron A. Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia. <i>OncoImmunology</i> 2016; 5 : e1132977.
564		
565 566 567	41.	DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. <i>Ann NY Acad Sci</i> 2010; 1183: 38-57.
568		
569 570 571	42.	Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH <i>et al</i> . The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. <i>Leukemia</i> 1994; 8: 1640-1645.
572		

- 573 43. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real574 time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:
 575 402-408.
- 576
- 577 44. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL *et al.* Chronic
 578 lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated
 579 antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1515-1525.
- 580
- 581 45. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL et al. Design and standardization of PCR primers and protocols 582 gene of clonal immunoglobulin and T-cell 583 for detection receptor 584 recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 585 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003; 17: 2257-2317.
- 586
- Alamyar E, Duroux P, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT((R)) tools for the
 nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J
 repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and
 IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol Biol* 2012; **882:** 569-604.
- 591
- Moreau EJ, Matutes E, Ahern RP, Morilla AM, Morilla RM, OwusuAnkomah
 KA *et al.* Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system
 with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American Journal of Clinical Pathology* 1997; **108:** 378-382.
- 596
- 597 48. Lenert P, Brummel R, Field EH, Ashman RF. TLR-9 activation of marginal
 598 zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10
 599 production. *J Clin Immunol* 2005; **25:** 29-40.
- 600
- 601 49. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K *et al.*602 Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by
 603 converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res* 2011; 71:
 604 3505-3515.

605

606 50. Qin Z, Richter G, Schuler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. B cells inhibit
607 induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 1998; 4: 627-630.

609 51. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-610 dependent inflammatory responses. Immunity 2008; 28: 639-650. 611 612 613 52. Ray A, Basu S, Williams CB, Salzman NH, Dittel BN. A novel IL-10-614 independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by 615 maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. J Immunol 2012; 188: 3188-3198. 616 617 Laytragoon-Lewin N, Duhony E, Bai XF, Mellstedt H. Downregulation of the 618 53. 619 CD95 receptor and defect CD40-mediated signal transduction in B-chronic lymphocytic leukemia cells. Eur J Haematol 1998; 61: 266-271. 620 621 622 54. Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poeck H, Hartmann E 623 al. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG et oligodeoxynucleotides. Clin Cancer Res 2005; 11: 1490-1499. 624 625 626 55. Decker T, Schneller F, Hipp S, Miething C, Jahn T, Duyster J et al. Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, 627 cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. Leukemia 628 629 2002; 16: 327-334. 630 56. Jahrsdorfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, Taylor CM, Griffith TS, Link BK 631 et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell 632 chronic lymphocytic leukemia cells. J Leukoc Biol 2005; 77: 378-387. 633 634 635 57. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P et al. 636 The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of 637 chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable 638 disease. Leukemia 2007; 21: 110-120. 639

Morbach H, Schickel JN, Cunningham-Rundles C, Conley ME, Reisli I, Franco
JL *et al.* CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells. J *Allergy Clin Immunol* 2016; **137:** 889-898 e886.

- 644 59. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D.
 645 Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin*646 *Pathol* 1998; **51:** 364-369.
- 648 60. Huh YO, Schweighofer CD, Ketterling RP, Knudson RA, Vega F, Kim JE *et al.*649 Chronic lymphocytic leukemia with t(14;19)(q32;q13) is characterized by
 650 atypical morphologic and immunophenotypic features and distinctive genetic
 651 features. *Am J Clin Pathol* 2011; **135:** 686-696.

655 **FIGURES**



656

Figure 1. 657 The regulatory activity of unstimulated CLL B cells is defective. T and B cells were purified from the peripheral blood of healthy controls 658 (HC) and CLL patients. T cells were labeled with cell trace violet (CTV) 659 and cultured with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Their proliferative 660 response was evaluated by the decreased fluorescence intensity of CTV 661 after four days. (a) Representative examples of HC and CLL T cell 662 proliferation with or without autologous unstimulated B cells added at a 663 1:1 ratio, and determination of HC (n=16) and CLL (n=30) B cell 664 regulatory activities evaluated as the B cell-induced inhibition of T cell 665 proliferation. (b) Regulatory activity of HC (n=9) and CLL (n=9) B cells 666 evaluated in heterologous co-cultures. (c) Regulatory activity of CLL B 667 cells co-cultured with T cells at various T cell:B cell ratio. Results are 668 expressed as Mean ± SEM. **P*<0.05; ****P*<0.001; ns, not significant. 669



671 Figure 2. Phenotypic signature of CLL B cells. Peripheral B cells from healthy controls (HC) and CLL patients were characterized by flow cytometry. 672 673 (a) Representative examples of flow cytometry analysis. (b) Mean fluorescence intensity (MFI) of all markers analyzed on HC (n=19) and 674 CLL (n=41) B cells. Results are expressed as Mean \pm SEM. *P<0.05; 675 **P < 0.01; ***P < 0.001; ns, not significant. (c) Correlations between the 676 regulatory activities of B cells evaluated as the B cell-induced inhibition 677 678 of the T cell proliferation in autologous co-cultures and the frequencies of CD19+CD27+ B cell subset in HC and the MFI of CD40 on HC and 679 680 CLL B cells. Regression lines are shown.

Figure 3





699 (right) are shown. Results are expressed as Mean \pm SEM. **P*<0.05; 700 ***P*<0.01; ****P*<0.001; ns, not significant.



701

Figure 4. TLR9-induced regulatory activities of CLL B cells. T and B cells were 702 purified from the peripheral blood of healthy controls (HC) and CLL 703 patients. T cells were labeled with cell trace violet (CTV) and cultured 704 with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Their proliferative response was 705 evaluated by the decreased fluorescence intensity of CTV after four days. 706 (a) Representative examples of HC and CLL T cell proliferation with or 707 without autologous CpG-stimulated B cells added at a 1:1 ratio (left) and 708 determination (right) of HC (n=29) and Reg low CLL (n=30) and Reg 709 710 neg CLL (n=26) B cell regulatory activities evaluated as the B cellinduced inhibition of T cell proliferation. (b) Regulatory activities of Reg 711 low CLL (n=8) and Reg neg CLL (n=16) B cells evaluated in 712 heterologous co-cultures with HC cells. (c) Frequencies of CD19-713 DRAQ7+ dead T cells after 4 days of culture with or without 714 715 unstimulated or CpG-stimulated B cells evaluated by flow cytometry. Results are expressed as Mean ± SEM. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; 716 ns, not significant. 717



Figure 5. 719 Reg low CLL and Reg neg CLL B cells shared common phenotype. (a) Representative examples of peripheral B cell flow cytometry analysis 720 721 from Reg low CLL and Reg neg CLL patients, and mean fluorescence intensity (MFI) of all markers analyzed on Reg low CLL (n=21) and Reg 722 neg CLL (n=20) B cells. Results are expressed as Mean \pm SEM. ns, not 723 significant. (b, c) Correlations between the regulatory activities of CpG-724 stimulated B cells evaluated as the B cell-induced inhibition of the T cell 725 proliferation in autologous co-cultures of healthy control (HC), Reg low 726 or Reg neg cells and the concentrations determined by ELISA of TGF-B 727 (b) and IL-10 (c) in the supernatants. Regression lines are shown. 728



729

Figure 6. 730 Specific TLR9 pathway functionalities in CLL B cells. Peripheral B 731 cells from healthy controls (HC), Reg low CLL and Reg neg CLL patients were stimulated for 2 days with or without CpG-ODN. (a) 732 733 Representative examples of CD86, CD69 and CD25 expression analyzed by flow cytometry (left) and determination of CpG-induced level (right) 734 735 on HC (n=5), Reg low CLL (n=5) and Reg neg CLL (n=5) B cells. 736 Representative examples (upper) and variation (lower) of CD40 expression on HC, Reg low CLL and Reg neg CLL B cells. (b) 737 Determination of HC, Reg low CLL and Reg neg CLL B cell regulatory 738 739 activities evaluated as the CpG-activated B cell-induced inhibition of T 740 cell proliferation in a 4-day autologous co-culture with or without anti-CD40L blocking mAb. Results are expressed as Mean \pm SEM. *P<0.05. 741 742 (c) After 3 days of co-cultures with autologous activated T cells, CpGstimulated HC, Reg low CLL and Reg neg CLL B cells were sorted and 743 TLR-associated gene expressions were assessed using TaqMan array 744

qRT-PCR. Heat maps of differential expression profiles (Ct values)
between Reg low CLL and HC B cells, Reg neg CLL and HC B cells,
and Reg low CLL and Reg neg CLL B cells are shown.



Figure 7. Patients with low regulatory B cell activity present a more aggressive
form of CLL. (a) Assessment of the IgVH gene mutational status by
genomic DNA sequencing in Reg low CLL and Reg neg CLL patients.
(b, c) Kaplan-Meier graphs for the comparisons between Reg low CLL
patients and Reg neg CLL patients of the time to first treatment (b) and
the double time of lymphocytosis (c).

755

	Reg low CLL patients	Reg neg CLL patients	Р
Number of patients	n=30	n=26	
Sex ratio Male/Female	16/14	17/9	0.36
Binet's Stage A B/C	17 13	18 8	0.33
\geq 65 years old at diagnosis	13/30	14/26	0.43
Lymphocytosis ≥50Giga/L ≤50Giga/L	13 17	5 21	0.06
IgVH mutational status Mutated Unmutated ND	21 5 4	11 3 12	1.00
Cytogenetic abnormalities normal Del13q Tri12 Del11q Del17p UND	2 22 4 3 1 0	3 11 2 0 1 8	0.52
CD38 MFI ± SEM	1.5±0.2	1.9±0.5	0.86

Table 1. Clinical characteristics of the CLL patients.

Abbreviations: CLL, chronic lymphocytic leukemia; MFI, mean fluorescence
intensity; ND, not determined; UND, undetermined.

Supplementary Information 1. 764

Differential expression of the TLR-associated genes in Reg neg CLL B cells and Reg low CLL B cells compared with healthy controls. 765

	Fold change			
Gene		Reg low CLL vs HC	Reg neg CLL vs HC	Compared with HC
IRF7	Interferon regulatory factor 7	-3,71	-4,96	
TLR10	Toll like receptor 10	-3,4	-3,18	
PIK3R5	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5	-2,53	-3,05	
РІКЗСЗ	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	-2,42	-2,73	
IRAK4	Interleukin 1 receptor associated kinase 4	-2,27	-1,65	
ТВР	TATA-box binding protein	-2,14	-1,33	
MAP3K7IP1	TGF-beta activated kinase 2 (TAB2)/MAP3K7 binding protein 1	-2,09	-1,87	
ATF4	Activating transcription factor 4	-1,81	-2,19	
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88	-1,81	-1,66	
ATF2	Activating transcription factor 2	-1,76	-1,47	Under-
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	-1,74	-2,06	expression in the two
РІКЗСА	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	-1,63	-1,29	groups
YWHAZ	Tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	-1,62	-1,29	
МАРК9	Mitogen-activated protein kinase 9	-1,58	-1,19	
РІКЗС2В	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta	-1,53	-1,52	
CREB3	cAMP responsive element binding protein 3	-1,43	-1,42	
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A	-1,41	-1,5	
CREB3L4	cAMP responsive element binding protein 3-like 4	-1,37	-1,84	
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	-1,26	-1,3	
PIK3CD	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide	-1,13	-1,15	
RIPK2	Receptor interacting serine/threonine kinase 2	-1,1	-1,08	
ВТК	Bruton tyrosine kinase	-1,09	-1,02	Similar
RELA	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit	-1,05	-1,03	expression in
ECSIT	ECSIT signalling integrator	-1,04	-1,06	the two
MAP2K7	Mitogen-activated protein kinase kinase 7	-1	1,07	groups
MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12	-1	1,03	
IKBKG	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells, kinase gamma	1,11	1,26	
IRAK2	Interleukin 1 receptor associated kinase 2	1,11	1,26	Orver
PIK3R4	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4	1,14	1,16	expression in
RNF216	Ring finger protein 216	1,21	1,54	the two
Lyn96	Lymphocyte antigen 96	1,24	1,5	groups
NFKBIB	NFKB inhibitor beta	1,28	1,58	
IRF3	Interferon regulatory factor 3	1,29	1,28	

IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells kinase beta	1,41	1,81	
IRAK1	Interleukin 1 receptor associated kinase 1	1,42	1,97	
RIPK3	Receptor interacting serine/threonine kinase 3	1,46	1,69	
MAP3K7IP2	TGF-beta activated kinase 1 (TAB1)/MAP3K7 binding protein 2	1,49	1,79	
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	1,5	1,68	
MAPK11	Mitogen-activated protein kinase 11	1,61	1,44	
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	1,7	2,28	
NFKB2	Nuclear factor kappa B subunit 2	1,76	1,84	
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	1,82	1,79	
PIK3R2	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2	1,94	2,39	
TLR1	Toll like receptor 1	2	1,59	
MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 13	2,14	1,41	
RELB	RELB proto-oncogene, NF-kB subunit	2,47	2,06	
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	4,42	4,97	
TBK1	TANK binding kinase 1	-1,49	1,04	
TFRC	Transferrin receptor	-1,35	1,21	
МАРЗК7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	-1,25	1,22	
TLR2	Toll like receptor 2	-1,24	1,33	
TLR7	Toll like receptor 7	-1,23	1,03	
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	-1,18	1,05	
PIK3C2A	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha	-1,17	1,07	
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells, kinase epsilon	-1,14	1,09	Different
TICAM1	Toll like receptor adaptor molecule 1	-1,14	1,06	expression in
IRF8	Interferon regulatory factor 8	-1,06	-1,3	the two
MAP3K3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	-1,04	1,48	groups
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	-1,02	1,24	
TLR9	Toll like receptor 9	-1,02	1,19	
REL	REL proto-oncogene, NF-kB subunit	1	1,7	
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	1,03	-1,67	
TANK	TRAF family member associated NFKB activator	1,06	1,59	
NFKB1	Nuclear factor kappa B subunit 1	1,07	1,17	
TOLLIP	Toll interacting protein	1,07	1,37	
UBC	Ubiquitin C	1,22	1,07	

- 767
- Expressions of the genes were determined by qRT-PCR. Numbers indicate the fold change expression in CpG-stimulated Reg neg CLL and Reg low 768
- CLL B cells compared with CpG-stimulated healthy control (HC) B cells 769
- after 3 days of co-cultures with autologous T cells. 770

771 Supplementary Information 2.

- 772 Differential expression of the TLR9 pathway-associated genes in Reg
- neg CLL B cells compared with Reg low CLL B cells.

	TLR9 pathway-associated genes				
Keg neg ULL B cells	Activation		Inhibition		
	TBK1	+1.56	TOLLIP	+1.28	
Over eveneration	IRAK-4	+1.37	TANK	+1.49	
Over-expression	IRAK-1	+1.38			
	REL	+1.68			
	IRF-7	-1.33			
	IRF-8	-1.21			
Under expression	MAPK14	-1.73			
Under-expression	MAPK13	-1.51			
	RELB	-1.19			
	UBC	-1.13			

Numbers indicate the fold change expression of the gene in CpG-stimulated
 Reg neg CLL B cell compared with CpG-stimulated Reg low CLL B cells

after 3 days of co-cultures with autologous T cells.

777

778



Human regulatory B cells control Tfh response

Achouak Achour, Quentin Simon, Audrey Mohr, Jean-François Séité, Pierre Youinou, Boutahar Bendaoud, Ibtissem Ghedira, Jacques-Olivier Pers and Christophe Jamin

JACI, 2016, Accepted

Human regulatory B cells control Tfh response

Achouak Achour, PhD,¹ Quentin Simon, MSc,¹ Audrey Mohr, MSc,¹ Jean-François Séité, PhD,^{1,2} Pierre Youinou, MD, PhD,^{1,2} Boutahar Bendaoud, Pharm D,² Ibtissem Ghedira, Pharm D, PhD,³ Jacques-Olivier Pers, DDS, PhD,^{1,2} and Christophe Jamin, PhD,^{1,2}

¹Université de Brest, EA2216, INSERM ESPRI, ERI29, Brest, France and LabEx IGO, Brest, France

²CHRU Morvan, Laboratoire d'Immunologie, Brest, France

³Faculty of Pharmacy, Department of Immunology, Research Unit (03/UR/07-02), Monastir, Tunisia

Correspondance: Christophe JAMIN, Laboratoire d'Immunologie, CHRU Morvan, BP 824, 29609 Brest Cedex, France. Phone: +33 2 98 22 33 84, Fax: +33 2 98 22 38 47, E-mail: <u>christophe.jamin@univ-brest.fr</u>

Funding: Agence Nationale de la Recherche under the "Investissement d'Avenir" program with the reference ANR-11-LABX-0016-001.

1 ABSTRACT

Background: Follicular helper T (Tfh) cells support the terminal B-cell
differentiation. Human regulatory B (Breg) cells modulate cellular responses but their
control of Tfh-dependent humoral immune responses is unknown.

5 **Objective**: We sought to assess the role of Breg cells on Tfh development and 6 function.

Methods: Human T cells were polyclonally stimulated in the presence of IL-12 and
IL-21 to induce the differentiation into Tfh cells. They were co-cultured with B cells to
provoke their terminal differentiation. Breg cells were included in these cultures to
evaluate their effects using flow cytometry and ELISA.

Results: Bcl-6, IL-21, ICOS, CXCR5 and PD-1 expressions increased on stimulated 11 human T cells, characterizing Tfh-cell maturation. In co-cultures, they differentiated B 12 cells into CD138⁺ plasma and IgD⁻CD27⁺ memory cells, and triggered immunoglobulin 13 secretions. Breg cells obtained by TLR9 and CD40 activation of B cells, prevented Tfh-14 cell development. Added to Tfh and B cells co-cultures, they inhibited the B-cell 15 differentiation, impeded immunoglobulin secretions, and expanded Foxp3⁺CXCR5⁺PD-16 1⁺ follicular regulatory T (Tfr) cells. Breg cells modulated IL-21R expressions on Tfh 17 and B cells, and their suppressive activities involved CD40, CD80, CD86, ICAM 18 interactions and required production of IL-10 and TGFB. 19

20 **Conclusion**: Human Breg cells control the Tfh-cell maturation, expand Tfr cells 21 and inhibit the Tfh-mediated antibody secretion. These novel observations suggest that 22 deficient functions of Breg cells may impair the Tfh-dependent control of humoral 23 responses and may lead to the development of aberrant autoimmune responses.

25 **KEY MESSAGES:**

Human Tfh cells can be induced in vitro and trigger the terminal differentiation of Bcells.

28 Human regulatory B cells suppress Tfh cell development and function.

Impaired regulatory B cell activities may contributes to the development of aberrant
 autoimmune responses.

32 CAPSULE SUMMARY

Our study describes *in vitro* models assessing the role of human regulatory B cells to modulate Tfh cell development and function and hence, to control the humoral immune response.

36 **KEY WORDS:**

37 Regulatory B cells, follicular T helper cells, IL-12, IL-21, antibody production,
38 humoral immune response.

40 ABBREVIATIONS

41	Ab	Antibody
42	Bcl-6	B cell lymphoma 6
43	Breg	Regulatory B
44	CXCR5	Chemokine receptor 5
45	DC	Dendritic cells
46	DCs	Dendritic cells
47	GC	Germinal centers
48	GCs	Germinal centers
49	HD	Healthy donors
50	ICOS	Inducible costimulator
51	SLE	Systemic lupus erythematosus
52	Tfh	Follicular T helper
53	Tfr	Follicular regulatory T
54	TGF	Transforming Growth Factor

56 **INTRODUCTION**

Antibody (Ab)-producing cells and memory B cells are terminally differentiated B 57 cells that arise during adaptive humoral immune responses in germinal centers (GCs),¹ 58 under the supervision of T follicular helper (Tfh) cells.² The development and control of 59 The cells is still a matter of debate.³ One day after priming by dendritic cells (DCs) in the 60 T zone, antigen-activated CD4⁺ T cells up-regulate Bcl-6 which is necessary for Tfh cell 61 formation.⁴ This initial commitment is influenced by DC-derived factors such as ICOS 62 ligand and IL-12.^{5,6} After three days, CXCR5 is up-regulated which helps the correct 63 positioning at the T cell-B cell border facilitating cognate interactions with B cells and 64 their subsequent entry to B cell follicles.⁷ Within the follicles, Tfh cells are characterized 65 by constant elevated expression of CXCR5 and up-regulation of PD-1.8 Production of IL-66 21 by DCs and by the B cells at a later stage are important for the maintenance of the 67 terminal differentiation of Tfh cells⁹ which highly express IL-21R in GCs.¹⁰ Furthermore, 68 the interactions between Tfh cells and B cells supply survival and selection signals, 69 among which IL-21 and CD40L are prominent molecules for the Tfh activity inducing 70 efficient terminal differentiation of B cells.¹¹ 71

Within the follicles, regulatory mechanisms operate to prevent the emergence of autoreactivities, while allowing the selection of high-affinity Ab-producing cells. The control of Tfh cell development and Tfh cell functions now appears to be significant for the restriction of aberrant Ab responses,^{12,13} with the possible implication of a recently described but not yet fully characterized subpopulation of T cells called follicular

regulatory T (Tfr) cells.¹⁴ Regulatory B (Breg) cells correspond to B lymphocytes that 77 78 restrain the development of immune responses. Their depletion or defective activity skew T cell differentiation into Th1 and Th17 subsets, associated with worsened autoimmune 79 disorders.^{15,16} Following activation of CD40 and TLR9, human B cells can acquire 80 regulatory activities suppressing cellular immune responses.¹⁷⁻¹⁹ Whether human Breg 81 cells can affect the humoral response has never been evaluated. We elaborated an *in vitro* 82 model of human Tfh cell differentiation and a co-culture system to measure the Tfh cell 83 functions on B cell terminal differentiation. The presence of Breg cells alters the 84 development and further suppress the functions of Tfh cells, repressing the humoral 85 response. We conclude that impaired Breg controls in vivo may impact the Tfh-dependent 86 restriction of humoral responses and may lead to the development of aberrant 87 autoimmune responses. 88

90 METHODS

Isolation of cells. T and B lymphocytes were purified from children tonsils after routine tonsillectomy and from splenic tissue after splenectomy from healthy individual. Ethical approval was provided by the Institutional Review Board of the Brest University Hospital. Cell suspensions were isolated by Ficoll-Hypaque centrifugation, and T cells and B cells purified by negative selection with T cell and B cell enrichment kits (StemCell Technologies) according to the manufacturer's instructions. Preparations in all experiments were >98% pure, and in the figures, relate to different donors.

In some experiments, naïve and memory B and CD4⁺ T cells were purified by negative selection kits (Stem Cell Technologies), and CXCR5^{high} PD-1^{high} and CXCR5⁻ PD-1⁻ CD4⁺ T cells were sorted using a MoFlo XDP flow cytometer (Beckman Coulter).

Stimulation of T and B cells. T cells were seeded at $2x10^5$ cell/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2mM L-glutamine (Invitrogen Life Technologies), 200 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (RPMI-1640 complete medium). They were polyclonally stimulated with 1µg/ml anti-CD3 and anti-CD28 mAbs¹ on anti-mouse IgG-Fc coated 96-well plates in the presence of 10ng/ml IL-12 and IL-21 (ImmunoTools) for up to 5 days.

B cells were seeded at 5×10^5 cell/ml on 5×10^5 mitomycin C-treated NIH-3T3 fibroblasts transfected with human *CD40L* gene and in the presence of 0.25µM CpG-ODN 2006 (Caylo-InvivoGen). They were stimulated for 3 days in 24-well plates in RPMI-1640 complete medium to induce their differentiation into Breg cells.^{2,3} 111 **Co-culture assays.** Breg cells were added to T cells at the onset of their activation at 1:1 112 ratio, and the Tfh cell development analyzed by flow cytometry. For the blocking experiments, 113 10μ g/ml anti-CD40L (R&D Systems), anti-PDL1 (eBioscience), anti-CD80 (ImmunoTools), 114 anti-CD86 (ImmunoTools), anti-ICAM, anti-IL-10R α and anti-IL-10R β or anti-TGF β (R&D 115 Systems) Abs were added at the onset of the co-cultures.

116 $1x10^5$ Tfh cells were added to non-stimulated B cells at a 1:1 ratio for 6 days in RPMI-117 1640 complete medium. The terminal differentiation of B cells into Ab-producing cells and 118 memory B cells was evaluated by flow cytometry and ELISA. Breg cells were added at a 1:1:1 119 ratio. For the experiments in Transwells, Tfh and non-stimulated B cells were co-cultured in the 120 lower chamber, and Breg cells added in the upper chamber.

121 Flow cytometry. Cells were analyzed at the onset (Day 0) and up to 5 or 6 days of cultures. All conjugated mAbs were purchased from Beckman Coulter unless otherwise 122 indicated. We used FITC-anti-CXCR5 (BD Biosciences), PE-anti-ICOS, ECD-, PE-Cy7-or 123 APC-anti-CD19, PE-Cy5- or PE-Cy7-anti-CD4, and PE-Cy7-anti-PD-1; FITC-anti-CD71, 124 CD80, ICAM, IgD (BD Biosciences), FITC- or PE-Cy7-anti-CD5, PE-anti-CD27, CD40, CD73 125 (BD Biosciences), CD86, CD138, PDL-1, ICOSL (BD Biosciences), IL21R (BD Biosciences), 126 PE-Cy5.5-anti-CD25 mAbs. For intracellular stainings, cells were permeabilized using the 127 cytofix/cytoperm permeabilization kit (BD Biosciences) and incubated with FITC-anti-Bcl-6 128 (Abcam), IL-10, TGFB (R&D Systems), PE-anti-IL-21 or Foxp3 (BD Biosciences) Abs 129 according to the manufacturer's instruction. 130

ELISA. ELISA microtiter plates were coated overnight with 10μg/ml anti-IgM, anti-IgA
 (Jackson Immunoresearch) or anti-IgG (Dakopatts) Abs and blocked with 3% BSA for 2 hours at

37°C. After 3 washes in PBS, 100µl of 1/100 diluted supernatants was added and incubated for 1
hour at 37°C. Incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-IgM, -IgG or -IgA Abs
(Dakopatts) was then performed for a further 1 hour at room temperature, followed by incubation
with OPD as substrate. After addition of sulfuric acid to stop the colorimetric reaction,
absorbance was measured at 492nm. PBS and RPMI-1640 complete medium were used as
negative controls.

IL-10 and TGFβ in the supernatants of cultured and co-cultured cells were measured with
 commercial kits from Beckman Coulter and R&D Systems, respectively. RPMI1640 complete
 medium was used as negative control.

142 Statistical analysis. Data were expressed as mean±SEM. Statistical analyses were 143 performed with Prism4 Graphpad Software. Comparisons were performed with the Wilcoxon 144 test and Mann-Whitney test for paired and unpaired data, respectively. p<0.05 was considered as 145 significant.

147 **RESULTS**

148 In vitro differentiation of human follicular helper T cells.

To establish our model, T cells were polyclonally stimulated with anti-CD3 and 149 anti-CD28 Abs in the presence of IL-12 and IL-21 (Fig E1, A), leading to the appearance 150 of Bcl-6^{high} IL-21^{high} CXCR5^{high} ICOS^{high} PD-1^{high} CD4⁺ T cells with up-regulation of all 151 markers and the concomitant increased frequencies of positive T cells (Fig E2, A). This 152 induction concerned mainly the naïve population (Fig E2, B) and was specific to the 153 $CD4^+$ T cells (Fig E3, A), leading to a Th2 cytokine profile of $\alpha\beta$ + T cells (Fig E3, B, C). 154 Tfh-induced T cells were added to non-stimulated B cells (Fig E1, A). The frequencies of 155 $CD138^+$ plasma cells and IgD⁻CD27⁺ memory B cells were up-regulated (Fig E2, C), and 156 increased concentration of IgM, IgG and IgA were secreted (Fig E2, D) which were 157 mainly dependent on the response of memory B cells (Fig E3, D). These experiments 158 demonstrate that in vitro-differentiated human Tfh cells acquire efficient functional 159 properties triggering the terminal differentiation of B cells into Ab-secreting cells. 160

161 Inhibitory effect of Breg cells on Tfh cell development.

To evaluate the role of Breg cells, committed Bregs were added at the onset of T cell differentiation (Fig E1, *B*). The induction of the Tfh markers was not observed, percentages of Bcl-6, IL-21, CXCR5, ICOS and PD-1 positive T cells remained significantly lowered, and the MFIs of the markers were not up-regulated (Fig 1, *A*). In the presence of non-stimulated B cells the Tfh cell maturation occurred as in the absence of B cells, percentages of all markers were not affected, and the differentiation into Bcl-

6^{high} IL-21^{high} CXCR5^{high} ICOS^{high} and PD-1^{high} T cells occurred (Fig 1, *B*). These findings 168 169 indicate that only regulatory committed B cells can control Tfh maturation, which is mainly directed to the naïve $CD4^+$ T cells (Fig1, C). The suppressive potential of Breg 170 cells is mainly acquired by naïve B cells (Fig E4, A, B), and is also efficient on Tfh cells 171 differentiated from splenic $CD4^+$ T cells (Fig E4, C), suggesting a general 172 immunoregulatory mechanism. When Breg cells were added on CD4⁺ differentiated Tfh 173 cells, the expression of all markers were slightly affected, and their MFIs were not 174 diminished (Fig 1, D), indicating that the development of fully differentiated Tfh cells 175 176 can not be reversed by Breg cells.

177 Mechanisms of B cell regulation on Tfh development.

178 Importance of cell contacts and soluble factors.

CD4⁺ T cells were stimulated in the lower chamber of Transwell systems (Fig E1, 179 C), with Breg cells added in the upper chamber (Fig 2, A). The Breg-induced decreased 180 percentages of Bcl-6, ICOS and PD-1 positive T cells were not observed, while the 181 down-regulated percentages of IL-21 and to a lesser extent of CXCR5 positive T cells 182 persisted (Fig 2, A). In the supernatant of Breg cells (Fig E1, C), the percentages of IL-21 183 and to a lesser extent CXCR5 positive T cells were diminished (Fig 2, B). In contrast, 184 percentages of Bcl-6, ICOS and PD-1 positive T cells remained elevated (Fig 2, C). 185 These data indicate that the regulation of Bcl-6, ICOS and PD-1 depends on cellular 186 contacts and that soluble factors are involved in the control of IL-21 expression, whereas 187

modulation of CXCR5 likely requires synergetic effects of soluble factors and cell-to-cellcontacts.

190 *The molecules involved*.

Beyond the previous phenotype,¹⁷⁻¹⁹ frequencies of PDL-1⁺, IL-21R⁺, CD5⁺, IL-10⁺ 191 and $TGF\beta^+$ B cells were increased in Breg-committed cells and persisted in co-culture 192 with T cells (Fig E5, A), and $CD5^+$ Breg cells were mostly $CD25^+$, $CD71^{+/-}$ and $CD73^-$ 193 (Fig E5, *B*). To determine the molecules involved in the Breg control, blocking Abs were 194 used in co-cultures (Fig E1, D). The expression of Bcl-6, ICOS and PD-1 was maintained 195 (Fig 2, D) indicating the participation of CD40L, CD80, CD86 and ICAM. Anti-PDL-1 196 blocking Ab incompletely preserved the population of Bcl-6 positive T cells, suggesting 197 that PD-1/PDL-1 interaction may be partially involved in the control of Bcl-6 expression. 198

The blockade of IL-10R or of TGF β prevented the decrease in percentages of IL-21positive T cells, whilst CXCR5 expression was preserved only after IL-10R blocking (Fig 2, *E*). All together, IL-10 and TGF β are Breg-derived cytokines involved in the regulation of IL-21 and CXCR5, and of IL-21, respectively.

203 Suppressive activity of Breg cells on Tfh functions.

Tfh-differentiated cells and non-stimulated B cells were co-cultured for 6 days, in the presence of Breg cells (Fig E1, *E*). The gradual generation of CD138⁺ plasma cells and IgD⁻CD27⁺ memory B cells did not occur, and the terminal Tfh-dependent increased percentages were down-regulated (Fig 3, *A*). Furthermore, the Tfh-induced production of IgM, IgG, and IgA were inhibited (Fig 3, *B*). This inhibition can be directed to the Ig production induced by the Tfh-differentiated naïve and memory T cells (Fig 3, *C*), and is mainly directed to the memory B cells (Fig E3, *D*). The suppressive capacity is supported by naïve as well as memory B cells committed into Breg cells (Fig E4, *D*).

212 Mechanisms of B cell regulation on Tfh functions.

213 Importance of cell contacts.

Tfh cells and non-stimulated B cells were co-cultured in the lower chamber of the 214 Transwell systems for 6 days, with the Breg cells in the upper chamber (Fig E1, F). The 215 production of IgM, IgG and IgA were recovered (Fig 3, B). These results substantiate the 216 requirement of direct cell contacts to suppress the Tfh-dependent terminal differentiation 217 of B cells into Ab-secreting cells. These effects rely on the control of IL-21R. Its induced 218 expression on Tfh cells, required for the maintenance of their differentiation⁹, and its Tfh-219 dependent induction on non-stimulated B cells, required for their terminal 220 differentiation¹¹, were inhibited in the presence of Breg cells (Fig 4, A). 221

222 Induction of follicular regulatory T cells.

The percentages of Foxp3-positive T cells (Fig E1, *E*) within the CXCR5⁺ PD-1⁺ CD4⁺ T cells were up-regulated in the presence of Breg cells, whilst the minor Foxp3positive population within the CXCR5⁻ PD-1⁻ CD4⁺ T cells was not (Fig 4, *B*). These data indicate that Breg cells specifically increase the proportion of Tfr cells known to control the Tfh-dependent humoral response.²⁰

228 Tfh with non-stimulated B cells but also Breg cells produced TGF β , the levels of 229 which were not increased in the co-cultures (Fig 4, *C*). In contrast, the levels of IL-10Breg cells were strikingly increased. Using anti-TGF β blocking Abs, but not anti-IL-10R blocking Abs, the frequencies of Foxp3-positive T cells within the CXCR5⁺ PD-1⁺ CD4⁺ T cells were diminished (Fig 4, *D*). Moreover, Transwell experiments showed that cellcontacts were also necessary for the induction of Tfr cells (Fig4, *D*).

234 Inhibitory effect of Breg cells on in vivo purified Tfh cells.

CXCR5^{high} PD-1^{high} CD4⁺ and CXCR5⁻ PD-1⁻ CD4⁺ tonsillar T cells were sorted 235 (Fig E6, A), polyclonally stimulated to mimic antigenic stimulation and co-cultured (Fig 236 E6. B). CXCR5^{high} PD-1^{high} CD4⁺ Tfh cells were functional inducing higher secretions of 237 IgM, IgG and IgA than the CXCR5⁻ PD-1⁻ CD4⁺ non-Tfh cells (Fig 5, A). In the presence 238 of Breg cells, Ig, secretions were down-regulated. Phenotypically in vivo-differentiated 239 The cell markers slightly decreased in the presence of Breg cells (Fig 5, B), but the 240 percentages of positive T cells were down-regulated (Fig 5, C). Neither the phenotype 241 nor the frequency of CXCR5⁻ PD-1⁻ CD4⁺ non-Tfh cells were affected by the addition of 242 Breg cells (Fig 5, B and C). Finally, the frequency of in vivo-differentiated Foxp3-243 positive cells within the CXCR5^{high} PD-1^{high} sorted Tfh cell population, but not within the 244 CXCR5⁻ PD-1⁻ sorted non-Tfh cells, increased by the Breg cells (Fig 5, D). All these data 245 demonstrate that *in vivo* Tfh cells are sensitive to the suppressive activity of Breg cells, 246 and that *in vivo* Tfr cells are receptive to and their proportion increase in response to the 247 Breg signals. 248
250 **DISCUSSION**

We characterize cooperative functions for IL-12 and IL-21 to induce *in vitro* human Tfh cell differentiation. These differentiated Tfh cells were functional helping human B cells to differentiate into plasma and memory B cells allowing the secretion of Igs. Our study supplements the great diversity of signals that generate efficient Tfh cells.²¹⁻²⁸

Moreover, we showed for the first time that human Breg cells can present negative 255 effects on humoral immune responses towards the development and the functions of Tfh 256 cells. Stimulation with CD40 and TLR9 was prerequisite, as non-stimulated B cells that 257 may contained in vivo pre-conditioned Bregs, were unable to affect the Tfh cells in co-258 cultures. These committed Breg cells down-regulated the Tfh specific markers on 259 tonsillar and splenic differentiated T cells, mainly originated from naïve CD4⁺ T cells. A 260 decreased frequency using *in vivo* sorted Tfh cells was also observed. In the follicles, the 261 maturation into Tfh cells occurs in the T cell zone and at the T cell:B cell border of GCs. 262 Hence, Breg cells have the capacity to inhibit the Tfh development within secondary 263 lymphoid tissues. CD40+TLR9 stimulation up-regulated the CXCR5 expression on Breg 264 surface (Fig E5, C), suggesting that Breg can also migrate within GCs to control Tfh 265 functions. Thus, Breg, derived from naïve or memory B cells, inhibited the terminal 266 differentiation of B cells and the associated secretion of Igs induced by in vitro- as well 267 as *in vivo*- differentiated Tfh cells, originated either from naïve or memory CD4⁺ T cells. 268 The recent description of the CD25⁺ Bcl6^{low} CXCR5⁺PD-1⁺ CD4⁺ Tfh cells that interact 269 with the B cells to support their terminal differentiation in the GC of human tonsils,²⁹ 270

suggests that the suppressive effect of the Bregs might be preferentially directed to this Tfh subpopulation. We have previously shown that human Breg cells modulate the growth of the cellular immune response.^{17,19} Our current study further demonstrates the ability of human Breg cells to inflect humoral immune responses through the control of the maturation and the functions of Tfh cells.

Two groups of B cells have been identified with different regulatory potential in 276 murine models.^{30,31} In human, CD24^{hi} CD38^{hi} CD5⁺ B cells.^{17,18} CD24^{hi} CD27⁺ B cells.³² 277 but also CD25⁺ CD71⁺ CD73⁻ B cells,³³ were associated with suppressive effects. In our 278 study, Bregs are CD19^{hi} IgD⁺ CD27⁻ CD38^{hi} CD24^{hi} CD40^{hi} CD80^{hi} CD86^{hi} CD5⁺ CD25⁺ 279 CD71^{+/-} CD73⁻ PDL-1⁺ ICAM-1⁺ ICOS-L⁺ and IL-21R⁺. This alternative phenotype 280 suggests a plasticity of Breg cells to maintain appropriate contacts with the target cells. 281 The intercellular contacts with T cells,¹⁷ DCs,¹⁹ or Tfh cells likely alter the expression of 282 cell surface molecules on the Breg population to settle adapted suppressive capacities. 283

IL-10 and TGFβ play an important role in the inhibitory function of Breg cells.³¹⁻³⁶ 284 Our experiments demonstrate that they are also essential to modulate the IL-21 and 285 CXCR5 expressions on Tfh cells. Tfr cells that are distinct Treg cells located in 286 GCs,^{14,20,37,38} are identified as CXCR5^{hi} PD-1^{hi} Foxp3⁺ CD4⁺ T cells.³⁸ In mice, they exert 287 an IL-10- and TGF_β-dependent inhibitory effect on GC-located Tfh cells and on the 288 humoral B cell response. Our study suggests a Breg-dependent increase of Tfr cell 289 proportion that likely participate to the restriction of the Tfh terminal differentiation and 290 functions reducing the humoral response in humans, with a preponderant role ascribed to 291

²⁹² TGF β . Transwell experiments indicate also the requirement of cellular interaction, which ²⁹³ is consistent with the role assigned to TGF β and cell surface CTLA-4 in the regulation of ²⁹⁴ the humoral response.³⁹ However, it is still unclear how these cells operate. Tfr cells ²⁹⁵ could directly act on B cells⁴⁰ while Breg cells could also directly modulate Tfh cell ²⁹⁶ functions. These options remain to be explored.

Finally, we observed the induction of IL-21R on Tfh cells and its Tfh-mediated induction on B cells as expected.^{9,10,41} The Breg-mediated reduction arises as an additional negative feedback to regulate the Tfh-dependent GC responses. In this context, the maturation of B cells secreting IL-10 requires IL-21 and CD40.^{42,43} The high density level of IL-21R observed on the Breg cells might explain their prominent sensitivity to regulate the Tfh cells and the associated humoral responses.

In conclusion, it becomes clear that the proportion of Tfh cells relative to the neighbouring Tfr and Breg cells will influence the balance modulating the humoral responses and tolerance achievement. It is noteworthy that abnormal functions of Tfh cells cause deleterious effects and trigger autoimmunity.⁴⁴⁻⁴⁹ A better understanding of human Tfh, Tfr and Breg inter-relations is worthy of pursuit to elaborate new therapeutic strategies specifically in autoimmune disorders in which suppressive Breg functions are lacking.

310 ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Clinique Pasteur for the provision of tonsils. Thanks are also due to Simone Forest and Geneviève Michel for their secretarial assistance.

- 313 This work has been carried out thanks to the support of the Labex IGO project (n°
- ANR-11-LABX-0016-01) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government
- ³¹⁵ program, managed by the French National Research Agency (ANR).

317 **REFERENCES**

318	1.	Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R,
319		Nussenzweig MC. Identification of human germinal center light and dark zone
320		cells and their relationship to human B-cell lymphomas. Blood 2012;120:2240-8.
321	2.	Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R. Control systems and
322		decision making for antibody production. Nat Immunol 2010;11:681-8.
323	3.	Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu Rev Immunol 2011;29:621-
324		63.
325	4.	Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, et al.
326		Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. Science
327		2009;325:1001-5.
328	5.	Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, et
329		al. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T
330		follicular helper-like cells through interleukin-12. Immunity 2009;31:158-69.
331	6.	Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, et al. ICOS
332		receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via
333		induction of the transcriptional repressor Bcl6. Immunity 2011;34:932-46.
334	7.	Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in
335		antibody responses and autoimmunity. Nat Rev Immunol 2005;5:853-65.

336	8.	Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, et al. The transcriptional
337		repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. Immunity
338		2009;31:457-68.
339	9.	Vinuesa CG, Cyster JG. How T cells earn the follicular rite of passage. Immunity
340		2011;35:671-80.
341	10.	Rasheed AU, Rahn HP, Sallusto F, Lipp M, Muller G. Follicular B helper T cell
342		activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of
343		CD57 expression. Eur J Immunol 2006;36:1892-903.
344	11.	Vinuesa CG, Linterman MA, Goodnow CC, Randall KL. T cells and follicular
345		dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. Immunol Rev
346		2010;237:72-89.
347	12.	Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation
348		of T follicular helper cells. J Exp Med 2012;209:1241-53.
349	13.	Cyster JG. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. Nat Immunol
350		2010;11:989-96.
351	14.	Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular
352		regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions.
353		Nat Med 2011;17:983-8.

354	15.	Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. Annu Rev Immunol
355		2012;30:221-41.
356	16.	Carter NA, Rosser EC, Mauri C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for
357		the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and
358		reduction of collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 2012;14:R32.
359	17.	Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own
360		regulation through activation of B cells. J Autoimmun 2011;36:228-38.
361	18.	Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR,
362		et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy
363		individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus
364		patients. Immunity 2010;32:129-40.
365	19.	Morva A, Lemoine S, Achour A, Pers JO, Youinou P, Jamin C. Maturation and
366		function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. Blood
367		2012;119:106-14.

20. Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernandez A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, et al.

Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells.

J Immunol 2011;187:4553-60.

371	21.	Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, et al. Early
372		commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell
373		lineage is induced by IL-12. Immunol Cell Biol 2009;87:590-600.
374	22.	Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and
375		IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce
376		optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. PLoS One
377		2011;6:e17739.
378	23.	Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-
379		21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-
380		secreting plasma cells. J Immunol 2005;175:7867-79.
381	24.	Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL-21 in regulating B-cell function
382		in health and disease. Immunol Rev 2008;223:60-86.
383	25.	Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Yokote K, et al.
384		Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. J Exp Med
385		2008;205:1369-79.
386	26.	Dienz O, Eaton SM, Bond JP, Neveu W, Moquin D, Noubade R, et al. The
387		induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced
388		by CD4+ T cells. J Exp Med 2009;206:69-78.

27.	Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, et al. Cytokine-
	mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells:
	predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. J
	Immunol 2007;179:8180-90.
28.	Batten M, Ramamoorthi N, Kljavin NM, Ma CS, Cox JH, Dengler HS, et al. IL-27
	supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function
	of T follicular helper cells. J Exp Med 2010;207:2895-906.
29.	Li H, Pauza CD. CD25(+) Bcl6(low) T follicular helper cells provide help to
	maturing B cells in germinal centers of human tonsil. Eur J Immunol 2015;45:298-
	308.
30.	Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ,
30.	Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in
30.	Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J Immunol 2007;178:7868-78.
30. 31.	Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J Immunol 2007;178:7868-78. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory
30. 31.	Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J Immunol 2007;178:7868-78. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent
30.	 Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J Immunol 2007;178:7868-78. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. Immunity 2008;28:639-50.
30.31.32.	 Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J Immunol 2007;178:7868-78. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. Immunity 2008;28:639-50. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al.
30.31.32.	 Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J Immunol 2007;178:7868-78. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. Immunity 2008;28:639-50. 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
	28. 29.

408	33.	van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Sollner S, Akdis DG, et al.
409		IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that
410		suppress antigen-specific immune responses. J Allergy Clin Immunol
411		2013;131:1204-12.
412	34.	DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance
413		immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. Ann N Y
414		Acad Sci 2010;1183:38-57.
415	35.	Jamin C, Morva A, Lemoine S, Daridon C, de Mendoza AR, Youinou P.
416		Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. Arthritis
417		Rheum 2008;58:1900-6.
418	36.	Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells
419		inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. J
420		Clin Invest 2008;118:3420-30.
421	37.	Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T
422		cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. J
423		Clin Invest 2004;114:1640-9.
424	38.	Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al.
425		Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. Nat Med
426		2011;17:975-82.

39.	Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of
	B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. J Immunol 2005;175:4180-3.
40.	Iikuni N, Lourenco EV, Hahn BH, La Cava A. Cutting edge: Regulatory T cells
	directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. J Immunol
	2009;183:1518-22.
41.	Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of human B cell behavior and
	amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. J
	Immunol 2006;177:5236-47.
42.	Yang X, Yang J, Chu Y, Wang J, Guan M, Zhu X, et al. T follicular helper cells
	mediate expansion of regulatory B cells via IL-21 in Lupus-prone MRL/lpr mice.
	PLoS One 2013;8:e62855.
43.	Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI,
	et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent
	cognate interactions. Nature 2012;491:264-8.
44.	Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, et al. A
	RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T
	cells and autoimmunity. Nature 2005;435:452-8.
	 39. 40. 41. 42. 43. 44.

444	45.	Subramanian S, Tus K, Li QZ, Wang A, Tian XH, Zhou J, et al. A Tlr7
445		translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. Proc Natl Acad
446		Sci U S A 2006;103:9970-5.
447	46.	Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med
448		2008;358:929-39.
449	47.	Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, Yu D, Brink R, Cannons JL, et al. Follicular
450		helper T cells are required for systemic autoimmunity. J Exp Med 2009;206:561-
451		76.
452	48.	Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, et al.
453		Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed
454		phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus.
455		Arthritis Rheum 2010;62:234-44.
456	49.	Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et
457		al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells
458		and contain specific subsets that differentially support antibody secretion.
459		Immunity 2011;34:108-21.
460		

461 FIGURES



463FIG 1.Breg cells inhibit Tfhcell development but not differentiated T cells.464Expression of Tfh markers on CD4-positive stimulated T cells co-cultured465with Breg cells (A) or non-stimulated B cells (B). C, Percentage of cells466from purified CD4⁺ T cells. D, Expression of all markers on already467differentiated Tfh cells co-cultured with Breg cells *P<0.05; **P<0.01.468Mean±SEM of 6 experiments.



470FIG 2.Characterization of Breg suppressive activity on Tfh development.471Expression and percentages at day 5 (A) of Tfh markers on stimulated T472cells co-cultured in a Transwell (TW) system. Time course (B) and473percentages (C) with Breg cells or their supernatant (spt). Percentages (D, E)474after co-culture with blocking antibodies. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.475Mean±SEM of 6 experiments.

Figure 3



477FIG 3.Breg cells suppress Tfh cell function. Frequencies of $CD138^+CD19^+$ 478plasma cells and $CD19^+IgD^-CD27^+$ memory B cells during co-cultures of B479and Tfh cells with Breg cells (A). Concentration of Igs in the supernatants480(B) and after co-cultures with Tfh cells from purified naïve and memory T481cells (C). TW: Transwell system *P<0.05; **P<0.01. Mean±SEM of 6</td>482experiments.



484FIG 4.Characterization of Breg suppressive effects on Tfh cell function. A, IL-48521R expression on T cells and on B cells. B, Percentages of Foxp3-positive486T cells. C, Secretion of TGFβ and IL-10. D, Percentages of Foxp3-positive T487cells within the CXCR5⁺PD-1⁺ T cells after co-culture with blocking488antibodies or in Transwell (TW) system. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.</td>489Mean±SEM of 6 experiments.

Figure 5





492FIG 5.Breg cells suppress the function of *in vivo* differentiated T cells. A,493Concentration of Igs after co-cultures of B cells with *in vivo*-differentiated494CXCR5highPD-1high Tfh cells or CXCR5-PD-1- T cells and Breg cells. B,495C, Expression of Tfh markers on sorted T cells after co-cultures. D,496Percentages of Foxp3-positive T cells within the sorted T cells after co-497cultures. *P<0.05; **P<0.01. Mean±SEM of 6 experiments.</td>

499 SUPPLEMENTARY DATA



500

501 **Fig E1: Experimental schemes.** Description of experiments from the Figure E2 (A), Figure

502 1 (**B**), Figure 2 (**C**, **D**), Figure 3 (**E**, **F**) and Figure 4 (**E**).



Fig E2: Maturation of T cells into functional follicular helper T cells. A, Representative example of the expression of Tfh markers on CD4-positive stimulated T cells, MFI and percentages of CD4-positive T cells. B, Percentage of positive T cells from purified naïve and memory CD4+ T cells. C, Gating strategy and Percentages of CD138+CD19+ plasma cells and CD19+IgD-CD27+ memory B cells after co-culture of B cells with Tfhdifferentiated T cells. D, Concentration of IgM, IgG and IgA secreted in the supernatants of co-cultures *P<0.05; **P<0.001. Mean±SEM of 6 experiments.



512

Fig E3: A, CD4-negative T cells do not differentiate into follicular helper T cells. 513 Representative example of the expression ot Tfh markers on CD4-negative T cells 514 polyclonally stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of IL-12 and IL-515 21. B, $\gamma/\delta TCR$ and $\alpha/\beta TCR$ expression on tonsillar T cells. Cells were stained at day 0 516 with FITC-anti-γ/δTCR, PE-anti-α/βTCR, APC-AF750-anti-CD3 and PB-anti-CD4 and 517 analyzed on Navios Flow cytometer. C, Cytokine profile of in vitro differentiated 518 follicular helper T cells. Concentration of Th1 (IFN γ , TNF α) and Th2 (IL-10, IL-6, IL-4) 519 520 cytokines in the supernatant of tonsillar T cells stimulated for 5 days with anti-CD3 and anti-CD28 Abs with or without IL-12 and IL-21 measured using commercial kits (Beckman 521 Coulter). D, Tfh cells require the presence of memory B cells to acquire efficient 522 functional properties. Tonsillar CD4+ T cells were stimulated with anti-CD3 and anti-523 CD28 Abs in the presence of IL-12 and IL-21 for 3 days. These differentiated Tfh cells were 524 co-cultured for 6 days with purified naïve or memory B cells. Concentration of IgM, IgG and 525 IgA secreted in the supernatants. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Mean±SEM of 6 526 experiments. 527



Fig E4: Efficiency of Breg cells. A. Experimental scheme of co-culture experiments of 530 tonsillar T cells with sorted naïve B cells or memory B cells committed into Breg cells. 531 B, The differentiation of tonsillar CD4-positive T cells into CXCR5high PD1high Bcl-532 6high T cells is mainly inhibited by the naïve B cells committed into Breg cells. C, The 533 differentiation of splenic CD4-positive T cells into Tfh cells is inhibited by splenic B 534 cells committed into Bregs. Representative example of the expression of Tfh markers on 535 CD4-positive T cells isolated from spleen and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 536 Abs in the presence of IL-12 and IL-21 with or without Breg cells. **D**, The function of Tfh 537 cells is inhibited by naïve as well as memory B cells committed into Breg cells. 538 Concentration of IgM, IgG and IgA in the supernatants after co-cultures with Breg cells 539 from sorted naïve and memory B cells. *P<0.05. Mean±SEM of 6 experiments. 540



Fig E5: Phenotype of CD19-positive B cells. A, Phenotypic analysis before stimulation,
after TLR9+CD40 stimulation for the differentiation into Breg, and after co-culture with
T cells. B, Frequencies of CD5, CD25, CD71 and CD73 expression on the CD19+ B cells
after TLR9+CD40 stimulation (Breg cells) and after co-culture (Cocultured B cells). C,
Expression of CXCR5 on B cells stained with FITC-anti-CXCR5 and ECD-anti-CD19
Abs before (Resting B cells) and after 3 days of TLR9+CD40 stimulation (Breg cells).



Fig E6: Breg cells suppress the function of *in vivo* **differentiated T cells. A,** Strategy for the sorting of *in vivo* differentiated CXCR5hiPD-1hi and CXCR5-PD-1- CD4-positive T cells. **B,** Experimental scheme of co-culture experiments of sorted T cells and B cells with or without Breg cells.

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Rapport projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010 <u>http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2010/rapport_projections_n</u> <u>ationales_cancer_2010.pdf</u>. 2010.
- 2. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. American Journal of Hematology, 2013. **88**(9): p. 803-816. DOI: 10.1002/ajh.23491.
- 3. Eichhorst B, Hallek M, Dreyling M, and Grp EGW. *Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology, 2010. **21**: p. v162-v164. DOI: 10.1093/annonc/mdq180.
- 4. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, Buske C, and Comm EG. *Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up(aEuro)*. Annals of Oncology, 2015. **26**: p. V78-V84. DOI: 10.1093/annonc/mdv303.
- Silver RT, Sawitsky A, Rai K, Holland JF, and Glidewell O. *Guidelines for protocol studies in chronic lymphocytic-leukemia*. American Journal of Hematology, 1978. 4(4): p. 343-358. DOI: 10.1002/ajh.2830040406.
- 6. Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA, Oken MM, Keating MJ, Boldt DH, Kempin SJ, and Foon KA. *Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic-leukemia recommendations of the national-cancer-institute-sponsored-working-group*. American Journal of Hematology, 1988. **29**(3): p. 152-163. DOI: 10.1002/ajh.2830290307.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, Obrien S, and Rai KR. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. Blood, 1996. 87(12): p. 4990-4997.
- 8. Hallek. 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 (vol 111, pg 5446,2008). Blood, 2008. **112**(13): p. 5259-5259.
- 9. Pers JO, Berthou C, Porakishvili N, Burdjanadze M, Le Calvez G, Abgrall JF, Lydyard PM, Youinou P, and Jamin C. *CD5-induced apoptosis of B cells in some patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2002. **16**(1): p. 44-52. DOI: 10.1038/sj.leu.2402327.
- 10. Matutes E, Owusuankomah K, Morilla R, Marco JG, Houlihan A, Que TH, and Catovsky D. *The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL*. Leukemia, 1994. **8**(10): p. 1640-1645.
- 11. Moreau EJ, Matutes E, Ahern RP, Morilla AM, Morilla RM, OwusuAnkomah KA, Seon BK, and Catovsky D. *Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b)*. American Journal of Clinical Pathology, 1997. **108**(4): p. 378-382.

- Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, and Gunnarsson R. *Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand?* Leukemia & Lymphoma, 2013. 54(11): p. 2351-2364. DOI: 10.3109/10428194.2013.783913.
- 13. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, and Pasternack BS. *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1975. **46**(2): p. 219-34.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, and Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic-leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer, 1981. 48(1): p. 198-206. DOI: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1<198::aid-cncr2820480131>3.0.co;2-v.
- 15. Molica S and Alberti A. *Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic-leukemia*. Cancer, 1987. **60**(11): p. 2712-2716. DOI: 10.1002/1097-0142(19871201)60:11<2712::aid-cncr2820601122>3.0.co;2-1.
- 16. Montserrat E, Sanchezbisono J, Vinolas N, and Rozman C. *Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic-leukemia analysis of its prognostic-significance*. British Journal of Haematology, 1986. **62**(3): p. 567-575. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1986.tb02969.x.
- 17. Axdorph U, Nilsson BI, Nilsson BR, and Bjorkholm M. *Leukocyte doubling time is a useful predictor of progression-free survival in chronic lymphocytic-leukemia*. Journal of Internal Medicine, 1995. **237**(2): p. 205-209.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, and Lichter P. *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. New England Journal of Medicine, 2000. **343**(26): p. 1910-1916. DOI: 10.1056/nejm200012283432602.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, and Chiorazzi N. *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1840-1847.
- 20. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, and Oscier DG. *CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease*. Blood, 2002. **99**(3): p. 1023-1029. DOI: 10.1182/blood.V99.3.1023.
- 21. Thunberg U, Tobin G, Johnson A, Thorn I, Soderberg A, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sallstrom J, Sundstrom C, Roos G, and Rosenquist R. *Somatically mutated Ig VH3-*21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia with poor prognosis. Blood, 2001. **98**(11): p. 287B-287B.

- 22. Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, II, Rassenti LZ, Keating MJ, Wierda WG, Gribben JG, Brown JR, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves AW, and Kipps TJ. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. Blood, 2008. **111**(10): p. 5101-5108. DOI: 10.1182/blood-2007-12-130229.
- 23. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, Foa R, Damle RN, Fais F, Messmer D, Rai KR, Ferrarini M, and Chiorazzi N. *Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia*. Journal of Experimental Medicine, 2004. **200**(4): p. 519-525. DOI: 10.1084/jem.20040544.
- 24. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, Laoutaris N, Karlsson K, Baran-Marzsak F, Tsaftaris A, Moreno C, Anagnostopoulos A, Caligaris-Cappio F, Vaur D, Ouzounis C, Belessi C, Ghia P, Davi F, Rosenquist R, and Stamatopoulos K. *Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis.* Blood, 2008. **111**(3): p. 1524-1533. DOI: 10.1182/blood-2007-07-099564.
- 25. Rosen A, Murray F, Evaldsson C, and Rosenquist R. *Antigens in chronic lymphocytic leukemia-Implications for cell origin and leukemogenesis*. Seminars in Cancer Biology, 2010. **20**(6): p. 400-409. DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.09.004.
- 26. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, Dohner H, and Stilgenbauer S. *V-H mutation status*, *CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1410-1416.
- 27. Fitchett M, Griffiths MJ, Oscier DG, Johnson S, and Seabright M. *Chromosome-abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 1987. **24**(1): p. 143-150. DOI: 10.1016/0165-4608(87)90091-4.
- 28. Hernandez JA, Rodriguez AE, Gonzalez M, Benito R, Fontanillo C, Sancloval V, Romero M, Martin-Nunez G, de Coca AG, Fisac R, Galende J, Recio I, Ortuno F, Garcia JL, de las Rivas J, Gutierrez NC, Miguel JFS, and Hernandez JM. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. Haematologica-the Hematology Journal, 2009. 94(3): p. 364-371. DOI: 10.3324/haematol.13862.
- 29. Orlandi EM, Bernasconi P, Pascutto C, Giardini I, Cavigliano PM, Boni M, Zibellini S, and Cazzola M. *Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH*. Hematological Oncology, 2013. **31**(3): p. 136-142. DOI: 10.1002/hon.2032.
- 30. Dong JT, Boyd JC, and Frierson HF. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. Prostate, 2001. **49**(3): p. 166-171. DOI: 10.1002/pros.1131.

- 31. Elnenaei MO, Hamoudi RA, Swansbury J, Gruszka-Westwood AM, Brito-Babapulle V, Matutes E, and Catovsky D. *Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma*. Genes Chromosomes & Cancer, 2003. **36**(1): p. 99-106. DOI: 10.1002/gcc.10140.
- 32. Calin GA. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia (vol 353, pg 1793, 2005). New England Journal of Medicine, 2006. **355**(5): p. 533-533.
- 33. Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente AE, Hernández J-Á, Lumbreras E, Sarasquete M-E, Martín A-Á, Benito R, Vicente-Gutiérrez C, Robledo C, Heras Ndl, Rodríguez J-N, Alcoceba M, Coca AGd, Aguilar C, González M, and Hernández-Rivas J-M. *MiRNA expression profile of chronic lymphocytic leukemia patients with 13q deletion*. Leukemia Research, 2016. **46**: p. 30-36. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2016.04.008.
- 34. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, and Croce CM. *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(39): p. 13944-13949. DOI: 10.1073/pnas.0506654102.
- 35. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, and Dalla-Favera R. *The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 28-40. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.11.019.
- 36. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, Bentz M, Fischer K, Lichter P, and Dohner H. *Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-q23.1 in lymphoproliferative disorders*. Blood, 1996. **88**(10): p. 243-243.
- Stankovic T and Skowronska A. *The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia & Lymphoma, 2014. 55(6): p. 1227-1239. DOI: 10.3109/10428194.2013.829919.
- 38. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, Chiaretti S, Del Giudice I, Fabbri G, Bruscaggin A, Spina V, Deambrogi C, Marinelli M, Fama R, Greco M, Daniele G, Forconi F, Gattei V, Bertoni F, Deaglio S, Pasqualucci L, Guarini A, Dalla-Favera R, Foa R, and Gaidano G. *Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2012. **119**(12): p. 2854-2862. DOI: 10.1182/blood-2011-12-395673.
- Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Cuneo A, Knuutila S, Elonen E, and Gahrton G. *Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic-leukemia defined by specific chromosomal-abnormalities*. New England Journal of Medicine, 1990. **323**(11): p. 720-724. DOI: 10.1056/nejm199009133231105.

- 40. Strati P, Abruzzo LV, Wierda WG, O'Brien S, Ferrajoli A, and Keating MJ. Second Cancers and Richter Transformation Are the Leading Causes of Death in Patients With Trisomy 12 Chronic Lymphocytic Leukemia. Clinical Lymphoma Myeloma & Leukemia, 2015. **15**(7): p. 420-427. DOI: 10.1016/j.clml.2015.02.001.
- 41. Riches JC, O'Donovan CJ, Kingdon SJ, McClanahan F, Clear AJ, Neuberg DS, Werner L, Croce CM, Ramsay AG, Rassenti LZ, Kipps TJ, and Gribben JG. *Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations*. Blood, 2014. **123**(26): p. 4101-4110. DOI: 10.1182/blood-2014-01-552307.
- Ganghammer S, Hutterer E, Hinterseer E, Brachtl G, Asslaber D, Krenn PW, Girbl T, Berghammer P, Geisberger R, Egle A, Zucchetto A, Kruschinski A, Gattei V, Chigaev A, Greil R, and Hartmann TN. *CXCL12-induced VLA-4 activation is impaired in trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: a role for CCL21*. Oncotarget, 2015. 6(14): p. 12048-12060.
- 43. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, Pekarsky Y, and Croce CM. *NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12*. Blood, 2012. **119**(2): p. 329-331. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386144.
- 44. Zenz T, Haebe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buehler A, Sarno A, Groner S, Mertens D, Busch R, Hallek M, Doehner H, and Stilgenbauer S. *Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial.* Blood, 2009. **114**(13): p. 2589-2597. DOI: 10.1182/blood-2009-05-224071.
- 45. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, and Gaidano G. *The Prognostic Value of TP53 Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia Is Independent of Del17p13: Implications for Overall Survival and Chemorefractoriness*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(3): p. 995-1004. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-08-1630.
- 46. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Bea S, Gonzalez-Diaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, Lopez-Guerra M, Colomer D, Tubio JMC, Lopez C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernandez JM, Puente DA, Freije JMP, Velasco G, Gutierrez-Fernandez A, Costa D, Carrio A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernandez L, Yaguee J, Nicolas P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjose S, Piris MA, de Alava E, Miguel JS, Royo R, Gelpi JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigo R, Bayes M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, Lopez-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, Lopez-Otin C, and Campo E. *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. Nature, 2011. **475**(7354): p. 101-105. DOI: 10.1038/nature10113.
- 47. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, and Wendtner CM. *Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in*

chronic lymphocytic leukemia. Blood, 2006. **107**(2): p. 742-751. DOI: 10.1182/blood-2005-05-2093.

- 48. Van Den Neste E, Robin V, Francart J, Hagemeijer A, Stul M, Vandenberghe P, Delannoy A, Sonet A, Deneys V, Costantini S, Ferrant A, Robert A, and Michaux L. *Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine*. Leukemia, 2007. **21**(8): p. 1715-1722. DOI: 10.1038/sj.leu.2404764.
- 49. Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, Bastard C, Mossafa H, Leroux D, Tigaud I, De Braekeleer M, Terre C, Brizard F, Callet-Bauchu E, Struski S, Veronese L, Fert-Ferrer S, Taviaux S, Lesty C, Davi F, Merle-Beral H, Bernard OA, Sutton L, Raynaud SD, and Nguyen-Khac F. *Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages*. Leukemia Research, 2010. **34**(1): p. 63-68. DOI: 10.1016/j.leukres.2009.03.042.
- 50. Wang D-M, Miao K-R, Fan L, Qiu H-R, Fang C, Zhu D-X, Qiu H-X, Xu W, and Li J-Y. *Intermediate prognosis of 6q deletion in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia & Lymphoma, 2011. **52**(2): p. 230-237. DOI: 10.3109/10428194.2010.542599.
- 51. Cosson A, Chapiro E, Belhouachi N, Cung H-A, Keren B, Damm F, Algrin C, Lefebvre C, Fert-Ferrer S, Luquet I, Gachard N, Mugneret F, Terre C, Collonge-Rame M-A, Michaux L, Rafdord-Weiss I, Talmant P, Veronese L, Nadal N, Struski S, Barin C, Helias C, Lafage M, Lippert E, Auger N, Eclache V, Roos-Weil D, Leblond V, Settegrana C, Maloum K, Davi F, Merle-Beral H, Lesty C, Nguyen-Khac F, and Grp Francophone Cytogenetique H. *14q deletions are associated with trisomy 12, NOTCH1 mutations and unmutated IGHV genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma*. Genes Chromosomes & Cancer, 2014. **53**(8): p. 657-666. DOI: 10.1002/gcc.22176.
- 52. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, Vaisitti T, and Aydin S. *Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology*. Physiological Reviews, 2008. **88**(3): p. 841-886. DOI: 10.1152/physrev.00035.2007.
- 53. Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, and Summerfield GP. *The prognostic value of CD38 expression and its quanti. cation in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)*. Leukemia & Lymphoma, 2004. **45**(3): p. 455-462. DOI: 10.1080/1042819032000141275.
- 54. Vaisitti T, Audrito V, Serra S, Buonincontri R, Sociali G, Mannino E, Pagnani A, Zucchetto A, Tissino E, Vitale C, Coscia M, Usai C, Pepper C, Gattei V, Bruzzone S, and Deaglio S. *The enzymatic activities of CD38 enhance CLL growth and trafficking: implications for therapeutic targeting*. Leukemia, 2015. **29**(2): p. 356-68. DOI: 10.1038/leu.2014.207.
- 55. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, and Weiss A. ZAP-70 A 70 KD protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta-chain. Cell, 1992. **71**(4): p. 649-662. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90598-7.

- 56. Chan AC, Irving BA, Fraser JD, and Weiss A. The zeta-chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-KDA tyrosine phosphoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. 88(20): p. 9166-9170. DOI: 10.1073/pnas.88.20.9166.
- 57. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang LM, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, and Staudt LM. *Relation of gene* expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. Journal of Experimental Medicine, 2001. **194**(11): p. 1639-1647. DOI: 10.1084/jem.194.11.1639.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, and Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 2003. 348(18): p. 1764-1775. DOI: 10.1056/NEJMoa023143.
- 59. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, and Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. Lancet, 2004. **363**(9403): p. 105-111. DOI: 10.1016/s0140-6736(03)15260-9.
- 60. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, and Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. Blood, 2007. 109(5): p. 2032-2039. DOI: 10.1182/blood-2006-03-011759.
- 61. Hartman ML and Kilianska ZM. *Lipoprotein lipase: a new prognostic factor in chronic lymphocytic leukaemia*. Wspolczesna Onkologia-Contemporary Oncology, 2012. **16**(6): p. 474-479. DOI: 10.5114/wo.2012.3247.
- Heintel D, Kienle D, Shehata M, Krober A, Kroemer E, Schwarzinger I, Mitteregger D, Le T, Gleiss A, Mannhalter C, Chott A, Schwarzmeier J, Fonatsch C, Gaiger A, Dohner H, Stilgenbauer S, Jager U, and German CLLSG. *High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2005. 19(7): p. 1216-1223. DOI: 10.1038/sj.leu.2403748.
- 63. Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, Jeannel D, Vuillier F, Legarff-Tavernier M, Kimura EY, Bechet S, Dumas G, Brissard M, Merle-Beral H, Yamamoto M, Dighiero G, Davi F, and French Cooperative Grp CLL. *The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2005. **106**(2): p. 650-657. DOI: 10.1182/blood-2004-08-3344.
- 64. Kristensen L, Kristensen T, Abildgaard N, Royo C, Frederiksen M, Mourits-Andersen T, Campo E, and Møller MB. *LPL gene expression is associated with poor prognosis in CLL and closely related to NOTCH1 mutations*. European Journal of Haematology, 2015. DOI: 10.1111/ejh.12700.

- 65. Pallasch CP, Schwamb J, Koenigs S, Schulz A, Debey S, Kofler D, Schultze JL, Hallek M, Ultsch A, and Wendtner CM. *Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Leukemia, 2008. **22**(3): p. 585-592. DOI: 10.1038/sj.leu.2405058.
- 66. EksiogluDemiralp E, Alpdogan O, Aktan M, Firatli T, Ozturk A, Budak T, Bayik M, and Akoglu T. Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. Leukemia, 1996. **10**(8): p. 1331-1339.
- 67. Zucchetto A, Bomben R, Dal Bo M, Bulian P, Benedetti D, Nanni P, Del Poeta G, Degan M, and Gattei V. *CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance*. Leukemia, 2006. **20**(3): p. 523-525. DOI: 10.1038/sj.leu.2404087.
- 68. Baumann T, Delgado J, Santacruz R, Martinez-Trillos A, Rozman M, Aymerich M, Lopez C, Costa D, Carrio A, Villamor N, and Montserrat E. *CD49d (ITGA4)* expression is a predictor of time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukaemia and mutated IGHV status. British Journal of Haematology, 2016. **172**(1): p. 48-55. DOI: 10.1111/bjh.13788.
- 69. Cro L, Morabito F, Zucal N, Fabris S, Lionetti M, Cutrona G, Rossi F, Gentile M, Ferrario A, Ferrarini M, Molica S, Neri A, and Badini L. *CD26 expression in mature B-cell neoplasia: its possible role as a new prognostic marker in B-CLL*. Hematological Oncology, 2009. **27**(3): p. 140-147. DOI: 10.1002/hon.888.
- 70. Ibrahem L, Elderiny WE, Elhelw L, and Ismail M. *CD49d and CD26 are independent prognostic markers for disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Blood Cells Molecules and Diseases, 2015. **55**(2): p. 154-160. DOI: 10.1016/j.bcmd.2015.05.010.
- 71. Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, and Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta(2)-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. European Journal of Haematology, 1999. **62**(2): p. 117-122.
- Delgado J, Pratt G, Phillips N, Briones J, Fegan C, Nomdedeu J, Pepper C, Aventin A, Martino R, Milligan DW, and Sierra J. *Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate*. Haematologica-the Hematology Journal, 2009. 94: p. 372-373.
- 73. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, Binet JL, MerleBeral H, and Bron D. *Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4259-4264.
- 74. Saka B, Aktan M, Sami U, Oner D, Sanem O, and Dincol G. *Prognostic importance of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Clinical and Laboratory Haematology, 2006. **28**(1): p. 30-35. DOI: 10.1111/j.1365-2257.2006.00750.x.

- 75. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, and Emmerich B. *Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 1999. **93**(5): p. 1732-1737.
- 76. Sivina M, Hartmann E, Kipps TJ, Rassenti L, Krupnik D, Lerner S, LaPushin R, Xiao L, Huang X, Werner L, Neuberg D, Kantarjian H, O'Brien S, Wierda WG, Keating MJ, Rosenwald A, and Burger JA. CCL3 (MIP-1 alpha) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 2011. 117(5): p. 1662-1669. DOI: 10.1182/blood-2010-09-307249.
- 77. Santacruz R, Villamor N, Aymerich M, Martinez-Trillos A, Lopez C, Navarro A, Rozman M, Bea S, Royo C, Cazorla M, Colomer D, Gine E, Pinyol M, Puente XS, Lopez-Otin C, Campo E, Lopez-Guillermo A, and Delgado J. *The prognostic impact of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia requiring first-line therapy*. Haematologica, 2014. **99**(5): p. 873-880. DOI: 10.3324/haematol.2013.099796.
- 78. Ghia P. A look into the future: can minimal residual disease guide therapy and predict prognosis in chronic lymphocytic leukemia? Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2012. 2012: p. 97-104. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.97.
- 79. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, Palacio C, Stehlikova O, Kreuzer KA, Liptrot S, O'Brien D, de Tute RM, Marinov I, Hauwel M, Spacek M, Dobber J, Kater AP, Gambell P, Soosapilla A, Lozanski G, Brachtl G, Lin K, Boysen J, Hanson C, Jorgensen JL, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Broome HE, Rassenti L, Craig F, Delgado J, Moreno C, Bosch F, Egle A, Doubek M, Pospisilova S, Mulligan S, Westerman D, Sanders CM, Emerson R, Robins HS, Kirsch I, Shanafelt T, Pettitt A, Kipps TJ, Wierda WG, Cymbalista F, Hallek M, Hillmen P, Montserrat E, Ghia P, and CLL EERI. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. Leukemia, 2016. 30(4): p. 929-936. DOI: 10.1038/leu.2015.313.
- Dearden C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2008: p. 450-6. DOI: 10.1182/asheducation-2008.1.450.
- 81. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. Best Practice & Research Clinical Haematology, 2010. **23**(1): p. 145-153. DOI: 10.1016/j.beha.2009.12.004.
- 82. Visco C, Barcellini W, Maura F, Neri A, Cortelezzi A, and Rodeghiero F. *Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia*. American Journal of Hematology, 2014. **89**(11): p. 1055-1062. DOI: 10.1002/ajh.23785.
- 83. Barcellini W, Capalbo S, Agostinelli RM, Mauro FR, Ambrosetti A, Calori R, Cortelezzi A, Laurenti L, Pogliani EM, Pedotti P, Liso V, Girelli G, Mandelli F, and

Zanella A. *Relationship between autoimmune phenomena and disease stage and therapy in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica-the Hematology Journal, 2006. **91**(12): p. 1689-1692.

- 84. Brewer JD, Shanafelt TD, Call TG, Cerhan JR, Roenigk RK, Weaver AL, and Otley CC. *Increased incidence of malignant melanoma and other rare cutaneous cancers in the setting of chronic lymphocytic leukemia*. International Journal of Dermatology, 2015. **54**(8): p. E287-E293. DOI: 10.1111/ijd.12564.
- 85. Solomon BM, Rabe KG, Slager SL, Brewer JD, Cerhan JR, and Shanafelt TD. Overall and Cancer-Specific Survival of Patients With Breast, Colon, Kidney, and Lung Cancers With and Without Chronic Lymphocytic Leukemia: A SEER Population-Based Study. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(7): p. 930-937. DOI: 10.1200/jco.2012.43.4449.
- 86. Falchi L, Vitale C, Keating MJ, Lerner S, Wang X, Gbito KYE, Strom SS, Wierda WG, and Ferrajoli A. *Incidence and prognostic impact of other cancers in a population of long-term survivors of chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia & Lymphoma, 2015. **56**: p. 40-40.
- 87. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, De Paoli L, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A, Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, and Gaidano G. *Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome*. British Journal of Haematology, 2008. **142**(2): p. 202-215. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07166.x.
- 88. Vitale C and Ferrajoli A. *Richter Syndrome in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Current Hematologic Malignancy Reports, 2016. **11**(1): p. 43-51. DOI: 10.1007/s11899-016-0300-y.
- 89. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, Vartanov A, Fernandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, and Wu CJ. *Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Cell, 2013. **152**(4): p. 714-726. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.019.
- 90. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, Kluth S, Bozic I, Lawrence M, Boettcher S, Carter SL, Cibulskis K, Mertens D, Sougnez CL, Rosenberg M, Hess JM, Edelmann J, Kless S, Kneba M, Ritgen M, Fink A, Fischer K, Gabriel S, Lander ES, Nowak MA, Doehner H, Hallek M, Neuberg D, Getz G, Stilgenbauer S, and Wu CJ. *Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse*. Nature, 2015. **526**(7574): p. 525-U132. DOI: 10.1038/nature15395.
- 91. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. American Journal of Hematology, 2015. **90**(5): p. 446-460. DOI: 10.1002/ajh.23979.

- 92. Altman SJ, Haut A, Cartwright GE, and Wintrobe MM. Early experience with para-(n,n-di-2-chloroethyl)aminophenylbutyric acid (CB 1348), a new chemotherapeutic agent effective in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Cancer, 1956. 9(3): p. 512-517. DOI: 10.1002/1097-0142(195605/06)9:3<512::aidcncr2820090312>3.0.co;2-o.
- 93. Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M, Redman J, Koller C, Barlogie B, Velasquez W, Plunkett W, Freireich EJ, and McCredie KB. *Fludarabine a new agent with major activity against chronic lymphocytic-leukemia*. Blood, 1989. **74**(1): p. 19-25.
- 94. Steurer M, Pall G, Richards S, Schwarzer G, Bohlius J, and Greil R. *Purine antagonists for chronic lymphocytic leukaemia*. The Cochrane database of systematic reviews, 2006(3): p. CD004270-CD004270.
- 95. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, and Schiffer CA. *Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia*. New England Journal of Medicine, 2000. **343**(24): p. 1750-1757. DOI: 10.1056/nejm200012143432402.
- 96. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, and Dallaire BK. *Rituximab chimeric Anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program.* Journal of Clinical Oncology, 1998. **16**(8): p. 2825-2833.
- 97. Smith MR. *Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7359-7368. DOI: 10.1038/sj.onc.1206939.
- 98. Dzietczenia J, Wrobel T, Mazur G, Poreba R, Jazwiec B, and Kuliczkowski K. *Expression of complement regulatory proteins: CD46, CD55, and CD59 and response to rituximab in patients with CD20(+) non-Hodgkin's lymphoma*. Medical Oncology, 2010. **27**(3): p. 743-746. DOI: 10.1007/s12032-009-9278-9.
- 99. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, Robak T, Furman RR, Hillmen P, Trneny M, Dyer MJS, Padmanabhan S, Piotrowska M, Kozak T, Chan G, Davis R, Losic N, Wilms J, Russell CA, and Oesterborg A. *Ofatumumab As Single-Agent CD20 Immunotherapy in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(10): p. 1749-1755. DOI: 10.1200/jco.2009.25.3187.
- 100. Patz M, Isaeva P, Forcob N, Muller B, Frenzel LP, Wendtner CM, Klein C, Umana P, Hallek M, and Krause G. Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. British Journal of Haematology, 2011. 152(3): p. 295-306. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08428.x.
- 101. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero LFC, Montillo M, Fegan C, Asikanius E, Humphrey K, Fingerle-Rowson G, and Hallek M. *Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated*

results of the CLL11 study. Leukemia, 2015. **29**(7): p. 1602-1604. DOI: 10.1038/leu.2015.14.

- 102. Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet JL, Hillmen P, Byrd J, Albitar M, Brettman L, Santabarbara P, Wacker B, and Rai KR. *Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3554-3561. DOI: 10.1182/blood.V99.10.3554.
- 103. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, Smith L, Harbison J, Webb J, Moran M, Lucas M, Lin T, Hackbarth ML, Proffitt JH, Lucas D, Grever MR, and Byrd JC. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. Blood, 2004. 103(9): p. 3278-3281. DOI: 10.1182/blood-2003-10-3729.
- 104. Herman SEM, Barr PM, McAuley EM, Liu D, Wiestner A, and Friedberg JW. *Fostamatinib inhibits B-cell receptor signaling, cellular activation and tumor proliferation in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia.* Leukemia, 2013. **27**(8): p. 1769-1773. DOI: 10.1038/leu.2013.37.
- 105. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, LaCasce A, Schaefer-Cutillo J, De Vos S, Sinha R, Leonard JP, Cripe LD, Gregory SA, Sterba MP, Lowe AM, Levy R, and Shipp MA. *Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2010. **115**(13): p. 2578-2585. DOI: 10.1182/blood-2009-08-236471.
- Nair KS and Cheson B. The role of idelalisib in the treatment of relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. Therapeutic advances in hematology, 2016.
 7(2): p. 69-84. DOI: 10.1177/2040620715625966.
- Byrd JC. Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia (vol 369, pg 32, 2013). New England Journal of Medicine, 2014. 370(8): p. 786-786. DOI: 10.1056/NEJMx130049.
- 108. Amrein PC, Attar EC, Takvorian T, Hochberg EP, Ballen KK, Leahy KM, Fisher DC, LaCasce AS, Jacobsen ED, Armand P, Hasserjian RP, Werner L, Neuberg D, and Brown JR. *Phase II Study of Dasatinib in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia*. Clinical Cancer Research, 2011. **17**(9): p. 2977-2986. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-10-2879.
- 109. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, Carney DA, He SZ, Huang DCS, Xiong H, Cui Y, Busman TA, McKeegan EM, Krivoshik AP, Enschede SH, and Humerickhouse R. Substantial Susceptibility of Chronic Lymphocytic Leukemia to BCL2 Inhibition: Results of a Phase I Study of Navitoclax in Patients With Relapsed or Refractory Disease. Journal of Clinical Oncology, 2012. 30(5): p. 488-496. DOI: 10.1200/jco.2011.34.7898.
- 110. Seymour JF, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Puvvada S, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Huang DCS, Rudersdorf N, Gressick LA, Montalvo NP, Yang J, Zhu M, Dunbar M, Cerri E, Enschede SH, Humerickhouse R, and Roberts AW. ABT-199 (GDC-0199) in relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocytic

leukemia (CLL) and small lymphocytic lymphoma (SLL): High complete-response rate and durable disease control. ASCO Meeting abstract. Journal of Clinical Oncology, 2014. **32**(15).

- 111. Billard C. *Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia*. Oncotarget, 2014. **5**(2): p. 309-325.
- 112. Acebes-Huerta A, Huergo-Zapico L, Gonzalez-Rodriguez AP, Fernandez-Guizan A, Payer AR, Lopez-Soto A, and Gonzalez S. *Lenalidomide Induces Immunomodulation in Chronic Lymphocytic Leukemia and Enhances Antitumor Immune Responses Mediated by NK and CD4 T Cells*. Biomed Research International, 2014. DOI: 10.1155/2014/265840.
- 113. Bühler A, Wendtner CM, Kipps TJ, Rassenti L, Fraser GAM, Michallet AS, Hillmen P, Duerig J, Gregory SA, Kalaycio M, Aurran-Schleinitz T, Trentin L, Gribben JG, Chanan-Khan A, Purse B, Zhang J, De Bedout S, Mei J, Hallek M, and Stilgenbauer S. Lenalidomide treatment and prognostic markers in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: data from the prospective, multicenter phase-II CLL-009 trial. Blood Cancer Journal, 2016. 6. DOI: 10.1038/bcj.2016.9.
- 114. Porter DL, Hwang W-T, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, Bagg A, Marcucci KT, Shen A, Gonzalez V, Ambrose D, Grupp SA, Chew A, Zheng Z, Milone MC, Levine BL, Melenhorst JJ, and June CH. *Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia*. Science Translational Medicine, 2015. 7(303). DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5415.
- 115. Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, Wiktor-Jedrzejczak W, Niederwieser D, Hallek M, Montserrat E, and Chronic Leukemia Working P. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. Leukemia, 2007. 21(1): p. 12-17. DOI: 10.1038/sj.leu.2404441.
- 116. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, Corradini P, van Gelder M, Gribben J, Kimby E, Michallet M, Moreno C, Stilgenbauer S, Montserrat E, Eric, and European Soc Blood Marrow T. *Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents?* Blood, 2014. **124**(26): p. 3841-3849. DOI: 10.1182/blood-2014-07-586826.
- 117. Klein U, Tu YH, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri AN, Califano A, and Dalla-Favera R. *Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells*. Journal of Experimental Medicine, 2001. 194(11): p. 1625-1638. DOI: 10.1084/jem.194.11.1625.
- 118. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Durig J, and Kuppers R. *Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia*. Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**(12): p. 2183-2198. DOI: 10.1084/jem.20120833.
- 119. Smith EN, Ghia EM, DeBoever CM, Rassenti LZ, Jepsen K, Yoon KA, Matsui H, Rozenzhak S, Alakus H, Shepard PJ, Dai Y, Khosroheidari M, Bina M, Gunderson KL, Messer K, Muthuswamy L, Hudson TJ, Harismendy O, Barrett CL, Jamieson CHM, Carson DA, Kipps TJ, and Frazer KA. *Genetic and epigenetic profiling of CLL disease progression reveals limited somatic evolution and suggests a relationship to memory-cell development*. Blood Cancer Journal, 2015. **5**. DOI: 10.1038/bcj.2015.14.
- 120. Chiorazzi N and Ferrarini M. *B cell chronic lymphocytic leukemia: Lessons learned from studies of the B cell antigen receptor*. Annual Review of Immunology, 2003. 21: p. 841-894. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141018.
- 121. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, and Catovsky D. *Levels* of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. Journal of Clinical Pathology, 1998. **51**(5): p. 364-369.
- 122. Huh YO, Keating MJ, Saffer HL, Jilani I, Lerner S, and Albitar M. *Higher levels of* surface CD20 expression on circulating lymphocytes compared with bone marrow and lymph nodes in *B*-cell chronic lymphocytic leukemia. American Journal of Clinical Pathology, 2001. **116**(3): p. 437-443.
- 123. Bojarska-Junak A, Hus I, Chocholska S, Tomczak W, Wos J, Czubak P, Putowski L, and Rolinski J. *CD1d expression is higher in chronic lymphocytic leukemia patients with unfavorable prognosis*. Leukemia Research, 2014. **38**(4): p. 435-442. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.12.015.
- 124. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers J-O, Berthou C, Mageed RA, Renaudineau Y, and Youinou P. CD5 Promotes IL-10 Production in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells through STAT3 and NFAT2 Activation. Journal of Immunology, 2011. 186(8): p. 4835-4844. DOI: 10.4049/jimmunol.1003050.
- 125. Hagn M, Blackwell SE, Beyer T, Ebel V, Fabricius D, Lindner S, Stilgenbauer S, Simmet T, Tam C, Neeson P, Trapani JA, Schrezenmeier H, Weiner GJ, and Jahrsdoerfer B. *B-CLL cells acquire APC- and CTL-like phenotypic characteristics after stimulation with CpG ODN and IL-21*. International Immunology, 2014. 26(7): p. 383-395. DOI: 10.1093/intimm/dxu001.
- 126. Pallasch CP, Ulbrich S, Brinker R, Hallek M, Uger RA, and Wendtner C-M. *Disruption of T cell suppression in chronic lymphocytic leukemia by CD200 blockade*. Leukemia Research, 2009. **33**(3): p. 460-464. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.08.021.
- 127. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, D'Arena G, Coscia M, Tripodo C, Inghirami G, Robson SC, Gaidano G, Malavasi F, and Deaglio S. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. Blood, 2011. 118(23): p. 6141-6152. DOI: 10.1182/blood-2011-08-374728.
- 128. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rai KJ, Gilling-Cutucache CE, Nordgren TM, Moragues M, Lu R, Opavsky R, Bociek GR, Weisenburger DD, Iqbal J, and Joshi SS. *Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in a Lymph Node Microenvironment Depict Molecular*

Signature Associated with an Aggressive Disease. Molecular Medicine, 2014. 20: p. 290-301. DOI: 10.2119/molmed.2012.00303.

- 129. ten Hacken E and Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2016. 1863(3): p. 401-413. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.07.009.
- Chiorazzi N, Rai KR, and Ferrarini M. Mechanisms of disease: Chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 2005. 352(8): p. 804-815. DOI: 10.1056/NEJMra041720.
- 131. Burger JA and Chiorazzi N. *B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. Trends in Immunology, 2013. **34**(12): p. 592-601. DOI: 10.1016/j.it.2013.07.002.
- 132. Zupo S, Cutrona G, Mangiola M, and Ferrarini M. *Role of surface IgM and IgD on survival of the cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **99**(6): p. 2277-2278. DOI: 10.1182/blood-2001-11-0126.
- 133. Dühren-von Minden M, Uebelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, Hofmann D, Surova E, Follo M, Koehler F, Wardemann H, Zirlik K, Veelken H, and Jumaa H. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. Nature, 2012. 489(7415): p. 309-312. DOI: 10.1038/nature11309.
- 134. Packham G and Stevenson FK. *Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia*. Immunology, 2005. **114**(4): p. 441-449. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02117.x.
- 135. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, and Reed JC. *Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic-leukemia*. Blood, 1993. **82**(6): p. 1820-1828.
- 136. Pepper C, Hoy T, and Bentley DP. *Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance*. British Journal of Cancer, 1997. **76**(7): p. 935-938. DOI: 10.1038/bjc.1997.487.
- 137. Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, Hills R, Ward R, Starczynski J, Austen B, Hooper L, Stankovic T, and Fegan C. *Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers*. Blood, 2008. **112**(9): p. 3807-3817. DOI: 10.1182/blood-2008-05-157131.
- 138. Frenzel LP, Patz M, Pallasch CP, Brinker R, Claasen J, Schulz A, Hallek M, Kashkar H, and Wendtner C-M. Novel X-linked inhibitor of apoptosis inhibiting compound as sensitizer for TRAIL-mediated apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia with poor prognosis. British Journal of Haematology, 2011. 152(2): p. 191-200. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08426.x.

- 139. Berg V, Rusch M, Vartak N, Juengst C, Schauss A, Waldmann H, Hedberg C, Pallasch CP, Bastiaens PIH, Hallek M, Wendtner C-M, and Frenzel LP. *miRs-138* and-424 control palmitoylation-dependent CD95-mediated cell death by targeting acyl protein thioesterases 1 and 2 in CLL. Blood, 2015. **125**(19): p. 2948-2957. DOI: 10.1182/blood-2014-07-586511.
- 140. Frenzel LP, Reinhardt HC, and Pallasch CP. Concepts of Chronic Lymphocytic Leukemia Pathogenesis: DNA Damage Response and Tumor Microenvironment. Oncology Research and Treatment, 2016. **39**(1-2): p. 9-16. DOI: 10.1159/000443820.
- 141. Schmid C and Isaacson PG. *Proliferation centers in B-cell malignant-lymphoma, lymphocytic (B-CLL) an immunophenotypic study*. Histopathology, 1994. **24**(5): p. 445-451. DOI: 10.1111/j.1365-2559.1994.tb00553.x.
- 142. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, Allen SL, Kolitz J, Vinciguerra VP, Kudalkar P, Wasil T, Rai KR, Ferrarini M, Gregersen PK, and Chiorazzi N. *Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations*. Blood, 2004. **103**(2): p. 375-382. DOI: 10.1182/blood-2003-04-1345.
- 143. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, and Chiorazzi N. *In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells*. Journal of Clinical Investigation, 2005. 115(3): p. 755-764. DOI: 10.1172/jci23409.
- 144. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, and Kipps TJ. Bloodderived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. Blood, 2000. **96**(8): p. 2655-2663.
- 145. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ, and Kipps TJ. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 alpha. Blood, 2005. 106(3): p. 1012-1020. DOI: 10.1182/blood-2004-03-0889.
- 146. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, Bonello L, Horenstein AL, Tamagnone L, Boumsell L, and Malavasi F. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. Blood, 2005. 105(8): p. 3042-3050. DOI: 10.1182/blood-2004-10-3873.
- 147. Boissard F, Laurent C, Ramsay AG, Quillet-Mary A, Fournie JJ, Poupot M, and Ysebaert L. *Nurse-like cells impact on disease progression in chronic lymphocytic leukemia*. Blood Cancer Journal, 2016. **6**. DOI: 10.1038/bcj.2015.108.
- 148. Boissard F, Fournie JJ, Quillet-Mary A, Ysebaert L, and Poupot M. *Nurse-like cells mediate ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia patients*. Blood Cancer Journal, 2015. **5**. DOI: 10.1038/bcj.2015.74.

- 149. Nicholas NS, Apollonio B, and Ramsay AG. *Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2016. **1863**(3): p. 471-482. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.003.
- 150. Kontoyiannis DP, Georgiadou SP, Wierda WG, Wright S, Albert ND, Ferrajoli A, Keating M, and Lewis RE. Impaired bactericidal but not fungicidal activity of polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic lymphocytic leukemia. Leukemia & Lymphoma, 2013. 54(8): p. 1730-1733. DOI: 10.3109/10428194.2012.750723.
- 151. Itala M, Vainio O, and Remes K. Functional abnormalities in granulocytes predict susceptibility to bacterial infections in chronic lymphocytic leukaemia. European Journal of Haematology, 1996. **57**(1): p. 46-53.
- 152. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Bertoncelli L, Martinelli S, Guarnotta C, Castelli I, Deaglio S, Debbia G, De Biasi S, Bonacorsi G, Zucchini P, Narni F, Tripodo C, Luppi M, Cossarizza A, and Marasca R. *The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation*. Haematologica, 2013. **98**(7): p. 1115-1123. DOI: 10.3324/haematol.2012.073080.
- 153. Jurado-Camino T, Cordoba R, Esteban-Burgos L, Hernandez-Jimenez E, Toledano V, Hernandez-Rivas J-A, Ruiz-Sainz E, Cobo T, Siliceo M, Perez de Diego R, Belda C, Cubillos-Zapata C, and Lopez-Collazo E. *Chronic Lymphocytic Leukemia: A Paradigm of Innate Immune Cross-Tolerance*. Journal of Immunology, 2015. **194**(2): p. 719-727. DOI: 10.4049/jimmunol.1402272.
- 154. Hanna BS, McClanahan F, Yazdanparast H, Zaborsky N, Kalter V, Roessner PM, Benner A, Duerr C, Egle A, Gribben JG, Lichter P, and Seiffert M. *Depletion of CLL-associated patrolling monocytes and macrophages controls disease development and repairs immune dysfunction in vivo*. Leukemia, 2016. **30**(3): p. 570-579. DOI: 10.1038/leu.2015.305.
- 155. Jitschin R, Braun M, Buettner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, Eckart MJ, Krause SW, Oefner PJ, Le Blanc K, Mackensen A, and Mougiakakos D. *CLL-cells induce IDOhi CD14(+)HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote T-Regs*. Blood, 2014. **124**(5): p. 750-760. DOI: 10.1182/blood-2013-12-546416.
- 156. Middleton O, Cosimo E, Dobbin E, McCaig AM, Clarke C, Brant AM, Leach MT, Michie AM, and Wheadon H. *Complement deficiencies limit CD20 monoclonal antibody treatment efficacy in CLL*. Leukemia, 2015. **29**(1): p. 107-114. DOI: 10.1038/leu.2014.146.
- 157. Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, Pilar Gonzalez-Rodriguez A, Contesti J, Gonzalez-Garcia E, Payer AR, Villa-Alvarez M, Fernandez-Guizan A, Lopez-Soto A, and Gonzalez S. *Expansion of NK Cells and Reduction of NKG2D Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Correlation with Progressive Disease*. Plos One, 2014. **9**(10). DOI: 10.1371/journal.pone.0108326.

- 158. Reiners KS, Topolar D, Henke A, Simhadri VR, Kessler J, Sauer M, Bessler M, Hansen HP, Tawadros S, Herling M, Kroenke M, Hallek M, and von Strandmann EP. Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. Blood, 2013. 121(18): p. 3658-3665. DOI: 10.1182/blood-2013-01-476606.
- 159. Wild J, Schmiedel BJ, Maurer A, Raab S, Prokop L, Stevanovic S, Doerfel D, Schneider P, and Salih HR. *Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis*. Leukemia, 2015. **29**(8): p. 1676-1683. DOI: 10.1038/leu.2015.50.
- 160. Maki G, Hayes GM, Naji A, Tyler T, Carosella ED, Rouas-Freiss N, and Gregory SA. *NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: Implication of HLA-G*. Tissue Antigens, 2009. **74**(1): p. 95-96.
- 161. Fais F, Morabito F, Stelitano C, Callea V, Zanardi S, Scudeletti M, Varese P, Ciccone E, and Grossi CE. Cd1d is expressed on B-chronic lymphocytic leukemia cells and mediates alpha-galactosylceramide presentation to natural killer T lymphocytes. International Journal of Cancer, 2004. 109(3): p. 402-411. DOI: 10.1002/ijc.11723.
- 162. Bojarska-Junak A, Hus I, Sieklucka M, Wasik-Szczepanek E, Mazurkiewicz T, Polak P, Dmoszynska A, and Rolinski J. Natural killer-like T CD3(+)/CD16(+)CD56(+) cells in chronic lymphocytic leukemia: Intracellular cytokine expression and relationship with clinical outcome. Oncology Reports, 2010. 24(3): p. 803-810. DOI: 10.3892/or 00000924.
- 163. Dazzi F, Dandrea E, Biasi G, Desilvestro G, Gaidano G, Schena M, Tison T, Vianello F, Girolami A, and Caligariscappio F. *Failure of B-cells of chronic lymphocytic-leukemia in presenting soluble and alloantigens*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1995. **75**(1): p. 26-32. DOI: 10.1006/clin.1995.1048.
- 164. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, and Gribben JG. *Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer*. Blood, 2012. **120**(7): p. 1412-1421. DOI: 10.1182/blood-2012-02-411678.
- 165. Tinhofer I, Marschitz I, Kos M, Henn T, Egle A, Villunger A, and Greil R. Differential sensitivity of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand(+) tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia. Blood, 1998. 91(11): p. 4273-4281.
- Correia RP, Silva FAM, Bacal NS, Campregher PV, Hamerschlak N, and Amarante-Mendes GP. *Not Available*. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia, 2014.
 36(1): p. 60-64. DOI: 10.5581/1516-8484.20140015.
- 167. Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A, Hojjat-Farsangi M, Khoshnoodi J, Razavi SM, Jeddi-Tehrani M, and Shokri F. Increased Frequency of CD8(+) and CD4(+) Regulatory T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: Association with Disease

Progression. Cancer Investigation, 2013. **31**(2): p. 121-131. DOI: 10.3109/07357907.2012.756110.

- 168. Hus I, Bojarska-Junak A, Chocholska S, Tomczak W, Wos J, Dmoszynska A, and Rolinski J. *Th17/IL-17A Might Play a Protective Role in Chronic Lymphocytic Leukemia Immunity*. Plos One, 2013. **8**(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0078091.
- 169. Orsini E, Guarini A, Chiaretti S, Mauro FR, and Foa R. *The circulating dendritic cell compartment in patients with chronic lymphocytic leukemia is severely defective and unable to stimulate an effective T-cell response*. Cancer Research, 2003. **63**(15): p. 4497-4506.
- Saulep-Easton D, Vincent FB, Le Page M, Wei A, Ting SB, Croce CM, Tam C, and Mackay F. Cytokine-driven loss of plasmacytoid dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, 2014. 28(10): p. 2005-2015. DOI: 10.1038/leu.2014.105.
- 171. Freeman JA, Crassini KR, Best OG, Forsyth CJ, Mackinlay NJ, Han P, Stevenson W, and Mulligan SP. *Immunoglobulin G subclass deficiency and infection risk in 150 patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia & Lymphoma, 2013. 54(1): p. 99-104. DOI: 10.3109/10428194.2012.706285.
- 172. Sampalo A and Brieva JA. *Humoral immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia: Role of CD95/CD95L in tumoral damage and escape*. Leukemia & Lymphoma, 2002. **43**(4): p. 881-884. DOI: 10.1080/10428190290017033.
- 173. Neta R and Salvin SB. Specific suppression of delayed-hypersensitivity possible presence of a suppressor B cell in regulation of delayed-hypersensitivity. Journal of Immunology, 1974. **113**(6): p. 1716-1725.
- 174. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, and Janeway CA. *Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice*. Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(6): p. 2271-2278. DOI: 10.1084/jem.184.6.2271.
- 175. Moulin V, Andris F, Thielemans K, Maliszewski C, Urbain J, and Moser M. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: Increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. Journal of Experimental Medicine, 2000. 192(4): p. 475-482. DOI: 10.1084/jem.192.4.475.
- 176. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Preffer FI, and Bhan AK. *Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease*. International Immunology, 2000. **12**(5): p. 597-605. DOI: 10.1093/intimm/12.5.597.
- 177. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, and Bhan AK. *Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10 producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation.* Gastroenterology, 2002. **122**(4): p. A2-A2.
- 178. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, and Anderton SM. *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. Nature Immunology, 2002. **3**(10): p. 944-950. DOI: 10.1038/ni833.

- 179. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, and Londei M. *Prevention of arthritis by interleukin 10producing B cells*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(4): p. 489-501. DOI: 10.1084/jem.20021293.
- 180. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, and Mauri C. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. Immunity, 2010. 32(1): p. 129-140. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.
- 181. Lemoine S, Morva A, Youinou P, and Jamin C. *Human T cells induce their own regulation through activation of B cells*. Journal of Autoimmunity, 2011. **36**(3-4): p. 228-238. DOI: 10.1016/j.jaut.2011.01.005.
- 182. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, and Mauri C. *Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis*. Journal of Immunology, 2007. **178**(12): p. 7868-7878.
- 183. Simon Q, Pers J-O, Cornec D, Le Pottier L, Mageed RA, and Hillion S. In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016. 137(5): p. 1577-1584. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.09.014.
- 184. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, and Savill J. *Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(35): p. 14080-14085. DOI: 10.1073/pnas.0700326104.
- 185. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, and Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1d(hi)CD5(+) phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. Immunity, 2008. 28(5): p. 639-650. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.03.017.
- 186. Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Kuwano Y, Okochi H, Tamaki K, Sato S, Tedder TF, and Fujimoto M. *Regulatory B Cells (B10 Cells) Have a Suppressive Role in Murine Lupus: CD19 and B10 Cell Deficiency Exacerbates Systemic Autoimmunity*. Journal of Immunology, 2010. **184**(9): p. 4801-4809. DOI: 10.4049/jimmunol.0902385.
- 187. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz J-D, Fujimoto M, and Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. Journal of Clinical Investigation, 2008. 118(10): p. 3420-3430. DOI: 10.1172/jci36030.
- 188. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, Hall RP, St Clair EW, and Tedder TF. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood, 2011. 117(2): p. 530-541. DOI: 10.1182/blood-2010-07-294249.

- 189. Ding Q, Yeung M, Camirand G, Zeng Q, Akiba H, Yagita H, Chalasani G, Sayegh MH, Najafian N, and Rothstein DM. *Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice*. Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(9): p. 3645-3656. DOI: 10.1172/jci46274.
- 190. Yeung MY, Ding Q, Brooks CR, Xiao S, Workman CJ, Vignali DAA, Ueno T, Padera RF, Kuchroo VK, Najafian N, and Rothstein DM. *TIM-1 Signaling Is Required for Maintenance and Induction of Regulatory B Cells*. American Journal of Transplantation, 2015. 15(4): p. 942-953. DOI: 10.1111/ajt.13087.
- 191. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Soellner S, Akdis DG, Rueckert B, Akdis CA, and Akdis M. *IgG(4) production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013. **131**(4): p. 1204-1212. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.01.014.
- 192. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TFE, Beyer T, Reister F, Fabricius D, Lotfi R, Lunov O, Nienhaus GU, Simmet T, Kreienberg R, Moeller P, Schrezenmeier H, and Jahrsdoerfer B. Interleukin 21-Induced Granzyme B-Expressing B Cells Infiltrate Tumors and Regulate T Cells. Cancer Research, 2013. 73(8): p. 2468-2479. DOI: 10.1158/0008-5472.can-12-3450.
- 193. Kaltenmeier C, Gawanbacht A, Beyer T, Lindner S, Trzaska T, van der Merwe JA, Haerter G, Gruener B, Fabricius D, Lotfi R, Schwarz K, Schuetz C, Hoenig M, Schulz A, Kern P, Bommer M, Schrezenmeier H, Kirchhoff F, and Jahrsdoerfer B. CD4(+) T Cell-Derived IL-21 and Deprivation of CD40 Signaling Favor the In Vivo Development of Granzyme B-Expressing Regulatory B Cells in HIV Patients. Journal of Immunology, 2015. 194(8): p. 3768-3777. DOI: 10.4049/jimmunol.1402568.
- 194. Durand J, Huchet V, Merieau E, Usal C, Chesneau M, Remy S, Heslan M, Anegon I, Cuturi M-C, Brouard S, and Chiffoleau E. Regulatory B Cells with a Partial Defect in CD40 Signaling and Overexpressing Granzyme B Transfer Allograft Tolerance in Rodents. Journal of Immunology, 2015. 195(10): p. 5035-5044. DOI: 10.4049/jimmunol.1500429.
- 195. Kaku H, Cheng KF, Al-Abed Y, and Rothstein TL. A Novel Mechanism of B Cell-Mediated Immune Suppression through CD73 Expression and Adenosine Production. Journal of Immunology, 2014. 193(12): p. 5904-5913. DOI: 10.4049/jimmuno1.1400336.
- 196. Xiao X, Lao X-M, Chen M-M, Liu R-X, Wei Y, Ouyang F-Z, Chen D-P, Zhao X-Y, Zhao Q, Li X-F, Liu C-L, Zheng L, and Kuang D-M. PD-1(hi) Identifies a Novel Regulatory B-cell Population in Human Hepatoma That Promotes Disease Progression. Cancer Discovery, 2016. 6(5): p. 546-559. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-15-1408.
- 197. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T, and Baba Y. *Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation*. Immunity, 2014. **41**(6): p. 1040-1051. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.016.

- 198. de Masson A, Bouaziz J-D, Le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, Rybojad M, Hau E, Monfort J-B, Branchtein M, Michonneau D, Dessirier V, de Fontbrune FS, Bergeron A, Itzykson R, Dhedin N, Bengoufa D, de Latour RP, Xhaard A, Bagot M, Bensussan A, and Socie G. CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. Blood, 2015. 125(11): p. 1830-1839. DOI: 10.1182/blood-2014-09-599159.
- 199. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, Ries S, Van Duc D, Jaimes Y, Daridon C, Li R, Jouneau L, Boudinot P, Wilantri S, Sakwa I, Miyazaki Y, Leech MD, McPherson RC, Wirtz S, Neurath M, Hoehlig K, Meinl E, Gruetzkau A, Gruen JR, Horn K, Kuehl AA, Doerner T, Bar-Or A, Kaufmann SHE, Anderton SM, and Fillatreau S. *IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 366-370. DOI: 10.1038/nature12979.
- 200. Noh J, Noh G, Kim HS, Kim AR, and Choi WS. 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, 2012. 274(1-2): p. 109-114. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.01.005.
- 201. Park MK, Jung YO, Lee S-Y, Lee SH, Heo YJ, Kim EK, Oh HJ, Moon YM, Son H-J, Park MJ, Park SH, Kim HY, La Cho M, and Min JK. *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, 2016. **14**(1): p. 191-191. DOI: 10.1186/s12967-016-0940-7.
- 202. Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Tsubata T, and Tedder TF. *The Development* and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. Journal of Immunology, 2009. **182**(12): p. 7459-7472. DOI: 10.4049/jimmunol.0900270.
- 203. Hussain S and Delovitch TL. Intravenous transfusion of BCR-activated B cells protects NOD mice from type 1 diabetes in an IL-10-dependent manner. Journal of Immunology, 2007. **179**(11): p. 7225-7232.
- 204. Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, and Baba Y. *The calcium* sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. Immunity, 2011. **34**(5): p. 703-714. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.03.016.
- 205. Lenert P, Brummel R, Field EH, and Ashman RF. *TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production*. Journal of Clinical Immunology, 2005. **25**(1): p. 29-40. DOI: 10.1007/s10875-005-0355-6.
- 206. Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, and Shlomchik MJ. *Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 417-428. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.07.013.

- 207. Buenafe AC and Bourdette DN. *Lipopolysaccharide pretreatment modulates the disease course in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Journal of Neuroimmunology, 2007. **182**(1-2): p. 32-40. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2006.09.004.
- 208. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Gomez EC, Sweenie CH, Hao Y, Freitas AA, Steinhoff U, Anderton SM, and Fillatreau S. *TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity*. Journal of Immunology, 2008. **180**(7): p. 4763-4773.
- 209. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, Harris KA, Jones SA, Klein N, and Mauri C. *Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 beta and interleukin-6 production*. Nature Medicine, 2014. **20**(11): p. 1334-1339. DOI: 10.1038/nm.3680.
- 210. Yang M, Sun L, Wang S, Ko K-H, Xu H, Zheng B-J, Cao X, and Lu L. Cutting Edge: Novel Function of B Cell-Activating Factor in the Induction of IL-10-Producing Regulatory B Cells. Journal of Immunology, 2010. 184(7): p. 3321-3325. DOI: 10.4049/jimmunol.0902551.
- 211. Hua C, Audo R, Yeremenko N, Baeten D, Hahne M, Combe B, Morel J, and Daïen C. *A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells.* Journal of Autoimmunity, 2016. **73**: p.64-72. DOI: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.06.002</u>.
- 212. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ, and Tedder TF. *Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions*. Nature, 2012. 491(7423): p. 264-268. DOI: 10.1038/nature11501.
- 213. Sattler S, Ling G-S, Xu D, Hussaarts L, Romaine A, Zhao H, Fossati-Jimack L, Malik T, Cook HT, Botto M, Lau Y-L, Smits HH, Liew FY, and Huang F-P. *IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut*. Journal of Autoimmunity, 2014. **50**: p. 107-122. DOI: 10.1016/j.jaut.2014.01.032.
- 214. Tang Y, Jiang Q, Ou Y, Zhang F, Qing K, Sun Y, Lu W, Zhu H, Gong F, Lei P, and Shen G. *BIP induces mice CD19(hi) regulatory B cells producing IL-10 and highly expressing PD-L1, FasL.* Molecular Immunology, 2016. **69**: p. 44-51. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.10.017.
- 215. Park MJ, Lee SH, Kim EK, Lee EJ, Park SH, Kwok SK, and Cho ML. *Myeloid-derived suppressor cells induce the expansion of regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in Roquinsan/san mice, one of murine models of SLE*. Arthritis & Rheumatology, 2016. DOI: 10.1002/art.39767.
- 216. Carter NA, Rosser EC, and Mauri C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. Arthritis Research & Therapy, 2012. 14(1). DOI: 10.1186/ar3736.

- 217. Liu F, Dai W, Li C, Lu X, Chen Y, Weng D, and Chen J. Role of IL-10-producing regulatory B cells in modulating T-helper cell immune responses during silicainduced lung inflammation and fibrosis. Scientific reports, 2016. 6: p. 28911-28911. DOI: 10.1038/srep28911.
- Nouel A, Pochard P, Simon Q, Segalen I, Le Meur Y, Pers JO, and Hillion S. *B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner*. Journal of Autoimmunity, 2015. **59**: p. 53-60. DOI: 10.1016/j.jaut.2015.02.004.
- 219. Lal G, Kulkarni N, Nakayama Y, Singh AK, Sethi A, Burrell BE, Brinkman CC, Iwami D, Zhang T, Hehlgans T, and Bromberg JS. *IL-10 from marginal zone precursor B cells controls the differentiation of Th17, Tfh and Tfr cells in transplantation tolerance*. Immunology Letters, 2016. **170**: p. 52-63. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.01.002.
- 220. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu YX, Olcott A, and Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. Journal of Immunology, 2001. 167(2): p. 1081-1089.
- Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, and Mauri C. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting T(H)1 and T(H)17 Differentiation. Science Translational Medicine, 2013. 5(173). DOI: 10.1126/scitranslmed.3005407.
- 222. Mann MK, Maresz K, Shrives LP, Tan Y, and Dittel BN. *B cell regulation of CD4*(+)*CD25*(+) *T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis*. Journal of Immunology, 2007. **178**(6): p. 3447-3456.
- 223. Huarte E, Jun S, Rynda-Apple A, Golden S, Jackiw L, Hoffman C, Maddaloni M, and Pascual DW. Regulatory T Cell Dysfunction Acquiesces to BTLA(+) Regulatory B Cells Subsequent to Oral Intervention in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Journal of Immunology, 2016. **196**(12): p. 5036-5046. DOI: 10.4049/jimmunol.1501973.
- 224. Parekh VV, Prasad DVR, Banerjee PP, Joshi BN, Kumar A, and Mishra GC. *B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8(+) T cells: Role of TGF-beta 1.* Journal of Immunology, 2003. **170**(12): p. 5897-5911.
- Bankoti R, Gupta K, Levchenko A, and Staeger S. Marginal Zone B Cells Regulate Antigen-Specific T Cell Responses during Infection. Journal of Immunology, 2012. 188(8): p. 3961-3971. DOI: 10.4049/jimmunol.1102880.
- Morva A, Lemoine S, Achour A, Pers JO, Youinou P, and Jamin C. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. Blood, 2012. 119(1): p. 106-14. DOI: 10.1182/blood-2011-06-360768.

- Menon M, Blair PA, Isenberg DA, and Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. Immunity, 2016. 44(3): p. 683-697. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.012.
- 228. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, and Mauri C. Lipid-Antigen Presentation by CD1d(+) B Cells Is Essential for the Maintenance of Invariant Natural Killer T Cells. Immunity, 2012. 36(3): p. 477-490. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.02.008.
- 229. Neves P, Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Stervbo U, Shen P, Kuehl AA, Loddenkemper C, Haury M, Nedospasov SA, Kaufmann SHE, Steinhoff U, Calado DP, and Fillatreau S. *Signaling via the MyD88 Adaptor Protein in B Cells Suppresses Protective Immunity during Salmonella typhimurium Infection*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 777-790. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.10.016.
- 230. Rosser EC, Blair PA, and Mauri C. *Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression*. Molecular Immunology, 2014. **62**(2): p. 296-304. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.01.014.
- 231. Brodt P and Gordon J. Anti-tumor immunity in lymphocyte-B-deprived mice .1. Immunity to a chemically-induced tumor. Journal of Immunology, 1978. **121**(1): p. 359-362.
- 232. Qin ZH, Richter G, Schuler T, Ibe S, Cao XT, and Blankenstein T. *B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity*. Nature Medicine, 1998. **4**(5): p. 627-630. DOI: 10.1038/nm0598-627.
- 233. Shah S, Divekar AA, Hilchey SP, Cho HM, Newman CL, Shin SU, Nechustan H, Challita-Eid PM, Segal BM, Yi KH, and Rosenblatt JD. *Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: Inhibition of anti-tumor CTL and T(H)1 cytokine responses by B cells.* International Journal of Cancer, 2005. **117**(4): p. 574-586. DOI: 10.1002/ijc.21177.
- 234. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, Malchinkhuu E, Wersto RP, and Biragyn A. *Tumor-Evoked Regulatory B Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Converting Resting CD4(+) T Cells to T-Regulatory Cells*. Cancer Research, 2011. **71**(10): p. 3505-3515. DOI: 10.1158/0008-5472.can-10-4316.
- Zhang Y, Eliav Y, Shin SU, Schreiber TH, Podack ER, Tadmor T, and Rosenblatt JD. *B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion*. Cancer Immunology Immunotherapy, 2013.
 62(1): p. 87-99. DOI: 10.1007/s00262-012-1313-6.
- 236. Tadmor T, Zhang Y, Cho HM, Podack ER, and Rosenblatt JD. *The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model*. Cancer Immunology Immunotherapy, 2011. **60**(5): p. 609-619. DOI: 10.1007/s00262-011-0972-z.

- 237. Yang CM, Lee H, Pal S, Jove V, Deng JH, Zhang W, Hoon DSB, Wakabayashi M, Forman S, and Yu H. *B Cells Promote Tumor Progression via STAT3 Regulated-Angiogenesis*. Plos One, 2013. **8**(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0064159.
- 238. Schioppa T, Moore R, Thompson RG, Rosser EC, Kulbe H, Nedospasov S, Mauri C, Coussens LM, and Balkwill FR. *B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF-alpha during squamous carcinogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(26): p. 10662-10667. DOI: 10.1073/pnas.1100994108.
- 239. Wei X, Jin YQ, Tian YP, Zhang HY, Wu J, Lu W, and Lu XF. *Regulatory B cells contribute to the impaired antitumor immunity in ovarian cancer patients*. Tumor Biology, 2016. **37**(5): p. 6581-6588. DOI: 10.1007/s13277-015-4538-0.
- 240. Wang WW, Yuan XL, Chen H, Xie GH, Ma YH, Zheng YX, Zhou YL, and Shen LS. *CD19*(+)*CD24*(*hi*)*CD38*(*hi*)*Bregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 33486-33499. DOI: 10.18632/oncotarget.5588.
- 241. Shen M, Sun Q, Wang J, Pan W, and Ren X, *Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors*. Oncotarget, 2016. **7**(34): p. 55828-55839.
- 242. Wejksza K, Lee-Chang C, Bodogai M, Bonzo J, Gonzalez FJ, Lehrmann E, Becker K, and Biragyn A. Cancer-Produced Metabolites of 5-Lipoxygenase Induce Tumor-Evoked Regulatory B Cells via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha. Journal of Immunology, 2013. 190(6): p. 2575-2584. DOI: 10.4049/jimmunol.1201920.
- 243. Han S, Feng SZ, Ren ML, Ma EL, Wang XN, Xu LS, and Xu MH. *Glioma cellderived placental growth factor induces regulatory B cells*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014. **57**: p. 63-68. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.10.005.
- 244. Zhang Y, Morgan R, Chen C, Cai Y, Clark E, Khan WN, Shin S-U, Cho H-M, Al Bayati A, Pimentel A, and Rosenblatt JD. *Mammary-tumor-educated B cells acquire* LAP/TGF-β and PD-L1 expression and suppress anti-tumor immune responses. International Immunology, 2016. DOI: 10.1093/intimm/dxw007.
- 245. Zhang Y, Gallastegui N, and Rosenblatt JD. *Regulatory B cells in anti-tumor immunity*. International Immunology, 2015. **27**(10): p. 521-530. DOI: 10.1093/intimm/dxv034.
- 246. DiLillo D, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, Matsushita T, Matta KM, Chen Y, Venturi GM, Russo G, Gockerman JP, Moore JO, Diehl LF, Volkheimer AD, Friedman DR, Lanasa MC, Hall RP, and Tedder TF. *Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function*. Leukemia, 2013. **27**(1): p. 170-182. DOI: 10.1038/leu.2012.165.

- 247. Saulep-Easton D, Vincent FB, Quah PS, Wei A, Ting SB, Croce CM, Tam C, and Mackay F. *The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells*. Leukemia, 2016. **30**(1): p. 163-172. DOI: 10.1038/leu.2015.174.
- 248. Mohr A, Bordron A, Pers JO, and Jamin C. *Identification and role of human regulatory B lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2016. **101**: p. 721-721.
- 249. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. Methods, 2001. 25(4): p. 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- 250. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW, Ferrarini M, and Chiorazzi N. *Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors*. Journal of Clinical Investigation, 1998. 102(8): p. 1515-1525. DOI: 10.1172/jci3009.
- 251. van Dongen JJM, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuuring E, Garcia-Sanz R, van Krieken J, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, and Macintyre EA. *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2257-2317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.
- 252. Alamyar E, Duroux P, Lefranc M-P, and Giudicelli V. *IMGT() tools for the nucleotide* analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2012. **882**: p. 569-604. DOI: 10.1007/978-1-61779-842-9_32.
- 253. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albasiano E, Fais F, Yan XJ, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, and Chiorazzi N. *B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4087-4093. DOI: 10.1182/blood.V99.11.4087.
- 254. Laytragoon-Lewin N, Duhony E, Bai XF, and Mellstedt H. Downregulation of the CD95 receptor and defect CD40-mediated signal transduction in B-chronic lymphocytic leukemia cells. European Journal of Haematology, 1998. **61**(4): p. 266-271.
- 255. Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B, and Hallek M. *CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells.* Blood, 1999. **93**(6): p. 1992-2002.

- 256. VandenHove LE, VanGool SW, Vandenberghe P, Bakkus M, Thielemans K, Boogaerts MA, and Ceuppens JL. *CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules*. Leukemia, 1997. **11**(4): p. 572-580. DOI: 10.1038/sj.leu.2400598.
- 257. Scielzo C, Apollonio B, Scarfo L, Janus A, Muzio M, ten Hacken E, Ghia P, and Caligaris-Cappio F. *The functional in vitro response to CD40 ligation reflects a different clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2011. **25**(11): p. 1760-1767. DOI: 10.1038/leu.2011.149.
- 258. Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poeck H, Hartmann E, Jox R, Giese T, Emmerich B, Endres S, Weiner GJ, and Hartmann G. *B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(4): p. 1490-1499. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-04-1890.
- 259. Decker T, Schneller F, Hipp S, Miething C, Jahn T, Duyster J, and Peschel C. *Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27.* Leukemia, 2002. **16**(3): p. 327-334. DOI: 10.1038/sj.leu.2402389.
- 260. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, Sica S, Leone G, and Efremov DG. *The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease*. Leukemia, 2007. **21**(1): p. 110-120. DOI: 10.1038/sj.leu.2404417.
- 261. Buhtoiarov IN, Lum HD, Berke G, Sondel PM, and Rakhmilevich AL. *Synergistic activation of macrophages via CD40 and TLR9 results in T cell independent antitumor effects*. Journal of Immunology, 2006. **176**(1): p. 309-318.
- 262. Ozcan E, Rauter I, Garibyan L, Dillon SR, and Geha RS. *Toll-like receptor 9, transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor, and CD40 synergize in causing B-cell activation*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011. **128**(3): p. 601-609. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.04.052.
- 263. Morbach H, Schickel JN, Cunningham-Rundles C, Conley ME, Reisli I, Franco JL, and Meffre E. *CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016. **137**(3): p. 889-898. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.08.040.
- 264. Ren CL, Morio T, Fu SM, and Geha RS. *Signal-transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C-gamma-2.* Journal of Experimental Medicine, 1994. **179**(2): p. 673-680. DOI: 10.1084/jem.179.2.673.
- 265. Medzhitov R. *Toll-like receptors and innate immunity*. Nature Reviews Immunology, 2001. **1**(2): p. 135-145. DOI: 10.1038/35100529.

266. Kawagoe T, Takeuchi O, Takabatake Y, Kato H, Isaka Y, Tsujimura T, and Akira S. *TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis*. Nature Immunology, 2009. **10**(9): p. 965-972. DOI: 10.1038/ni.1771.

<u>Caractérisation des lymphocytes B régulateurs dans la Leucémie</u> <u>Lymphoïde Chronique</u>

Contexte: La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne associée à des anomalies dans les réponses immunitaires. Ce qui contribue à la progression de la maladie. Certains LB peuvent induire une inhibition de la réponse anti-tumorale des LT et ainsi promouvoir la progression des tumeurs. Ces LB appelés LB régulateurs partagent des caractéristiques communes avec les LB de LLC.

<u>Objectif</u>: L'objectif principal de ce projet est d'évaluer la fonction régulatrice des LB de LLC, afin d'estimer leur influence sur l'absence de réponses anti-tumorales par les cellules T.

<u>Méthode</u>: Des modèles de co-culture *in vitro* ont été développés pour évaluer la capacité des LB à inhiber la prolifération des LT.

<u>Résultats</u>: Nos résultats montrent qu'en absence de stimulation, les LB de LLC sont incapables d'inhiber la prolifération des LT contrairement aux LB de témoins. Cependant, deux groupes de patients ont été identifiés après stimulation du TLR-9 des LB. Dans le premier groupe, les LB présentent des fonctions régulatrices défectueuses par rapport aux LB de témoins. Dans le second groupe, aucune activité inhibitrice n'est détectée. L'expression différentielle des gènes associés à la voie TLR-9 entre les deux groupes de patients semble pouvoir expliquer cette dichotomie de réponse. Une corrélation a par ailleurs été retrouvée entre le doublement lymphocytaire et la faible activité régulatrice des LB de LLC.

Conclusion: Pour aller plus loin, il convient d'identifier les mécanismes moléculaires endommageant la voie TLR-9. Ces nouvelles données aideront à la compréhension de l'absence de réponse anti-tumorale et des dysfonctionnements immunitaires retrouvés chez les patients.

Mots-clés : lymphocytes B régulateurs, TLR-9, LLC

<u>Characterization of human regulatory B cells in Chronic Lymphocytic</u> <u>Leukemia</u>

Background: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by expansion of CD5+ B cells associated with disruption of immune responses, contributing to the immunodeficiency and the disease progression. Regulatory B (Breg) cells may control the anti-tumor responses favoring tumor escape. Intriguingly, CLL B cells share phenotypical characteristics with these cells.

<u>Aims</u>: The main focus of this project is to evaluate the regulatory function of CLL B cells, aiming to estimate their influence on the lack of anti-tumor responses mediated by T cells.

<u>Methods</u>: *In vitro* models of co-cultures between T and B cells are used to appraise the regulatory capacity of CLL B cells on T cell proliferation.

<u>Results</u>: We determined a defective spontaneous regulatory function for CLL B cells. Two groups of patients have been identified following CpG-ODN stimulation. The first group presents defective regulatory B cell functions compared with control B cells. In the second group, no inhibitory activity is detected. TLR-9 gene expression analysis highlighted differential gene expression between controls and the two groups of CLL patients. Moreover, ours observations indicate that patients with low Breg activity have more aggressive disease.

Conclusion: These results suggest alteration of the TLR-9 pathway in CLL B cells. To go further, it will be of interest to identify the molecular mechanisms damaging the TLR-9 pathway. These results would contribute to clarify the lack of anti-tumor immune response found in the CLL patients.

Keywords: regulatory B cells, TLR-9, CLL