

UNIVERSITE PARIS 13
UFR SANTE-MEDECINE-BIOLOGIE HUMAINE

ECOLE DOCTORALE GALILEE

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Anne QUINQUENEL

Le 09 mars 2018

**Analyse des sous-populations lymphocytaires B dans la
leucémie lymphoïde chronique et de l'impact de l'ibrutinib
sur ces sous-populations**

Directeur de thèse : Dr. Christine Le Roy
Co-directeur de thèse : Dr. Nadine Varin-Blank

Membres du jury

Pr. Sophie RAYNAUD

Rapporteur

Dr. Christophe JAMIN

Rapporteur

Dr. Anne-Sophie MICHALLET

Examineur

Pr. Alain DELMER

Examineur

Dr. Nadine Varin-Blank

Co-directeur

Dr. Christine Le Roy

Directeur

Remerciements

A Madame le Professeur Sophie Raynaud

Je suis très honorée que vous ayez accepté de juger mon travail de thèse et d'en être le rapporteur.

A Monsieur le Docteur Christophe Jamin

Recevez mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de juger mon travail de thèse et d'en être le rapporteur.

A Madame le Docteur Anne-Sophie Michallet

Je te remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, et j'espère pouvoir continuer à travailler longtemps à tes côtés au sein du groupe FILO-LLC

A Monsieur le Professeur Alain Delmer

Merci de m'avoir transmis votre passion pour l'hématologie, de m'avoir fait confiance et d'avoir soutenu mes projets. Travailler à vos côtés est un honneur.

A Madame le Docteur Nadine Varin-Blank

Je te remercie de m'avoir accueillie au laboratoire dès mon stage de Master 2, de m'avoir transmis ta passion pour la recherche et de m'avoir convaincue d'effectuer cette thèse. Je te remercie également d'avoir permis la création de liens très forts entre les jeunes hématologues rémois et les membres du laboratoire.

A Madame le Docteur Christine Le Roy

Chère Christine, un grand merci pour tout ce que tu m'as apporté depuis mes premiers pas au laboratoire. Tu as su me transmettre à la fois ta curiosité et ta rigueur scientifiques. J'ai vraiment apprécié nos échanges, et tu as su me pousser pour mieux avancer. Merci enfin pour ta tolérance, ton écoute, et ton soutien dans les moments un peu plus difficiles.

Un grand merci

A toute l'équipe « LLC » :

Au Professeur Florence Cymbalista : merci de croire en moi, de m'avoir incitée à faire cette thèse, et de m'avoir remis sur un vélo (mais toujours avec un casque).

Au Professeur Vincent Levy : merci de m'écouter râler, et de me faire part de tes considérations sur la psychanalyse. Nos conversations du relais H vont me manquer.

A Maïssa : merci pour les chaussons aux pommes en sortie de garde, un bonhomme de neige ? A Laure : merci pour ton aide pour les « panels », et n'oublie pas, tu peux courir 10 km. On retourne manger des glaces (café, amande, pistache) à Florence quand vous voulez !

A Stéphanie, pour le tant attendu CLL meeting et le « 6 million PBMC in 1.5 ml (one point five, avec l'accent) ». A Amel, à Souhail, Rim... good luck pour la suite les amis !

A Laura : quel honneur pour moi de connaître une personne capable de dessiner le tryptophane (mais pourquoi un W ?) et le cycle de Krebs par cœur ! Oui, je sais, tu me répondrais probablement « whatever »....

Et au Canto 2, on en a passé du temps ensemble...

Aux autres membres de l'UMR/U978 :

A Lionel, qui a finalement adopté des rémois qui en plus sont médecins.... Comme quoi tout peut changer dans la vie !

A Betty, pour nos sorties du jeudi soir au musée d'Art Moderne...

A toutes mes collègues dans l'aventure du doctorat, Ranesha, ma voisine de bureau, Vanessa, Lamia, Anouchka, Rim avec qui j'ai passé de bons moments....

A Fanny, merci de m'avoir associée à votre projet sur le lymphome à cellules du manteau.

A Dominique, Denis, Laura V, Bela pour nos échanges.

A Sophie et Hugo, mes deux jeunes padawans qui sont venus vivre l'aventure du M2, que la force soit avec vous !

Aux membres des services d'Hématologie clinique et biologique du CHU de Reims :

A mes collègues Brigitte, Chantal, Eric, Quoc-Hung : merci de m'avoir soutenue dans ce projet (et d'avoir consciencieusement fait prélever vos patients sous ibrutinib).

A Pascale, qui a permis ce travail grâce à l'implication de la tumorothèque, et qui est toujours prête à m'aider...

A KL, pour l'ensemble de ton œuvre...

A Mélanie et à Marie, sans oublier Baptiste.

A mes ami(e)s

Anne-Carole, Mylène, Véronique, Damien. Merci de prendre soin de moi ! On retourne quand à Hawaii ?

A Wendy, qui a réussi à me convaincre que la Normandie c'est bien aussi.

Et enfin à ma famille

A mes parents, qui ont toujours soutenu mes choix, quels qu'ils soient. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée pendant cette période, et pour avoir fait de moi ce que je suis.

A Maud, my twin sister, merci d'être là, toujours ! Et enfin à ma petite Alix, je ferai tout pour être une tante et une marraine à la hauteur !

Table des matières

Remerciements.....	2
Table des matières.....	5
Abréviations.....	7
Introduction.....	10
1. Développement lymphocytaire B normal.....	10
1.1 <i>Maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse</i>	11
1.2 <i>Maturation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires</i>	13
1.2.1 <i>Devenir des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires</i>	13
1.2.2 <i>Structure ganglionnaire et maturation folliculaire</i>	14
1.2.3 <i>Trafic ganglionnaire</i>	17
1.3 <i>Signalisation du BCR</i>	19
1.4 <i>Les lymphocytes B régulateurs</i>	21
1.4.1 <i>Généralités et définitions</i>	21
1.4.2 <i>Mécanismes d'action des lymphocytes B régulateurs</i>	23
1.4.3 <i>Lymphocytes B régulateurs et pathologies</i>	25
2. Généralités sur la leucémie lymphoïde chronique.....	27
2.1 <i>Les syndromes lymphoprolifératifs B</i>	27
2.2 <i>Définition et épidémiologie de la leucémie lymphoïde chronique</i>	28
2.3 <i>Diagnostic de leucémie lymphoïde chronique</i>	29
3. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique.....	31
3.1 <i>Origine de la cellule leucémique</i>	31
3.2 <i>Importance de la signalisation du BCR dans la LLC</i>	33
3.3 <i>Rôle du microenvironnement ganglionnaire</i>	34
3.3.1 <i>Trafic ganglionnaire dans la LLC</i>	35
3.3.2 <i>Interactions entre les cellules de LLC et les cellules du microenvironnement</i>	35
4. Dysfonctions immunitaires dans la leucémie lymphoïde chronique.....	39
4.1 <i>Immunodépression</i>	39
4.2 <i>Complications auto-immunes</i>	40
5. Facteurs pronostiques.....	41
5.1 <i>Paramètres anatomo-cliniques</i>	42
5.2 <i>Marqueurs de prolifération</i>	42
5.3 <i>Anomalies cytogénétiques</i>	43
5.4 <i>Statut mutationnel du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines</i>	44
5.5 <i>Marqueurs immunophénotypiques</i>	44
5.6 <i>Anomalies moléculaires</i>	45
6. Traitement de la leucémie lymphoïde chronique.....	46
6.1 <i>Immuno-chimiothérapie</i>	46
6.2 <i>Thérapies ciblées</i>	47
7. Mécanismes d'action de l'Ibrutinib.....	49
7.1 <i>Btk et signalisation</i>	49
7.1.1 <i>Structure de Btk</i>	49
7.1.2 <i>Btk et signalisation</i>	51

7.2	<i>Mode d'action de l'ibrutinib et résistance</i>	52
7.3	<i>Mécanismes d'action de l'ibrutinib dans la LLC</i>	53
7.3.1	<i>Prolifération et survie</i>	53
7.3.2	<i>Ibrutinib, adhésion et migration cellulaire</i>	54
7.3.3	<i>Impact de l'ibrutinib sur les lymphocytes T</i>	55
7.3.4	<i>Impact de l'ibrutinib sur les cellules stromales</i>	56
	Objectifs	57
	Résultats	58
	Manuscrit 1 : Les sous-populations de lymphocytes B immuno-régulateurs jouent un rôle majeur dans la progression de la LLC.....	58
	Manuscrit 2 : Les cellules productrices d'IL-10 possèdent des caractéristiques communes avec celles de la fraction proliférative et sont la cible précoce d'un traitement par ibrutinib des patients LLC.	108
	Résultats complémentaires	128
	Discussion et perspectives	131
1.	Caractérisation des sous-populations B régulatrices dans la LLC.....	131
2.	Impact de l'ibrutinib sur les sous-populations lymphocytaires B	138
	Annexes	143
	Bibliographie	197

Abréviations

ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
Ag	Antigène
AHAI	Anémie hémolytique auto-immune
AKT	Protéine kinase B
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
ATM	Ataxia Telangectasia Mutated
BAFF	B cell activating factor
BCR	B-cell Receptor
BFA	Brefeldine A
BLNK	B-cell Linker
Breg	Lymphocyte T régulateur
Btk	Bruton Tyrosine Kinase
B10	lymphocytes B capables de sécréter de l'IL10
B10pro	B1 progéniteur
CD	Cluster Differentiation
CDR3	Complementary Determining Region-3
CG	Centre Germinatif
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CCL3	CC-Motif Ligand 3
CCL4	CC-Motif Ligand 4
CCL19	CC-Motif Ligand 19
CCL21	CC-Motif Ligand 21
CCR7	CC- Motif Receptor 7
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CTLA-4	Cytotoxic T –Lymphocyte associated protein- 4
CXCL12	CXC-Motif Ligand 12
CXCL13	CXC-Motif Ligand 13
CXCR4	CXC-Motif Receptor 4
CXCR5	CXC-Motif Receptor 5
DAG	DiAcylGlycerol
DC	Cellules Dendritiques
Erk	Extracellular signal-regulated Kinase
FISH	Fluorecent in-situ Hybridization
FDC	Cellules Dendritiques Folliculaires
FOXP3	Forkhead lineage-transcription factor
FRC	Cellules Réticulaires Fibroblastiques
GRZB	Granzyme B

HEV	High Endothelial Venule
ICAM-1	IntraCellular Adhesion Molecule – 1
IDO	Indoléamine 2,3 dioxygenase
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IgHV	Ig Heavy Variable Region
IL	Interleukine
IP3	Inositol 1,4,5 triPhosphate
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
ITK	Interleukine 2-inducible Kinase
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
LFA-1	Lymphocyte function Associated - 1
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LLC-M	Leucémie Lymphoïde Chronique – statut IgHV « muté »
LLC-NM	Leucémie Lymphoïde Chronique – statut IgHV « non muté »
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MBL	Lymphocytose B monoclonale
Myd88	Myeloid differnciation primary response 88
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-B
NK	Natural Killer
NLC	Nurse like cells
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PD1	Programmed Death 1
PD1-L	Programmed Death 1 - Ligand
PH	Pleckstrine Homology domain
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIB	PMA, Ionomycine, Brefeldine A
PLC γ 2	PhosphoLipase C gamma 2
PMA	Phorbol 12 Myristate 13-Acetate
PR	Domaine riche en prolines
pre-B	Précurseur des cellules B
pro-B	Progéniteur des cellules B
PtdInsP $_3$	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate
RAG	Recombination activating gene
RLK	Resting Lymphocyte Kinase
S1P	Sphingosine-1-phosphate

S1PR1	Récepteur 1 de la Sphingosine-1-phosphate
SDF-1	Stromal cell Derived Factor 1
SH2	Src Homology 2
SH3	Src Homology 3
Shp1	Src homology 2 domain-containing phosphatase 1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
TCR	Récepteur des Cellules T
TFH	Cellule T Folliculaire Helper
TGF β	Transforming growth factor beta
TH	Tec Homology domain
Th1	T helper 1 cell
Th2	T helper 2 cell
Th17	T helper 17 cell
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Lymphocyte t régulateur
VLA-4	Very Late Antigen-4
ZAP 70	Zeta-chain-Associated Protein kinase of 70 kDa

Introduction

1. Développement lymphocytaire B normal

Les lymphocytes B (Bursal ou Bone marrow-derived lymphocyte) sont des acteurs majeurs de l'immunité, et particulièrement de l'immunité humorale. Comme toutes les cellules du système hématopoïétique, ils dérivent de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui suivront plusieurs étapes de prolifération et de différenciation. La première étape siège dans la moelle osseuse (MO), est indépendante de l'antigène, et conduit à la production de lymphocytes B naïfs (ou lymphocytes B immatures). La poursuite de la différenciation et de la maturation s'effectue dans les organes lymphoïdes secondaires qui, elle, est dépendante de la présentation antigénique (figure 1) (1).

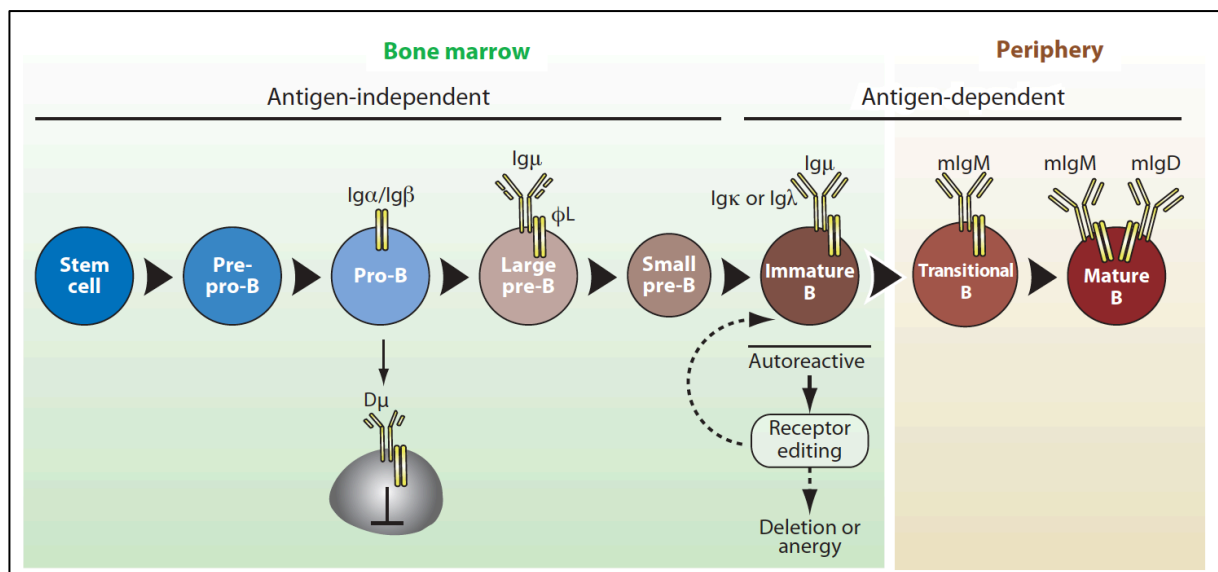


Figure 1. Lymphopoïèse B (adapté de Kurosaki, 2010) (1).

Les différentes étapes de la différenciation des lymphocytes B et du réarrangement des gènes des chaînes lourdes ($Ig\mu$) et des chaînes légères ($Ig\kappa$ ou $Ig\lambda$) des immunoglobulines sont schématisées. ΦL : pseudo-chaîne légère composée de $Vpr\acute{e}B$ et $\lambda 5$.

1.1 Maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse

L'engagement de la CSH dans la voie de différenciation lymphocytaire conduit tout d'abord à la formation de progéniteurs lymphoïdes communs qui sont capables de reconstituer de façon restreinte la lignée lymphoïde (lymphocytes T, B et NK) (2). Les populations les plus immatures engagées dans la différenciation B sont appelées les pro-pré-B. A ce stade, elles ne possèdent pas de récepteur B à l'antigène (BCR), et les différentes étapes successives, notamment grâce aux réarrangements séquentiels des gènes codant pour l'immunoglobuline, permettent la formation d'un BCR fonctionnel spécifique d'un antigène. Le BCR est composé d'une immunoglobuline (Ig) de surface, qui est constituée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères assemblées par des ponts disulfure, et de deux sous-unités de signalisation transmembranaires $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ (CD79A et B, respectivement). Chaque chaîne de l'immunoglobuline se compose d'un domaine constant (C) et d'un domaine variable (V). La région variable des chaînes lourdes comporte des régions appelées Variable (V), Diversité (D) et Jonctionnelle (J) ($V_H D_H J_H$), alors que la région variable des chaînes légères ne contient que les régions V et J ($V_L J_L$). Les sous-unités $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ forment un hétérodimère associé de façon non covalente. Chaque sous-unité contient, dans sa partie cytoplasmique, un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) nécessaire à la signalisation du BCR (figure 2).

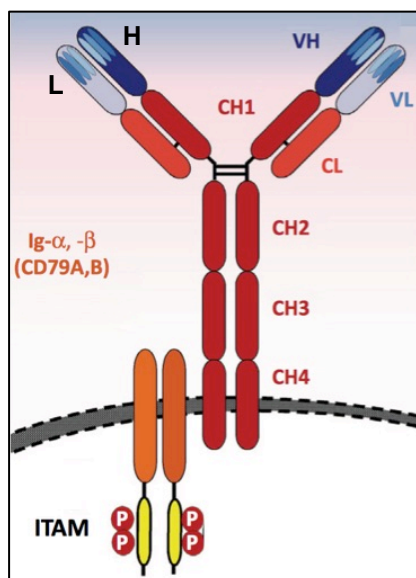


Figure 2. Structure globale du BCR (adapté de Burger et Chiorrazi 2013) (3).

Le BCR est composé d'une immunoglobuline de surface permettant la liaison de l'antigène et de deux sous-unités $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ concédant la propagation du signal. L'immunoglobuline est composée de deux chaînes lourdes (H) comprenant chacune 4 parties constantes (CH 1-4) et une partie variable (VH) et deux chaînes légères (L) comprenant chacune une région constante (CL) et une région variable (VL).

Le premier réarrangement intervient au niveau du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines au stade pro-B et fait intervenir les protéines Rag1 et Rag2 (Recombination activating gene 1 et 2). La première étape de ce réarrangement consiste à joindre un segment D à un segment J avec excision des régions intermédiaires d'ADN. Puis la seconde étape du réarrangement est effectuée entre un segment V et le complexe DJ. Ces deux étapes conduisent, si ce réarrangement est fonctionnel, à la synthèse d'une chaîne lourde d'isotype μ et à l'arrêt de la recombinaison VDJ (figure 3). Si le réarrangement n'est pas productif, un second réarrangement VDJ aura lieu sur le deuxième chromosome. Si aucun des deux n'est fonctionnel, la cellule entrera en apoptose (4, 5). Le mécanisme d'arrêt de la recombinaison dès la synthèse d'une chaîne μ fonctionnelle est appelé exclusion allélique, permettant l'expression d'un gène d'Ig issu d'un seul allèle parental.

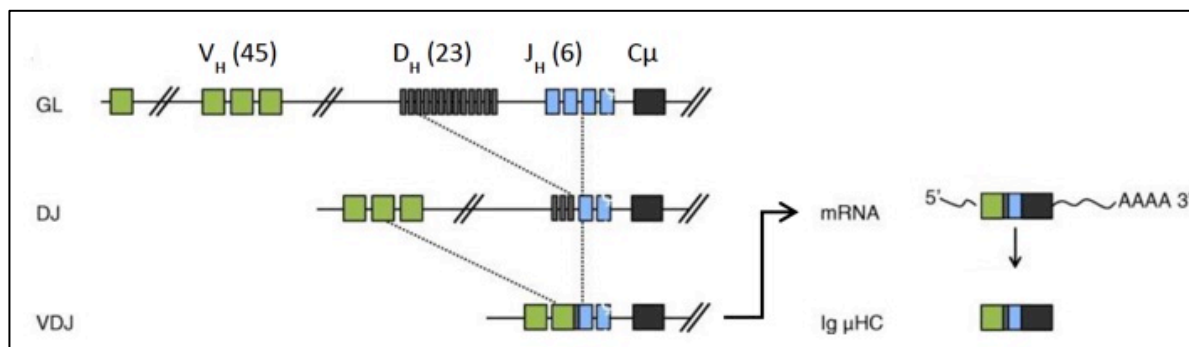


Figure 3. Réarrangement du gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines (adapté de Martensson 2010) (5).

Structure du gène codant pour les chaînes lourdes d'immunoglobulines à l'état non fonctionnel (GL pour Germline) puis étapes de la recombinaison DJ puis VDJ.

Après le réarrangement VDJ, au stade pré-B, la chaîne μ est associée à une pseudo-chaîne légère (ou surrogate light chain) formée par la liaison non covalente de deux protéines VpréB et $\lambda 5$ et aux sous-unités Ig α et Ig β pour former un pré-BCR. Les cellules stromales transmettent aux cellules B des signaux de survie *via* leur pré-BCR, et seuls les lymphocytes pré-B avec un pré-BCR fonctionnel entreront dans une phase d'expansion clonale. Cette étape s'appelle la sélection positive. Suivront ensuite le réarrangement VJ des chaînes légères, de nouveau sous la dépendance des protéines Rag1 et Rag2, puis le processus d'exclusion allélique, conduisant à la synthèse d'une seule chaîne légère. La chaîne légère produite s'associe alors à la chaîne μ pour former une IgM de surface complète. Cette IgM

fonctionnelle permet la transition des cellules B au stade suivant avec l'apparition de lymphocytes B immatures. A cette étape également, les lymphocytes B dont le BCR n'est pas fonctionnel seront éliminés (6).

Une dernière étape fondamentale pour la tolérance au soi, appelée sélection négative, a lieu dans la moelle osseuse. Cette sélection n'est possible qu'en présence de cellules stromales exprimant à leur surface des peptides du soi couplés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ; elle est indispensable à l'élimination des lymphocytes B auto-réactifs. Les cellules B qui reconnaissent le peptide avec une haute affinité sont considérées comme des cellules B autoréactives et reçoivent un signal de mort cellulaire ou sont resoumises à une nouvelle étape de recombinaison pour générer une nouvelle chaîne légère. Les cellules B incapables d'interagir avec le CMH reçoivent également un signal de mort. Enfin, les cellules qui survivent à ce processus quittent la MO et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires.

1.2 Maturation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires

1.2.1 Devenir des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires

En sortant de la MO, les cellules B immatures colonisent la rate, les ganglions lymphatiques et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Parmi ces cellules, appelées lymphocytes B transitionnels, seules celles qui rencontrent leur antigène spécifique deviennent des lymphocytes B matures, les autres entrant en apoptose. Les cellules B matures se divisent en 3 sous-types, qui varient en fonction du type d'antigène rencontré, et de la coopération ou non avec les lymphocytes T. Les plus fréquents sont les lymphocytes folliculaires (80% des lymphocytes B matures), qui sont soit circulants, soit situés dans les follicules de la rate ou des ganglions lymphatiques (figure 4), et dont la maturation fera l'objet d'un chapitre spécifique (cf chapitre 1.2.2). Les lymphocytes B de la zone marginale de la rate sont concentrés dans la zone du même nom de cet organe qui est située à la frontière entre la pulpe blanche et la pulpe rouge (figure 4), après une rencontre avec un antigène thymo-indépendant (ne nécessitant pas l'intervention d'un lymphocyte T auxiliaire pour induire une réponse). Enfin, les cellules B1 représentent environ 5% du nombre total de cellules B et sont retrouvées dans la rate, l'intestin et les cavités pleurale et péritonéale. Même si leur origine demeure controversée, tout comme les lymphocytes B de la zone marginale, ces

cellules répondent principalement à des antigènes indépendamment des lymphocytes T et jouent un rôle dans l'immunité innée. La capacité de signalisation du BCR diffère également entre les 3 sous-groupes : le développement des B1 requiert le plus fort signal, les lymphocytes folliculaires requièrent un signal intermédiaire et les lymphocytes de la zone marginale requièrent le plus faible signal (7-10).

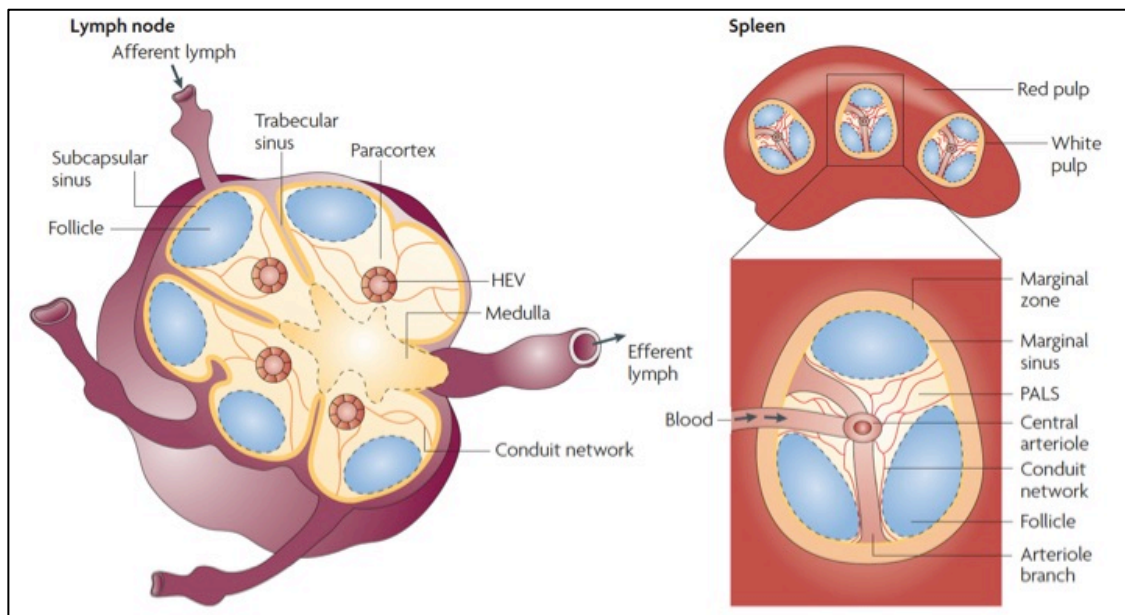


Figure 4. Représentation schématique d'un ganglion lymphatique et de la rate (adapté de Batista, 2019) (8). Le ganglion lymphatique est constitué de 3 zones : la médulla, le paracortex (ou zone T) et les follicules (ou zone B). La rate est constituée de 2 zones : la pulpe rouge et la pulpe blanche qui contient le paracortex, les follicules et la zone marginale.

1.2.2 Structure ganglionnaire et maturation folliculaire

Le ganglion lymphatique a une architecture hautement organisée et est schématiquement composé de deux zones avec la médulla au centre et le cortex en périphérie. Le cortex est constitué de follicules (ou zone B) et du paracortex (ou zone T). Les follicules sont particulièrement riches en cellules B et en cellules folliculaires dendritiques (FDC) qui présentent des antigènes et transmettent des signaux de survie aux lymphocytes B. Ils sont entourés par du paracortex dans lequel sont retrouvés notamment les lymphocytes T, les vaisseaux de cellules endothéliales spécialisées (HEV pour High Endothelial Venules) et les

cellules réticulaires fibroblastiques (FRC). Les vaisseaux HEV permettent l'entrée des lymphocytes dans les ganglions. Les FRC, quant à elles, forment un réseau qui permet la circulation des lymphocytes et des cellules dendritiques issues du sang mais également d'antigènes solubles et de chimiokines à l'intérieur de conduits. Le ganglion est aussi irrigué par un réseau lymphatique qui comprend un vaisseau afférent suivi d'un réseau complexe de sinus se rejoignant dans la medulla ; cette dernière contenant également de nombreuses cellules phagocytaires telles des macrophages et des cellules dendritiques. Le liquide lymphatique est ensuite filtré et drainé par un vaisseau efférent (figure 4) (11).

Après leur entrée dans les follicules, les cellules B immatures migrent au sein du réseau folliculaire où elles rencontrent leur antigène spécifique et achèvent leur maturation. Cet antigène peut être soit soluble (principalement les antigènes de poids moléculaire inférieur à 70 kDa), soit présenté par une cellule présentatrice de l'antigène (CPA), qui représente la forme d'activation la plus efficace. Après cette reconnaissance, le complexe BCR-antigène est internalisé puis l'antigène est dégradé en de multiples peptides dans des vésicules endosomales. L'un de ces peptides est ensuite présenté à la surface du lymphocyte B *via* le CMH et reconnu par un lymphocyte T spécifique de l'antigène. Cette interaction lymphocytaire B-T est renforcée par une liaison entre le CD40, constitutivement exprimé à la surface des lymphocytes B, et son ligand, le CD40L présent à la surface des lymphocytes T ainsi activés. Ce signal permet l'activation des lymphocytes B qui prolifèrent au sein d'une structure spécifique de l'activation lymphocytaire B T-dépendante appelée centre germinatif (CG) (11, 12).

Les CG sont divisés en une zone claire et une zone sombre. La zone claire, qui est la plus proche du sinus sous-capsulaire et de la zone marginale, est constituée de cellules folliculaires dendritiques (FDC) présentatrices d'antigènes et de centrocytes. La zone sombre, quant à elle, est occupée principalement par les centroblastes. Brièvement, suite à leur entrée dans le centre germinatif, les cellules B gagnent rapidement la zone sombre où elles prolifèrent et sont soumises au processus d'hypermutation somatique qui implique l'enzyme AID (Activation Induced cytidine Deaminase) et l'ADN polymérase η . Ce processus induit des mutations ponctuelles dans les régions des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines déjà réarrangés, modifiant ainsi l'affinité de liaison du BCR pour l'antigène. Ces cellules, appelées centroblastes, sont maintenues dans la zone sombre, notamment grâce à leur fort niveau d'expression du récepteur à la chimiokine CXCL12, le

CXCR4 (13). Les cellules ayant subi des mutations qui altèrent l'expression du récepteur les rendant incapables de répondre à un signal déclenché par leur BCR sont éliminées. Après un, voire plusieurs cycles de division/hypermutation, les cellules B fonctionnelles sortent du cycle cellulaire et migrent vers la zone claire en suivant un gradient de chimiokines, dont celui du CXCL13 grâce à une augmentation de l'expression membranaire du CXCR5 (13). Dans la zone claire, les cellules B vont tout d'abord interagir avec les FDC. Les FDC émettent également un signal de survie qui se traduit notamment par une activation de la signalisation dépendante du facteur BAFF (B-cell Activating Factor) et présentent des antigènes aux lymphocytes B. Seules les cellules B, appelées centrocytes et dotées d'un BCR de haute affinité pour l'antigène, sont sélectionnées positivement et poursuivent leur maturation. Cette sélection compétitive s'explique par le fait que seules les cellules B « les plus affines » captent et accumulent une grande quantité d'un antigène donné. Après internalisation et procession, les antigènes associés au CMH sont présentés à un nombre limité de lymphocytes T spécifiques de l'antigène, appelés lymphocytes T folliculaires auxiliaires (TFH), et seuls les lymphocytes B avec le plus grand nombre de complexe antigène-CMH interagissent avec les TFH et maintiennent leur activation. Ensuite, les cellules B ainsi sélectionnées suivent deux voies différentes, soit revenir vers la zone claire pour être soumises à un nouveau cycle de prolifération/hypermutation grâce à la réexpression du CXCR4, soit subir la commutation de classe des immunoglobulines, placée sous le contrôle de l'enzyme AID, avant de poursuivre leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et potentiellement en lymphocytes B mémoires (figure 5) (14-16).

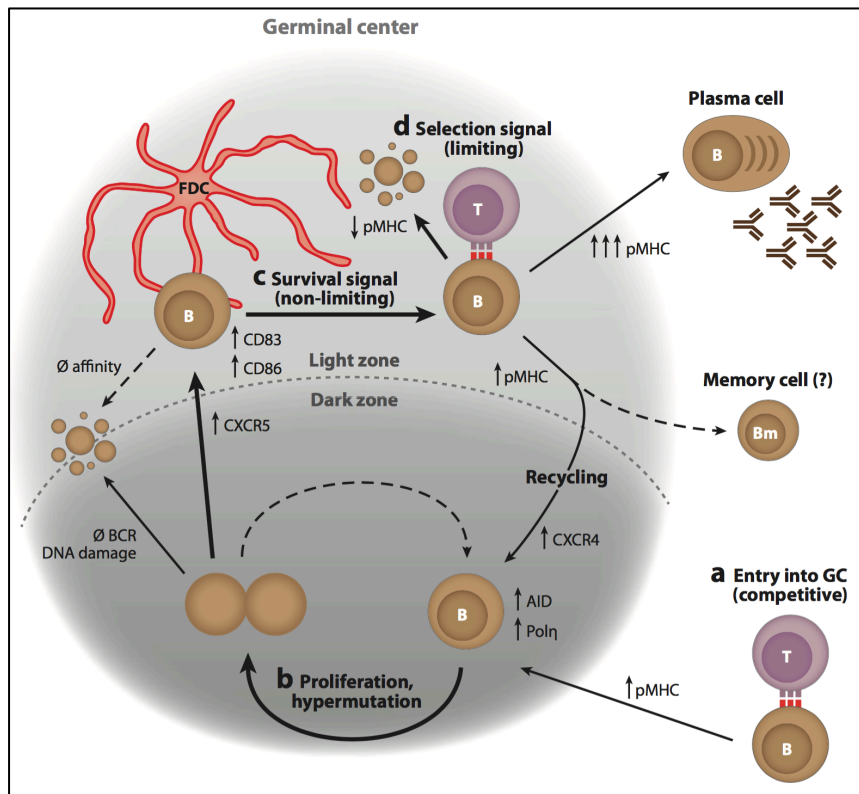


Figure 5. Sélection et maturation des lymphocytes B dans le centre germinatif (adapté de Victora et al, 2012) (14).

a : entrée des lymphocytes B dans le centre germinatif. **b** : prolifération et hypermutations somatiques des centroblastes dans la zone sombre avant leur migration dans la zone claire. **c** : émissions de signaux de survie par les FDC et les TFH aux centrocytes de plus haute affinité dans la zone claire. **d** : sélection compétitive par les TFH des centrocytes exprimant les BCR de haute affinité. Le devenir des lymphocytes B sélectionnés consiste soit en un retour dans la zone claire pour un nouveau cycle de prolifération/hypermutation, soit en une commutation de classe permettant une différenciation en lymphocyte mémoire ou en plasmocyte.

1.2.3 Trafic ganglionnaire

Entrée dans le ganglion

L'entrée des lymphocytes B dans le ganglion lymphatique est appelée « homing » et comporte 4 étapes successives (figure 6) :

- le roulement (rolling) est initié par l'interaction faible entre un récepteur de type L-selectine (CD62L), qui est exprimé spécifiquement par les lymphocytes B, et des glycoprotéines, qui sont quant à elles exprimées spécifiquement par les HEV (PNAd). Ce processus permet aux lymphocytes de « rouler » le long des HEV à la recherche d'un site leur permettant de traverser la barrière endothéliale.

- l'interaction entre la chimiokine CCL21, sécrétée par les vaisseaux HEV, et le récepteur CCR7, exprimé à la surface des lymphocytes B, ainsi que la liaison entre la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1 pour Stromal Cell-Derived Factor-1), sécrétée par les cellules stromales ganglionnaires, et le récepteur CXCR4 lymphocytaire, conduisent à l'activation des lymphocytes B.
- l'arrêt ou adhésion met en jeu une interaction de plus forte intensité entre les intégrines VLA-4 (Very Late Antigen-4) et LFA-1 (Lymphocyte Function-Associated-1) exprimées par les lymphocytes B et leurs ligands respectifs, VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) et ICAM (Intercellular Adhesion Molecule), présents sur les cellules endothéliales. Il est important de noter que l'intégrine VLA-4 est constituée de 2 sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 1$, également respectivement nommées CD49d et CD69.
- enfin, la traversée de l'endothélium, appelée transmigration, est régulée par l'existence d'un gradient de chimiokines. L'interaction entre les récepteurs de chimiokines (CXCR4 et CXCR5) exprimés à la surface des lymphocytes B et leurs chimiokines respectives, à savoir CXCL12 et CXCL13 principalement sécrétées par les cellules stromales ganglionnaires assure l'entrée des cellules B dans le ganglion par diapédèse à travers les jonctions inter-endothéliales (17-19).

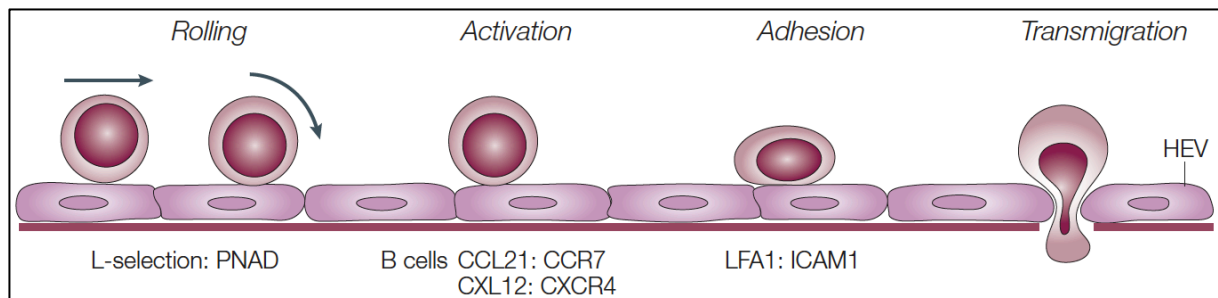


Figure 6. Entrée des lymphocytes dans le ganglion (adapté de Von Andrian et al, 2003) (18).

Les lymphocytes B initient le processus de roulement grâce à une interaction faible entre CD62L et PNA_d. La présence de chimiokines à la surface des HEV telles que CCL21 et CXCL12 entraîne l'activation des lymphocytes B qui adhèrent et s'arrêtent grâce à une liaison entre les intégrines VLA-4 et LFA-1 et leurs ligands respectifs. Enfin, la transmigration est régulée par un gradient de différentes chimiokines.

Trafic intra-ganglionnaire

Suite à la transmigration, les lymphocytes sont transportés vers le paracortex (lymphocytes T) ou les follicules (lymphocytes B) en suivant un gradient de chimiokines circulant dans les conduits formés par les FRC. Ces dernières forment deux types de conduits tels que les conduits corticaux, qui transportent le CXCL13 sécrété par les FDC et qui attirent les lymphocytes B dans les follicules, et les conduits paracorticaux, qui véhiculent le CCL19 et le CCL21 et qui conduisent les lymphocytes T et les cellules dendritiques dans le paracortex (12, 20) (figure 7).

Après plusieurs heures dans le ganglion, les lymphocytes B n'ayant pas rencontré leur antigène rejoignent la médulla et sortent par le vaisseau lymphatique efférent. Le passage du cortex au réseau de sinus lymphatique est sous la dépendance d'un gradient de Sphingosine-1 phosphate (S1P). En effet, le sang et la lymphe sont plus concentrés en S1P que le ganglion. Les lymphocytes régulent l'expression membranaire de leur récepteur au S1P (S1PR1), négativement au cours de leur entrée, et positivement au cours de leur sortie.

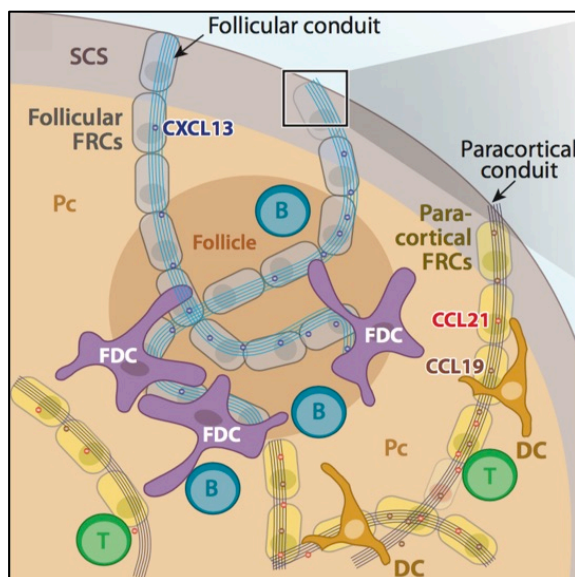


Figure 7. Trafic des lymphocytes dans le cortex (adapté de Gonzalez, 2011)(17).

Les lymphocytes migrent le long des conduits formés par les FRC. Les cellules B le long des conduits corticaux selon un gradient de CXCL13, les cellules T le long des conduits paracorticaux selon un gradient de CCL19/21.

1.3 Signalisation du BCR

La voie du BCR est une des voies majeures d'activation des lymphocytes B au cours de leur développement. En conduisant à la survie ou la mort cellulaire en fonction du signal transmis, le BCR est le principal régulateur physiologique de l'homéostasie des cellules. L'initiation et

l'amplification du signal transmis par le BCR sont régulées par un fin équilibre entre des kinases et des phosphatases.

L'engagement du BCR initie une cascade de phosphorylations et d'activations de molécules effectrices appartenant à des voies de signalisation différentes, mais fortement interconnectées, conduisant ainsi à l'activation, la prolifération et/ou la différenciation cellulaire. L'engagement du BCR provoque l'activation de tyrosine kinases de la famille Src, dont Lyn qui phosphoryle les motifs ITAM de l'Ig α et l'Ig β , permettant le recrutement et l'activation des kinases Syk (Spleen Tyrosine kinase) et Btk (Burton Tyrosine Kinase). Se constitue alors autour du BCR un complexe protéique appelé « signalosome » par l'enrôlement de différentes protéines membranaires telles que le CD19, cytoplasmiques adaptatrices comme Vav ou BLNK (B-cell linker), et d'enzymes cytoplasmiques telles la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) ou la PLC γ 2 (Phospholipase C gamma 2). Le phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate (PtdInsP $_3$), produit par la PI3K, permet le recrutement de protéines de signalisation par l'intermédiaire de leur domaine d'homologie à la pleckstrine et active des kinases telle AKT (protéine kinase B). L'activation de PLC γ 2 conduit à une libération intracellulaire de calcium et à l'activation de la protéine kinase C (PKC), tous deux indispensables à l'activation des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), telles que ERK (Extracellular Regulated Kinase), JNK (c-Jun NH $_2$ -terminal kinase) et p38 MAPK. L'ensemble de ces événements conduit à l'activation terminale de facteurs de transcription comme NF κ B (Nuclear Factor Kappa B), NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) ou AP1 (dimère Fos/c-Jun). Les régulateurs négatifs jouent également un rôle prépondérant dans la régulation de la signalisation. Il s'agit notamment des phosphatases membranaires comme le CD45, cytoplasmiques comme SHP1 (SH2-domain-containing protein tyrosine Phosphatase 1) et SHIP (SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5' phosphatase); cette dernière reconnaissant les motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) de l'immunorécepteur pour le fragment Fc des IgG, le RFc γ IIB. L'ensemble de ces différentes voies de signalisation permet une modulation fine, à la fois qualitative et quantitative, du signal et sont détaillées dans la figure 8 (7, 21-23).

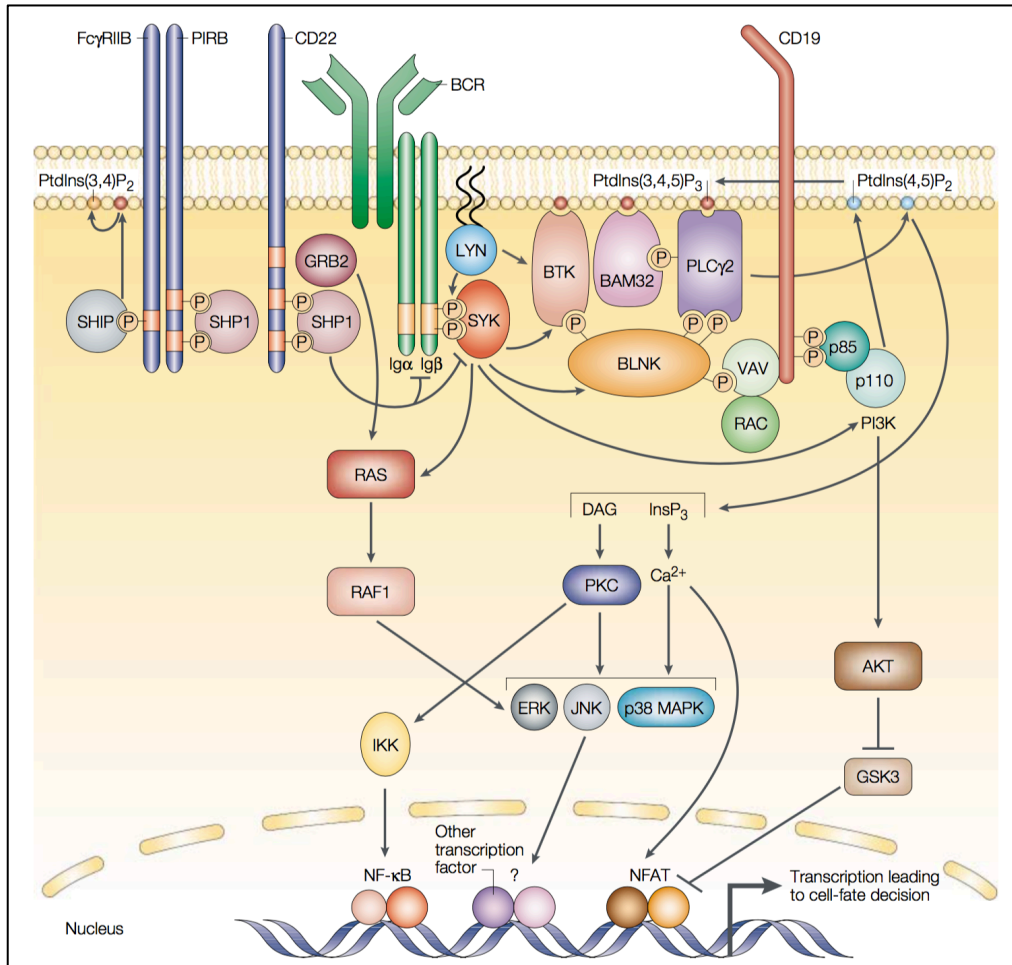


Figure 8. Voies de signalisation en aval du BCR (adapté de Niiro, 2002) (7).

Après fixation de l'antigène au BCR, trois principales protéines kinases sont activées dont Lyn, Syk et Btk. En aval du BCR, les effecteurs PI3K et PLCγ2 conduisent « in fine » à l'activation terminale de facteurs de transcription tels NFκB, NFAT ou AP1 (dimère Fos/c-Jun). Des phosphatases telles SHP1 et SHIP régulent négativement la signalisation du BCR.

1.4 Les lymphocytes B régulateurs

1.4.1 Généralités et définitions

Les lymphocytes B sont habituellement définis par leur capacité à induire une réponse humorale efficace. Néanmoins, des populations lymphocytaires B jouent également un rôle important dans la régulation négative des réactions immunitaires dans un contexte physiologique ou pathologique. Il y a maintenant plus de 40 ans, une augmentation de la durée et de la sévérité des réponses d'hypersensibilité a été observée chez des cochons d'inde après une déplétion sélective des lymphocytes B, suggérant que les lymphocytes B

sont capables d'inhiber l'activation des lymphocytes T (24). La même année, l'étude d'un modèle murin de sarcome viro-induit a mis en évidence la capacité de certains lymphocytes B à inhiber une réaction lymphocytaire T anti-tumorale, démontrant ainsi le rôle des lymphocytes B immunosuppresseurs dans le maintien de l'homéostasie immunitaire (25). Malgré ces découvertes initiales, l'existence de cette population B est restée longtemps controversée, et la description formelle de populations lymphocytaires B « régulatrices » (Breg), a fortiori chez l'homme, n'est que très récente (26).

Les Breg ne représentent qu'une minorité du pool de lymphocytes B mais ils vont jouer un rôle sur la modulation du répertoire lymphocytaire T. Les lymphocytes CD4⁺ activés présentent différents profils de sécrétion cytokinique qui orienteront la réponse immunitaire. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ sécrétant majoritairement de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2 sont appelés Th1 et induisent les réponses immunes cellulaires. Les lymphocytes T CD4⁺, produisant principalement de l'IL-4, IL-5 et IL-13 sont nommés Th2 et soutiennent la différenciation des lymphocytes B. Le développement de ces deux populations est antagoniste par l'amplification sélective d'une des deux sous-populations qui entraîne une polarisation fonctionnelle de la réponse immunitaire. Décrites plus récemment, les cellules Th17 ont un profil sécrétoire constitué de manière prépondérante de l'IL-17, IL-22 et IL-21, qui confère à ces cellules un rôle dans le contrôle des infections bactériennes et fongiques. Les lymphocytes T régulateurs, ou Treg, jouent un rôle majeur dans la tolérance immunitaire et la régulation de la réponse immunitaire. Ils se développent dans le thymus (Treg naturels) ou à partir de lymphocytes T naïfs (Tregs induits). Les Tregs induits sécrètent de l'IL10 et du TGF β (Figure 9). Les lymphocytes B régulateurs ont comme caractéristiques communes d'inhiber l'activation de la réponse Th1, d'inhiber la différenciation des lymphocytes Th17 et de favoriser la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs. L'immunosuppression induite par les Breg est principalement liée à la production de la cytokine IL10 par ces cellules (alors appelées B10), mais d'autres mécanismes d'action ont également été décrits et sont détaillés dans le chapitre suivant (1.4.2). Si la capacité de sécrétion de l'IL10 est un marqueur habituellement utilisé pour mettre en évidence la population Breg, la nécessité d'un marquage intracellulaire rend toute analyse fonctionnelle impossible. Plusieurs équipes ont tenté de définir un phénotype membranaire des B10, et si plusieurs populations ont été isolées (tableau 1), il semble qu'il n'existe pas de phénotype membranaire spécifique des B10, ce qui est probablement lié au

fait qu'après stimulation, différentes populations lymphocytaires B sont capables de produire de l'IL10 *ex vivo* (27, 28).

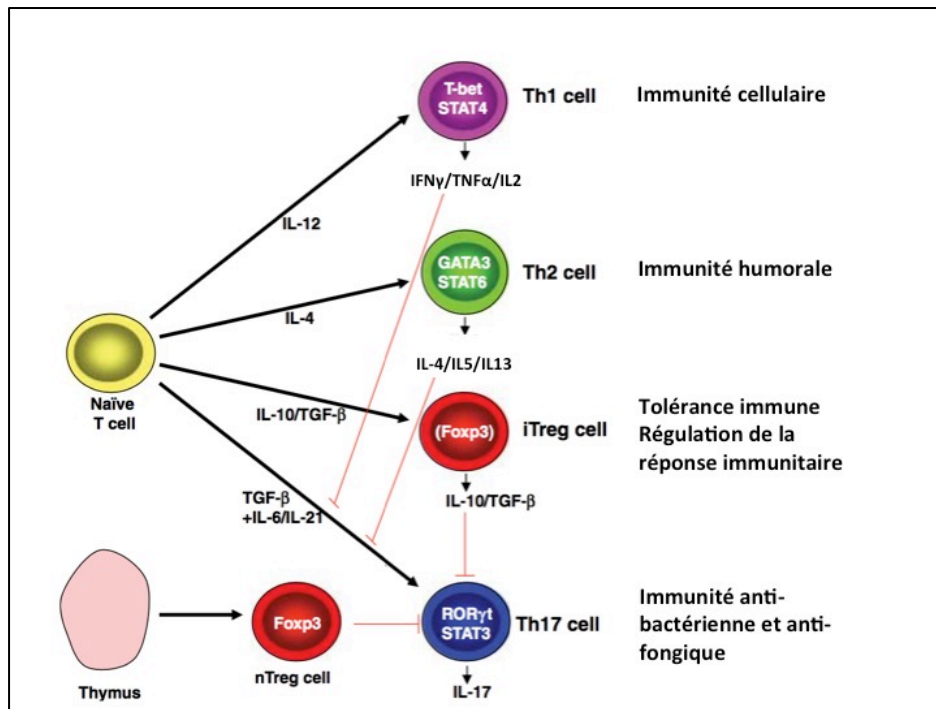


Figure 9. Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ (adapté de Mills, 2008) (29).

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs peuvent se différencier en Th1, Th2, Treg ou Th17 en réponse à différentes cytokines. L'IL12 induit le développement des Th1, qui sécrètent de l'IFN γ , du TNF α et de l'IL2. L'IL4 induit le développement des Th2, qui sécrètent de l'IL4, de l'IL5 et de l'IL13. L'IL10 et le TGF β induisent la différenciation des Tregs induits, alors que les Tregs innés se développent à partir du thymus. Le TGF β , l'IL6 et l'IL21 favorisent la différenciation en Th17.

1.4.2 Mécanismes d'action des lymphocytes B régulateurs

Plusieurs populations de cellules B ont été décrites comme capables de produire de l'IL10 et d'inhiber la production par les lymphocytes T ou les monocytes de cytokines pro-inflammatoires telles l'interferon gamma (IFN γ) et le tumor necrosis factor alpha (TNF α). S'il n'existe aucune signature phénotypique des Breg, certains marqueurs membranaires tels le CD24, CD25 ou CD27 sont exprimés par plusieurs populations lymphocytaires B régulatrices (tableau 1). Cependant, il est important de noter que dans chaque population cellulaire

isolée, moins de 20% des cellules exprimant ce phénotype spécifique sont capables de produire de l'IL10 (27).

La sécrétion d'IL10 par les Breg n'est pas le seul mécanisme d'action de cette population cellulaire régulatrice. En effet, les Breg sont capables de sécréter d'autres molécules immunomodulatrices, comme le transforming growth factor beta (TGFβ), le granzyme B (GRZMB), l'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) et l'adénosine ou d'inhiber les cellules effectrices par l'intermédiaire de contacts intercellulaires.

Les mécanismes d'action et les cibles cellulaires des divers sous-types de Breg sont synthétisés dans le tableau 1.

Tableau 1. Mécanismes de l'immunosuppression induite par les Breg (adapté de Mauri 2017), (27)

Sous-type	Phénotype	Mécanisme de suppression	Cibles de suppression	Références
LB immatures	CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	IL10, PDL1, CD80, CD86, CD1d	CD4, CD8, DC, iNKT	(30-33)
B10	CD24 ^{hi} CD27 ⁺	IL10	Monocytes	(26)
LB GRZMB+	CD38 ⁺ CD1d ⁺ IgM ⁺ CD147 ⁺	GRZMB, IL10, IDO	CD4	(34)
Br1	CD25 ^{hi} CD71 ^{hi} CD73 ^{lo}	IL10, IgG4	CD4	(35)
Plasmablastes	CD27 ^{int} CD38 ^{hi}	IL10	—	(36)
—	CD39 ⁺ CD73 ⁺	Adénosine	CD4, CD8	(37)
Bregs inductibles	—	IL10, TGFβ, IDO	CD4	(38)
—	CD19 ⁺ TIM1 ⁺	IL10	CD4, CD8	(39)
—	CD25 ⁺ CD71 ^{+/-} CD73 ⁻	CD40L, CD80, CD86, IL10, TGFβ	TFH	(40)

Tableau récapitulant les différents sous-types de Bregs décrits à ce jour en fonction de leur phénotype membranaire, de leurs mécanismes et leurs cibles de suppression. iNKT : lymphocytes T NK classiques, DC : cellules dendritiques, GRZM B : granzyme B, IDO : indoléamine 2,3 dioxygénase.

Les Breg n'exercent leurs fonctions régulatrices qu'en réponse à une activation du système immunitaire. L'engagement de certains récepteurs tels que les Toll-Like Receptors (TLR), le BCR ou certains récepteurs de cytokines (IFNα-β, IL1β, IL6, IL21, BAFF), ainsi que l'activation de molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86), sont nécessaires à l'induction des

propriétés suppressives des Breg (figure 10). En plus de ces signaux extracellulaires d'activation, la détection d'IL10 intracellulaire *in vitro* par cytométrie en flux nécessite une stimulation robuste de certains effecteurs intracellulaires, habituellement via l'utilisation du Phorbol 12 Myristate 13-Acetate (PMA) et de la ionomycine, ainsi que l'utilisation de brefeldine pour bloquer la sécrétion extracellulaire d'IL10.

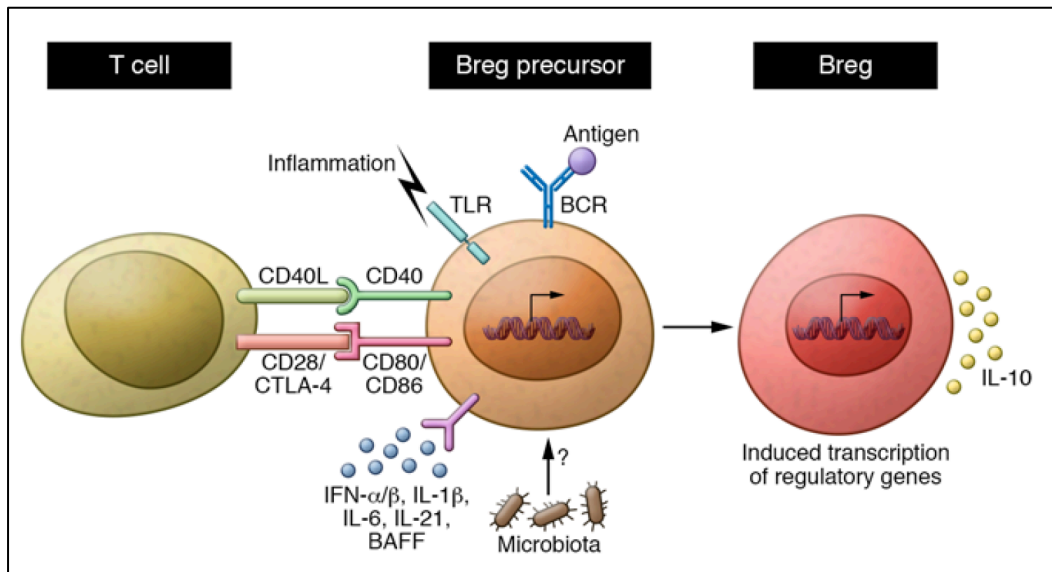


Figure 10. Induction des Breg (adapté de Mauri, 2017) (27).

Les Breg qui produisent de l'IL10 expriment des gènes de régulation en réponse à une activation du système immunitaire. Les signaux qui induisent la différenciation des Breg comprennent des stimuli inflammatoires (via les TLR), l'activation de molécules de co-stimulation (CD40, CD80/CD86), certaines cytokines (IFN α - β , IL1 β , IL6, IL21, BAFF) et le microbiote.

1.4.3 Lymphocytes B régulateurs et pathologies

L'importance des Breg dans l'homéostasie du système immunitaire a été renforcée par la mise en évidence de l'implication de ces populations dans diverses pathologies nécessitant l'intervention du système immunitaire.

Tout d'abord, un déficit quantitatif ou fonctionnel des Breg a été rapporté dans plusieurs pathologies auto-immunes telles que la sclérose en plaque, le lupus érythémateux disséminé et la polyarthrite rhumatoïde. Dans toutes ces pathologies, le taux de Breg a été inversement corrélé à la sévérité de la maladie. Une diminution du niveau de Breg a

également été constatée chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, de diabète de type 1, ou d'allergies (27).

De plus, plusieurs études ont mis en évidence l'induction inattendue de Breg au cours de certaines pathologies infectieuses telles les infections à *Salmonella typhi* ou les infections helminthiques chroniques, alors même que la population lymphocytaire B joue un rôle prépondérant dans la défense de l'hôte. Certains patients ont même ressenti une diminution de l'intensité de leur symptomatologie liée à une pathologie allergique ou auto-immune suite à une infection helminthique chronique (41). Dans ce cas précis, il a été proposé que l'induction des Breg et la sécrétion d'IL10 secondaire à l'infection permettent un meilleur contrôle de l'autoimmunité. Le rôle des Breg dans la physiopathogénie des infections virales chroniques par le VIH ou le virus de l'hépatite B a également été démontré (33, 42, 43).

S'il existe de nombreuses données sur les propriétés immunosuppressives des lymphocytes B dans des modèles murins de cancers, le rôle des Breg dans le déficit de l'immunité anti-tumorale est moins décrit chez l'homme. La présence de Breg GRZB⁺ qui sont capables d'inhiber la réponse T CD4⁺, a néanmoins été décrite dans des carcinomes du sein, du col de l'utérus et des ovaires (34).

Enfin, une diminution de la capacité de sécrétion d'IL10 des Breg chez les patients allogreffés atteints de maladie du greffon contre l'hôte chronique, ainsi qu'une association entre l'augmentation de la population CD34^{hi}CD38^{hi} et la réduction du taux de rejet de greffe chez les patients greffés rénaux, soulignent l'importance des Breg dans les mécanismes de tolérance immunologique après transplantation (44, 45).

Les lymphocytes B régulateurs pourraient donc représenter une cible d'intérêt dans différentes pathologies. Certains immunosuppresseurs, en plus de leur mécanisme d'action principal, semblent avoir également un impact sur la population lymphocytaire B régulatrice. Ainsi, les corticostéroïdes, le méthotrexate, la rapamycine, le tolicizumab, semblent capables d'induire la production d'IL10 par les lymphocytes B et ainsi augmenter leur capacité régulatrice (46).

2. Généralités sur la leucémie lymphoïde chronique

2.1 Les syndromes lymphoprolifératifs B

Si la signalisation du BCR joue un rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie des lymphocytes B dans un contexte normal, l'existence d'une dérégulation de cette signalisation a été démontrée dans de nombreuses hémopathies lymphoïdes B. Le développement des syndromes lymphoprolifératifs B est associé à la survenue d'anomalies chromosomiques ou de mutations ponctuelles récurrentes, et un grand nombre de ces anomalies impliquent directement ou non le BCR et/ou sa cascade de signalisation (47).

Il est possible de classer les syndromes lymphoprolifératifs en fonction de leur stade de maturation, en les associant à un équivalent normal. Par exemple, les cellules de leucémie aiguë lymphoblastique B sont classées en fonction du stade de maturation du récepteur B à l'antigène qu'elles expriment. Dans la majorité des cas, elles expriment à leur surface un pré-BCR et sont donc associées au stade pré-B (LAL pré-B). Pour ce qui est de l'origine de la cellule B de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), qui demeure débattue et fera l'objet d'un chapitre spécifique (Cf. chapitre 3.1), les cellules B de LLC dérivent très probablement de lymphocytes B CD5⁺ matures. Quant aux lymphomes à cellules du manteau (MCL), les lymphocytes expriment un phénotype proche de celui d'une population lymphoïde B mature naïve CD5⁺ colonisant la zone du manteau en périphérie du follicule lymphoïde. De plus, la localisation des cellules tumorales dans la zone du manteau suggère que les cellules B MCL dérivent bien de cellules B CD5⁺ du pré-centre germinatif. En ce qui concerne les lymphomes de la zone marginale splénique (SMZL) et les lymphomes des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), qui sont des lymphomes indolents, les cellules B dérivent des lymphocytes de la zone marginale. Enfin, les lymphomes folliculaires, les lymphomes de Burkitt et les lymphomes B diffus à grandes cellules de type centre germinatif sont issus du centre germinatif (figure 11) (47).

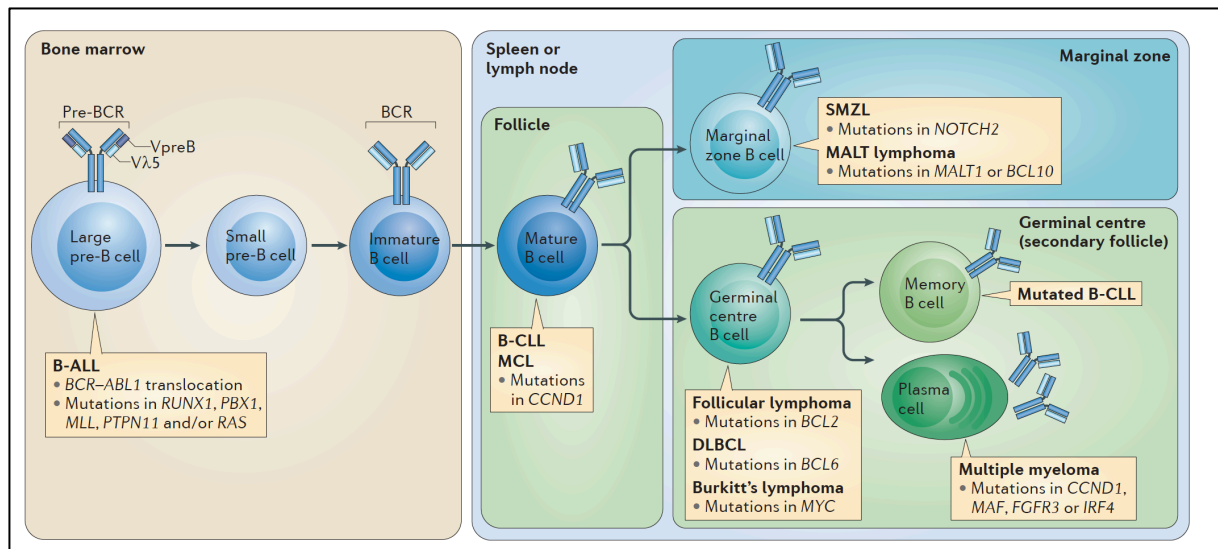


Figure 11. Origine cellulaire des syndromes lymphoprolifératifs B (adapté de Rickert 2013) (47).

Les syndromes lymphoprolifératifs B peuvent être classés en fonction de leur stade de développement et du type de lymphocytes B normaux auxquels ils correspondent. B-ALL : leucémie aiguë lymphoblastique B, B-CLL : leucémie lymphoïde chronique B, MCL : lymphome à cellules du manteau, SMZL : lymphome B de la zone marginale splénique, MALT lymphoma : lymphome des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules.

Grace à de nombreuses avancées diagnostiques et thérapeutiques, la classification de référence des Hémopathies de l'Organisation Mondiale de la Santé a été mise à jour et publiée sous l'intitulé « Classification OMS 2016 ». Cette classification prend en compte les techniques de biologie moléculaire de dernière génération (séquençage, profils d'expression génique) qui occupent une part de plus en plus importante, et qui complètent les techniques classiques d'histopathologie, de cytologie, de cytométrie en flux et de cytogénétique (48).

2.2 Définition et épidémiologie de la leucémie lymphoïde chronique

La LLC est un syndrome lymphoprolifératif B caractérisé par l'accumulation clonale de petits lymphocytes matures CD5⁺ dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires. Elle représente environ 30% des leucémies de l'adulte. Sa découverte est maintenant le plus souvent fortuite, après un hémogramme de routine. Plus rarement, la LLC peut être diagnostiquée à l'occasion d'une asthénie, de la constatation d'adénopathies

superficielles, d'une splénomégalie, ou lors de la survenue d'infections à répétition ou d'épisodes dysimmunitaires.

L'incidence de la LLC reste difficile à évaluer précisément. Elle varie de 3 à 8 pour 100000 habitants dans les différentes séries étudiées en Europe et sur le continent nord-américain ; cette incidence étant beaucoup plus faible en Asie ou en Afrique. La LLC affecte principalement les sujets âgés avec un âge médian au diagnostic de 70 ans. Une prévalence masculine est retrouvée de façon constante (sex ratio H/F de 1,5 à 2) (49-51). Aucun facteur environnemental n'a été mis en évidence, mais une susceptibilité génétique semble probable. En effet, le risque relatif de développement d'une hémopathie maligne lymphoïde, LLC ou lymphome, varie de 3 à 7,5 chez les apparentés de premier degré des patients atteints de LLC (52).

2.3 Diagnostic de leucémie lymphoïde chronique

Le diagnostic de LLC est simple et repose sur la constatation d'une hyperlymphocytose sanguine chronique ayant des profils cytologique et immunophénotypique caractéristiques. Le seuil de cette hyperlymphocytose à partir duquel le diagnostic de LLC peut être posé a été redéfini en 2008 par l'International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (*IWCLL*), à savoir 5×10^9 lymphocytes B monoclonaux par litre. Une nouvelle entité a également été décrite : la lymphocytose B monoclonale ou MBL. Cette dernière correspond à une hyperlymphocytose monoclonale B, inférieure à $5 \times 10^9/L$ et asymptomatique (absences d'adénopathies, d'hépatomégalie, de splénomégalie et de cytopénies) (53). Même si virtuellement tous les cas de LLC sont précédés d'une phase de MBL, des études récentes soulignent qu'il est important de distinguer les MBL de phénotype LLC de faible taux (clone inférieur à $0,5 \times 10^9/L$) des MBL dont le taux de lymphocytes clonaux excède $0,5 \times 10^9/L$. En effet, le risque d'évolution d'une MBL de faible taux est faible et la mise en évidence de cette anomalie ne justifie pas de surveillance particulière. En revanche, les MBL ayant un clone supérieur à $0,5 \times 10^9/L$, sont à rapprocher d'une LLC de stade A de Binet et justifient un suivi (54-56).

Les cellules de LLC sont typiquement des petits lymphocytes matures, avec un cytoplasme réduit, un noyau régulier avec une chromatine mature et mottée conférant un aspect fissuré, habituellement sans nucléole visible. L'étude immunophénotypique des lymphocytes B sanguins par cytométrie en flux est indispensable au diagnostic et permet de différencier la LLC des autres syndromes lymphoprolifératifs. Les cellules de LLC expriment typiquement à leur membrane plasmique l'antigène CD5 (habituellement principalement exprimé par les lymphocytes T), et plusieurs marqueurs de la lignée B : CD19, CD20, CD22, CD23, CD79b, immunoglobuline de surface (IgS). L'antigène FMC7 est le plus souvent absent ou faiblement exprimé. Un système de score diagnostique reposant à la fois sur la présence et la densité des marqueurs a été proposé en 1994, complété en 1997 et fait toujours référence (57, 58). Le profil d'expression de 5 marqueurs qui définissent le score RMH (Royal Marsden Hospital), également appelé score de Matutes, est détaillé dans le tableau 2. Dans l'étude de Matutes, 97% des LLC avaient un score supérieur à 3 ; un score 4 ou 5, associé à une morphologie typique des lymphocytes sanguins, permet donc d'affirmer le diagnostic.

Tableau 2. Score de Matutes modifié par Moreau (57, 58)

Marqueur	1 point	0 point
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
CD22 et/ou CD79b	Négatif/expression faible	Expression moyenne/forte
IgS	Expression faible	Expression moyenne/forte

Score de Matutes ou score RMH (Royal Marsden Hospital), reposant sur l'analyse cytométrique de 5 marqueurs membranaires. Un score ≥ 4 permet de poser le diagnostic de la LLC.

3. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique

3.1 Origine de la cellule leucémique

L'origine cellulaire et la cascade d'événements conduisant au développement de la LLC restent à ce jour non élucidés, malgré l'émergence de plusieurs hypothèses.

Tout d'abord, la présence d'altérations génétiques et épigénétiques dans les cellules souches hématopoïétiques constitue la première étape nécessaire à l'émergence d'un clone de LLC. Ainsi, le transfert de cellules souches de patients atteints de LLC dans des souris immunodéprimées conduit à une lymphoprolifération B clonale *in vivo* (59). Une approche récente de séquençage à haut débit après un tri cellulaire par cytométrie en flux de différentes cellules progénitrices de patients atteints de LLC a également mis en évidence l'existence de mutations somatiques de BRAF, NOTCH, SF3B1, NFKBIE et EGR2 dans des progéniteurs multipotents (60).

Concernant la contrepartie normale des cellules B de LLC, une première hypothèse émise reposait sur la présence physiologique d'une sous-population lymphocytaire B naïve CD5⁺ dans la zone du manteau des ganglions lymphatiques. Par l'expression du CD5, les cellules B de LLC pouvaient donc être issues de la zone du manteau. Cependant, le profil phénotypique de type « cellule B activée » des cellules de LLC va à l'encontre de cette hypothèse (61).

D'autre part, la découverte d'hypermutations somatiques des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgHV) chez environ 50% des patients a permis de définir deux profils de LLC : « muté ou LLC-M » et « non muté ou LLC-NM » qui seront détaillés ultérieurement (Cf. chapitre 3.2) et dont les caractéristiques sont résumés dans la figure 12. Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse d'une origine cellulaire distincte selon le profil mutationnel des IgHV : pré-centre germinatif pour les LLC « non mutées », centre germinatif ou post-centre germinatif pour les LLC « mutées ». En revanche, l'homogénéité du profil d'expression génique entre les deux groupes plaide en faveur d'une origine cellulaire unique (62, 63).

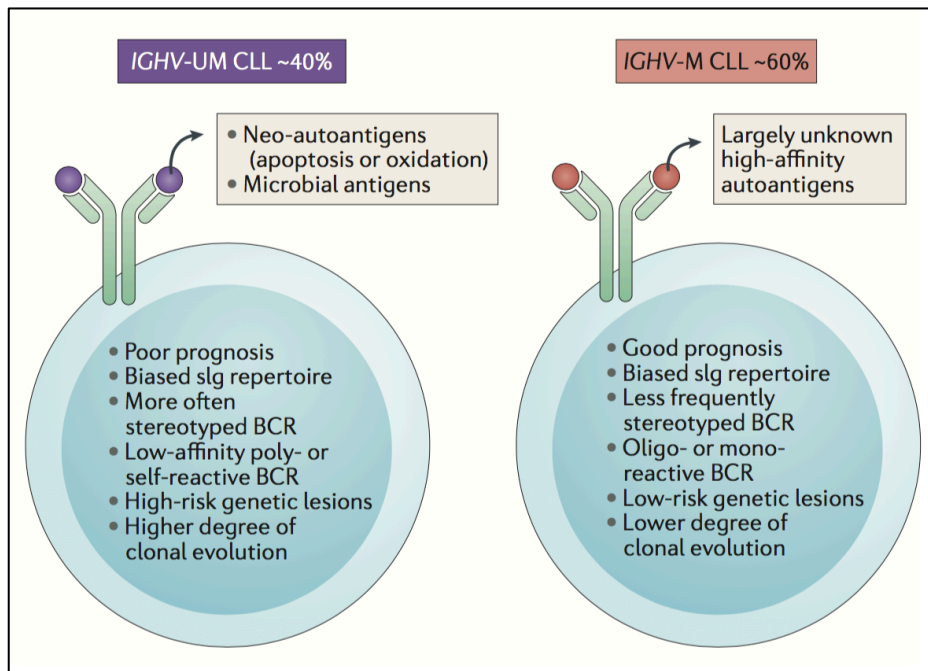


Figure 12. Comparaison des caractéristiques entre les deux groupes LLC-NM et LLC-M (adapté de Fabbri, 2016) (64).

Le groupe des LLC-NM (IGHV-UM CLL) exprime un BCR de faible affinité, qui est poly- ou auto-réactif et qui est capable d'induire une réponse suite à sa stimulation, présente des anomalies génétiques de haut risque et a un pronostic péjoratif. Le groupe des LLC-M (IGHV-M CLL) exprime un BCR mono- ou oligo-réactif avec une réponse diminuée à la stimulation du BCR, est associé à des anomalies génétiques de faible risque et a un pronostic plus favorable.

Le modèle actuel propose une origine cellulaire commune à toutes les formes de LLC, où le type de rencontre antigénique (T-dépendant ou T-indépendant) jouerait un rôle déterminant dans l'établissement des profils LLC. Ainsi, les LLC-M dériveraient de lymphocytes mémoires CD5⁺ CD27⁺ post-centre germinatif suite à une rencontre antigénique T dépendante, alors que les LLC-NM seraient issus de lymphocytes B pré-centre germinatif CD5⁺ CD27⁻ après une rencontre antigénique T indépendante. Des anomalies génétiques ou épigénétiques additionnelles, la stimulation du BCR et les interactions avec le microenvironnement seraient responsables de la progression de la maladie (figure 13) (64).

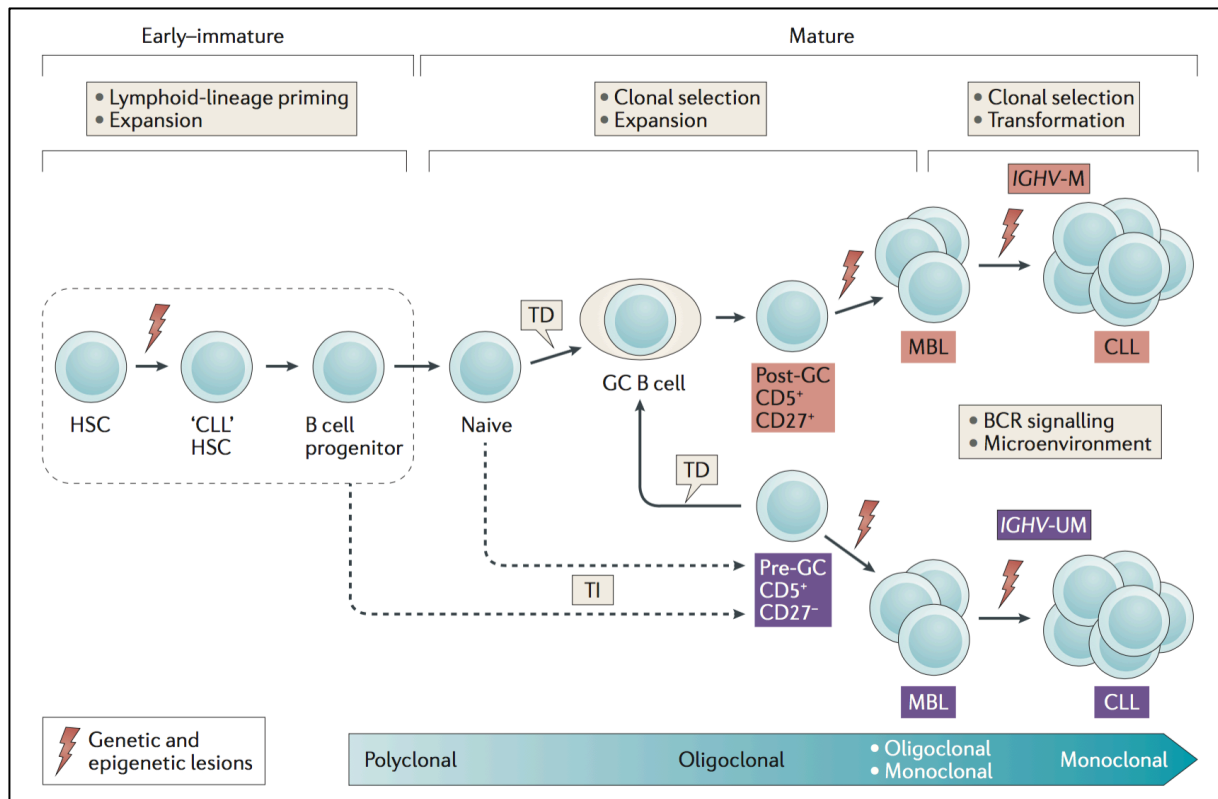


Figure 13. Modèle de l'origine de la cellule de LLC (adapté de Fabbri, 2016) (64).

Ce modèle propose l'existence de lésions génétiques et épigénétiques dès le stade de cellule souche hématopoïétique, la stimulation antigénique entraînant secondairement la sélection et l'expansion de lymphocytes B matures oligoclonaux. Les LLC-M (IGHV-M) dériveraient de lymphocytes B mémoires post-CG CD5⁺ CD27⁺ après une stimulation antigénique T-dépendante (TD), alors que les LLC NM dériveraient de lymphocytes B pré-GC CD5⁺ CD27⁻ après une stimulation antigénique T-indépendante (TI). La survenue de lésions génétiques et épigénétiques supplémentaires, la stimulation du BCR et les interactions avec le microenvironnement contribueraient à la progression de la maladie.

3.2 Importance de la signalisation du BCR dans la LLC

Les cellules B de LLC sont caractérisées par l'expression d'une IgM de surface d'intensité diminuée par rapport aux cellules B non pathologiques et par une capacité de réponse hétérogène suite à une stimulation antigénique ; cette capacité de réponse étant plus élevée dans les LLC-NM. De plus, l'affinité pour l'antigène et le type d'antigène reconnu diffèrent entre les LLC-M et les LLC-NM. En effet, les LLC-NM expriment un BCR poly-réactif, de faible affinité, qui reconnaît principalement les antigènes microbiens ou des auto-antigènes issus de cellules apoptotiques. Les cellules LLC-M expriment quant à elles un BCR mono- ou oligo-réactif, de forte affinité, qui reconnaît possiblement des auto-antigènes (figure 12) (64, 65).

Une stimulation du BCR *in vitro* avec un anticorps anti-IgM fixé au support montre généralement peu ou pas de réponse en termes de survie des cellules des patients ayant une LLC-M. Ces patients, appelés « non-répondeurs » présentent, dans la majorité des cas, une forme indolente de la maladie. A l'inverse, une stimulation du BCR *in vitro* des cellules des patients avec une LLC-NM active efficacement les effecteurs de la voie du BCR et conduit à une augmentation de la survie cellulaire dans les cellules de ces patients dits « répondeurs ». De manière intéressante, les cellules des patients LLC-M qui présentent une maladie évolutive, montrent également une réponse suite à une stimulation antigénique qui est expliquée par l'augmentation du niveau d'expression des protéines du signalosome du BCR (66, 67).

En dehors de l'engagement du BCR induit par des ligands, des travaux sur des cellules primaires humaines et murines de LLC ont proposé un modèle d'autostimulation par une interaction croisée entre plusieurs molécules de BCR. Cette capacité d'autostimulation du BCR, et donc indépendante de l'antigène, jouerait un rôle important dans le développement de la LLC, et particulièrement chez les patients du groupe LLC-NM (68, 69).

3.3 Rôle du microenvironnement ganglionnaire

Si les cellules de LLC présentent une survie prolongée *in vivo*, elles entrent très rapidement en apoptose *in vitro*. En revanche, leur co-culture en présence de cellules stromales améliore nettement leur survie. Ces observations soulignent l'influence du microenvironnement dans la survie et la prolifération des lymphocytes B de LLC (LB-LLC) (70). Initialement, l'accumulation *in vivo* des LB-LLC était expliquée par un défaut du processus d'apoptose. Des études récentes démontrent l'existence d'une fraction proliférative qui est responsable de la progression de la maladie et qui siège dans les ganglions lymphatiques. Ces derniers sont envahis par les cellules leucémiques et présentent une architecture désorganisée avec des « pseudo-follicules » composés de cellules leucémiques, de lymphocytes T et de cellules stromales. Plusieurs études ont clairement identifié les pseudo-follicules comme des sites de prolifération (71, 72). L'utilisation d'eau lourde chez les patients démontre l'existence d'une fraction proliférative sortant du ganglion dont les cellules ont un faible niveau d'expression membranaire de leur CXCR4 et une forte intensité d'expression de leur CD5 (CXCR4^{dim}CD5^{bright}). Des études d'expression génique sur ces cellules ont permis de

confirmer l'expression de gènes de prolifération et anti-apoptotiques (73). La comparaison des profils de l'expression génique des échantillons issus du sang, de la moelle osseuse ou des ganglions de patients LLC révèle une surexpression des gènes impliqués dans les voies du BCR et de NFκB dans les cellules issues du ganglion. Ces données mettent l'accent sur le rôle clé du microenvironnement ganglionnaire dans la progression de la LLC (74).

3.3.1 Trafic ganglionnaire dans la LLC

L'évolutivité de la LLC est donc associée à la capacité des cellules tumorales à coloniser les ganglions et à s'y maintenir en proliférant au sein des pseudo-follicules. Par une approche de microscopie intra-vitale dans un modèle murin, la L-sélectine (CD62-L) se révèle être un acteur clé de l'entrée des LB-LLC dans les ganglions (75). De plus, les taux d'expression du CCR7 et du CD49d à la surface des LB-LLC corrélerent à la présence d'adénopathies chez les patients (76) ; la fraction proliférative CXCR4^{dim}CD5^{bright} exprimant plus fortement le CD49d (77). Par ailleurs, la capacité de signalisation du BCR jouerait un rôle déterminant dans la migration des cellules de LLC au sein du compartiment ganglionnaire. En effet, les cellules qui répondent *in vitro* à un engagement du BCR voient leur niveau d'expression membranaire du CD62-L, CXCR4 et CXCR5 diminuer et leurs capacités d'adhérence et de migration en réponse au CXCL12 s'altérer, expliquant ainsi la rétention ganglionnaire des cellules B de LLC chez les patients progressifs (78, 79). La stimulation chronique du BCR dans le ganglion entraîne également une diminution de l'expression membranaire du S1PR-1, inhibant ainsi la sortie des cellules tumorales du ganglion (80).

3.3.2 Interactions entre les cellules de LLC et les cellules du microenvironnement

Dans le ganglion, les cellules leucémiques reçoivent des signaux de survie et de prolifération par leurs interactions avec diverses cellules du microenvironnement. De nombreuses cytokines sécrétées par les cellules stromales jouent un rôle primordial dans la survie et la maturation des lymphocytes B. En retour, ces derniers sécrètent des facteurs solubles qui façonnent le microenvironnement (figure 14).

Interactions LB-LLC et cellules folliculaires dendritiques

Les FDC, situées dans les centres prolifératifs, activent les LB-LLC par leur capacité à présenter l'antigène, ainsi que par la sécrétion de facteurs solubles tels que BAFF. Dans un modèle murin de LLC, le dialogue entre les FDC et les cellules tumorales met en jeu les axes CXCR5-CXCL13 et récepteur à la lymphotoxine beta (LT β R)/lymphotoxine alpha beta (LT $\alpha\beta$). Ce dialogue est essentiel à la localisation des LB-LLC dans les follicules lymphoïdes et à la progression de la LLC dans ce modèle (81).

Interactions LB-LLC et cellules « nurse-like »

Les Cellules Nurse-Like (NLC) sont des cellules accessoires essentielles à la survie et la prolifération des cellules tumorales dans le ganglion. Elles sont dérivées de la lignée myélomonocytaire et considérées comme des macrophages associés aux tumeurs (TAM). Après une culture à haute densité de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de patients atteints de LLC, les monocytes se différencient spontanément et protègent les LB-LLC de l'apoptose (82, 83). Dans les ganglions, les LB-LLC activés sécrètent des chimiokines, telles que les CCL3 et CCL4, qui attirent les NLC (84, 85). En retour, les NLC attirent par chimiotactisme et induisent la survie des cellules tumorales par la sécrétion des CXCL12 et CXCL13. Les NLC expriment également le CD31, BAFF et APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) et présentent des antigènes, tels que la calréticuline ou la vimentine, qui activent le BCR des cellules tumorales (83, 85, 86). De plus, les cellules stromales médullaires sécrètent des vésicules extracellulaires (microparticules et exosomes), générant ainsi une résistance à l'apoptose et une augmentation des capacités de migration des cellules B (87).

Le phénotype des NLC a été particulièrement étudié. En effet, les macrophages activés peuvent acquérir deux profils phénotypiques ayant des propriétés distinctes : les macrophages M1 et M2, par analogie avec la polarisation Th1 et Th2 des lymphocytes T. Stimulés par des produits bactériens ou des cytokines pro-inflammatoires, les macrophages M1 produisent des cytokines pro-inflammatoires (l'IL12 et l'IL23), de l'oxyde nitrique et des réactifs oxygénés intermédiaires (ROI) et montrent une activité de présentation d'antigène élevée. Ils amplifient la réponse Th1 et sont également impliqués dans l'immunité anti-tumorale. Plutôt observés dans des réactions de type cicatrisation ou en cas de réponse à une infection parasitaire, les macrophages M2 sécrètent quant à eux des cytokines anti-

inflammatoires comme l'IL10 et à très faible niveau l'IL12. S'ils sont impliqués dans la promotion de la réponse Th2 et le remodelage tissulaire, leur capacité à promouvoir la croissance tumorale a également été démontrée (88). *In vivo*, dans le modèle murin μ -TCL1, les NLC dérivées des monocytes expriment un phénotype dit M2 et pro-tumoral. La déplétion de ces macrophages par le clodronate ou un anticorps anti-CSF1R (récepteur indispensable à la transition monocyte-macrophage) permet de contrôler la progression de la LLC (89, 90).

Enfin, la capacité des LB-LLC à sécréter des exosomes permet aux cellules stromales d'acquérir un phénotype de type « Cancer Associated Fibroblast » et apporte ainsi un nouvel éclairage sur la capacité des LB-LLC à remodeler leur microenvironnement tumoral (91).

Interactions LB-LLC et lymphocytes T

Dans la LLC, le dialogue entre les lymphocytes B et les lymphocytes T est nécessaire à la prolifération tumorale. En effet, une stimulation avec du CD40L augmente la survie des cellules B tumorales *in vitro* (92). En revanche, la capacité de réponse à cette stimulation *in vitro* diffère entre les patients stables et les patients évolutifs (93). Dans les ganglions, ces cellules B de LLC secrètent les chimiokines CCL3, CCL4, CCL22 et CCL27 qui permettent le recrutement des lymphocytes T (94).

L'existence d'une altération de ce dialogue T-B contribue également au déficit immunitaire T observé dans cette maladie. Le répertoire lymphocytaire T est profondément modifié dans la LLC. Il est classiquement observé une augmentation oligo-clonale des LT CD8⁺ qui ont un phénotype activé mais qui présentent un défaut de cytotoxicité et de capacité à proliférer. Parmi la population CD4⁺, il existe une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs, qui a été corrélée à l'évolutivité de la maladie (95).

Les lymphocytes T CD4⁺ et particulièrement les T CD8⁺ expriment des marqueurs phénotypiques dits d'épuisement (ou « T-cell exhaustion ») tels que le PD1 (Programmed Death 1) qui interagit avec le ligand de PD1 (PD1-L) qui lui est présent à la surface des lymphocytes B tumoraux (96, 97). Plusieurs études montrent un défaut de formation de la synapse immunologique entre les LB-LLC et les lymphocytes T. Ce défaut est lié à une diminution de la fonction présentatrice d'antigène des lymphocytes B, à une altération des interactions entre les molécules de co-stimulation (CD40/CD40-L) et à un défaut de

polymérisation d'actine au niveau des lymphocytes T (98-100).

En plus de ces contacts cellulaires, les LB-LLC secrètent des cytokines immunomodulatrices, telles que l'IL6, l'IL-10 et le TGF β 1 (Transforming Growth Factor beta 1). Du fait des caractéristiques phénotypiques communes entre les LB-LLC et certaines populations Breg (expressions du CD5, CD24, CD27 et CD38) et de l'existence d'un déficit lymphocytaire T marqué dans la LLC, plusieurs équipes tentent de définir phénotypiquement et fonctionnellement la sous-population tumorale qui sécrète de l'IL10 et d'identifier les mécanismes régulant cette sécrétion (101). Deux études démontrent la capacité des LB-LLC à produire de l'IL10 après 48 heures de stimulation *ex-vivo* par du CpG (oligonucléotide stimulant le Toll-like Receptor 9 TLR9). Ces travaux montrent également une corrélation entre la capacité de sécrétion de l'IL10 et le statut mutationnel des IGHV ; l'induction d'IL10 en réponse à une stimulation avec du CpG étant supérieure dans les cellules des patients LLC-M par rapport à celles des malades présentant une LLC-NM (102, 103). De plus, le modèle murin de LLC (μ -TCL1) révèle la fonctionnalité des cellules B tumorales à inhiber la sécrétion de TNF- α par les monocytes ; inhibition qui implique l'IL10 (103). Par ailleurs, une stimulation avec BAFF du récepteur TACI (Transmembrane Activator and Cyclophilin ligand Interactor) entraîne la production d'IL10 par les LB-LLC (104). Une étude de la régulation de la sécrétion de l'IL10 montre qu'elle est corrélée à une hypo-méthylation du locus de l'IL10 et requière STAT3 dans les cellules tumorales des patients LLC-M (102).

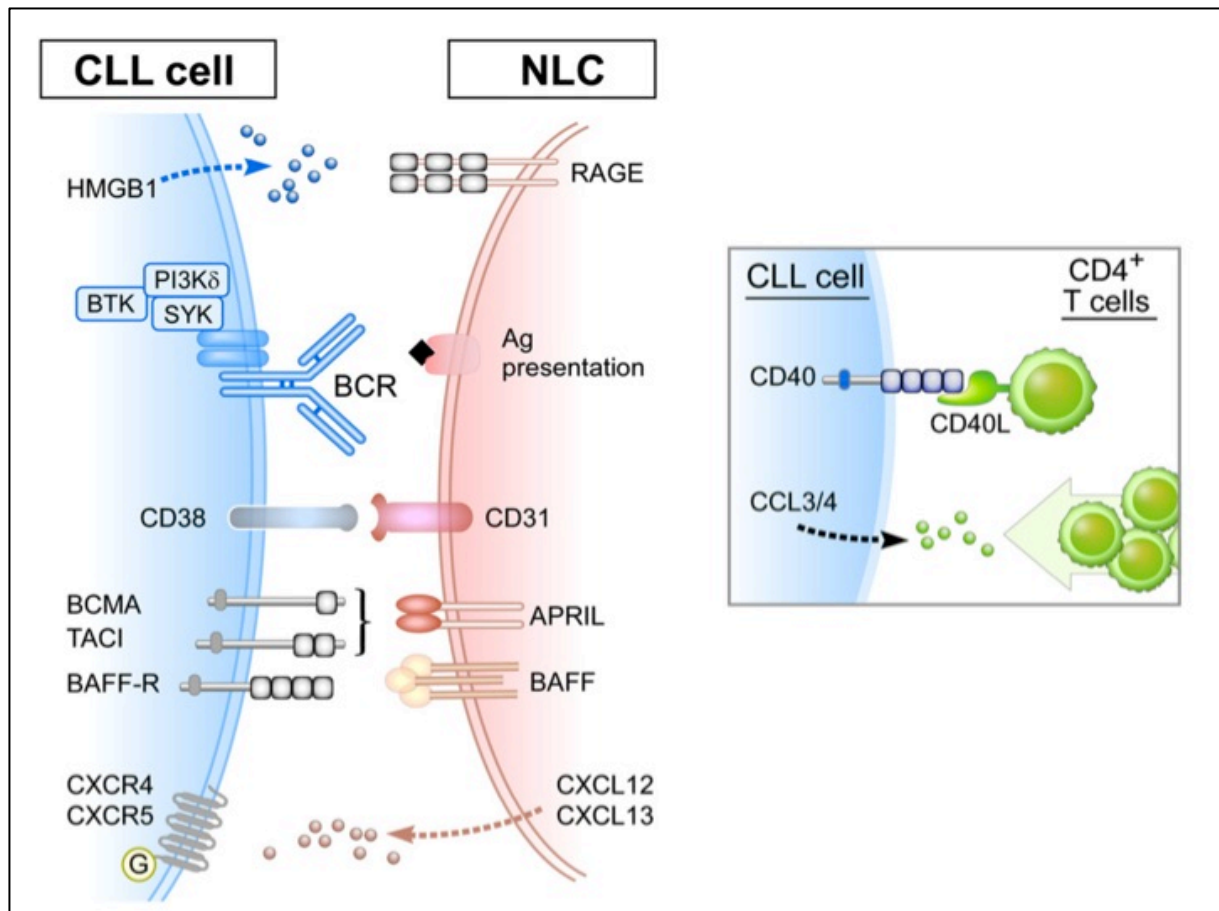


Figure 14. Interactions entre les LB-LLC et les cellules du microenvironnement ganglionnaire (adapté de Ten Hacken, 2014) (105).

Dans les ganglions lymphatiques, les cellules du microenvironnement transmettent des signaux de survie et de prolifération aux LB-LLC. Réciproquement, les LB-LLC sécrètent des chimiokines qui attirent les lymphocytes T et les NLC et sécrètent des cytokines immunomodulatrices telles que l'IL10 ou le TGFβ1.

4. Dysfonctions immunitaires dans la leucémie lymphoïde chronique

En plus du déficit de l'immunité anti-tumorale induite par les interactions entre les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire, la LLC se caractérise par la fréquente survenue d'infections et de complications auto-immunes.

4.1 Immunodépression

L'immunodépression dans la LLC est multifactorielle. Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent le déficit immunitaire T ont été précédemment développés (Cf. chapitre 3.3.2). S'y associent des dysfonctions de l'immunité innée telles qu'une diminution de certaines protéines du complément, une altération des capacités de

phagocytose des polynucléaires neutrophiles, un défaut de cytotoxicité des lymphocytes NK ainsi qu'une modification du répertoire monocytes/macrophages avec une augmentation du phénotype M2 immunosuppresseur et pro-tumoral (106).

Néanmoins, l'anomalie majeure associée au risque infectieux dans la LLC est l'hypogammaglobulinémie. Elle est présente chez environ 20% des patients au diagnostic et s'aggrave au cours de l'évolution de la maladie. Elle est notamment responsable d'une altération de la réponse vaccinale et de la survenue d'infections bactériennes à germes encapsulés (107, 108).

4.2 Complications auto-immunes

La survenue d'une cytopénie auto-immune est une complication fréquente de la LLC. La plus fréquente est l'anémie hémolytique auto-immune (AHA), qui survient chez 5 à 10% des patients au cours de l'évolution de la maladie. Une thrombopénie auto-immune (PTI) complique 1 à 5% des LLC, alors que la survenue d'une érythroblastopénie ou d'une neutropénie auto-immune est beaucoup plus rare (<1%) (109).

Dans la LLC, 90% des cytopénies auto-immunes (CAI) sont dues à la présence d'auto-anticorps de type IgG polyclonaux de haute affinité produits par des lymphocytes B non tumoraux après stimulation par des lymphocytes T auto-réactifs. Dans de rares cas (< 10%), le clone tumoral sécrète des auto-anticorps monoclonaux de type IgM responsables de la survenue d'une maladie des agglutinines froides.

La stimulation antigénique et la configuration du BCR semblent être des éléments déterminants dans la physiopathologie des CAI. La grande majorité des CAI associées à la LLC surviennent chez des patients ayant une LLC-NM, et une association à un stéréotype spécifique du BCR a été décrite (110, 111).

Si dans la majorité des cas, le clone de la LLC n'est pas directement responsable de la production d'auto-anticorps, son interaction avec le microenvironnement et son impact sur la population lymphocytaire T jouent un rôle primordial dans la perte de tolérance au soi. De plus, plusieurs études *in vitro* montrent la capacité des cellules tumorales à présenter des antigènes érythrocytaires aux lymphocytes T, entraînant la production de lymphocytes T auto-réactifs. L'échappement à la surveillance immune serait facilité par la dysfonction des lymphocytes T (figure 15).

Enfin, l'implication des TLR, qui jouent un rôle majeur dans l'immunité innée, a récemment été suggérée (112).

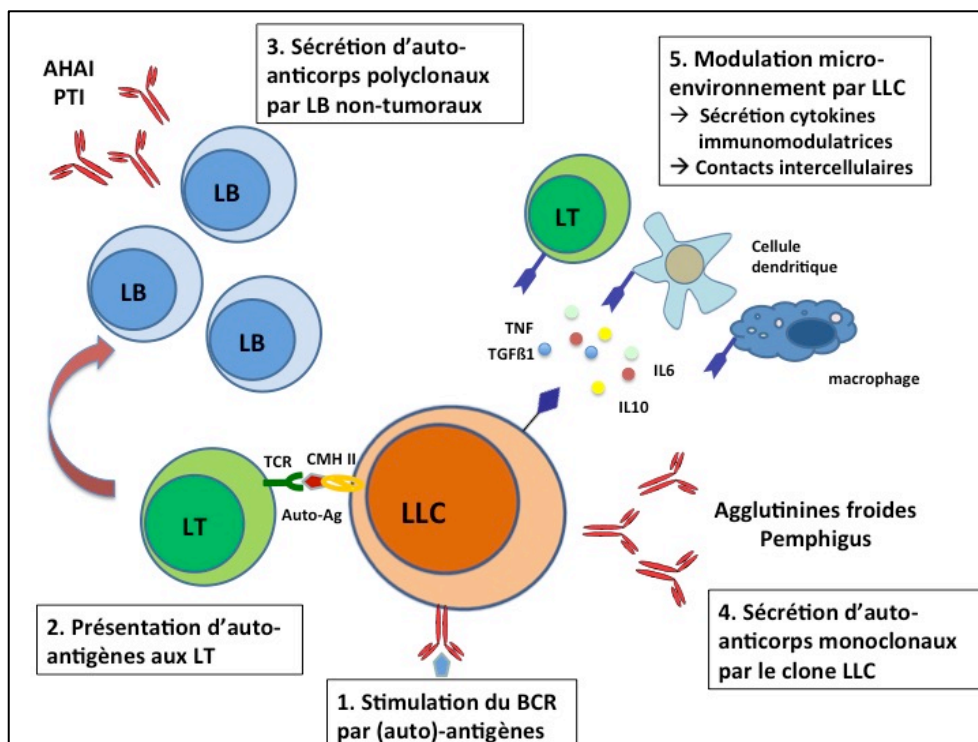


Figure 15. Physiopathologie des cytopénies auto-immunes associées à la LLC (adapté de Quinquenel, 2016)

Dans la majorité des cas, les auto-anticorps ne sont pas directement produits par le clone tumoral. Les LB-LLC présentent des auto-antigènes à des LT et entraînent le développement de LT autoréactifs, qui provoquent la prolifération de LB poly-clonaux responsables de la sécrétion d'auto-anticorps. La modulation du microenvironnement par les LB-LLC favorise l'échappement à la surveillance immunitaire.

5. Facteurs pronostiques

L'évolution de la LLC est extrêmement variable. Certains patients présentent une forme indolente de la maladie, ont une espérance de vie proche de la normale et ne sont jamais traités. En revanche, d'autres patients développent une forme progressive de la maladie et décèdent rapidement en dépit de traitements successifs. L'identification de facteurs pronostiques, qui permettent de repérer les patients à risque d'évolution rapide, est donc primordiale pour adapter la prise en charge.

5.1 Paramètres anatomo-cliniques

Les premières classifications pronostiques ont été proposées par Rai en 1975 (113) et Binet en 1981 (114). Elles reposent sur les données de l'examen clinique et de l'hémogramme. Elles sont toujours d'actualité dans la pratique quotidienne et les essais cliniques. La classification de Binet est détaillée dans le tableau 3.

Tableau 3. Classification de Binet (114).

Critères de définition	
Stade A Bon pronostic	Taux d'hémoglobine > 100 g/L Et Plaquettes > 100.10 ⁹ /L Moins de 3 aires lymphoïdes atteintes*
Stade B Pronostic intermédiaire	Taux d'hémoglobine > 100 g/L Et Plaquettes > 100.10 ⁹ /L Plus de 3 aires lymphoïdes atteintes*
Stade C Mauvais pronostic	Taux d'hémoglobine < 100 g/L Et/ou Plaquettes < 100.10 ⁹ /L Quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes*

La classification clinico-biologique de Binet définit 3 stades en fonction de l'existence d'adénopathies et de la présence ou non d'une anémie et d'une thrombopénie.

**5 aires ganglionnaires sont définies : tête et cou, creux axillaires (atteinte uni ou bilatérale), régions inguinales (atteinte uni ou bilatérale), splénomégalie, hépatomégalie.*

5.2 Marqueurs de prolifération

Pour de nombreux auteurs, l'importance de la lymphocytose au diagnostic n'a pas de valeur pronostique. Cependant, une étude menée sur des patients de stade A montre qu'une hyperlymphocytose supérieure à 13.10⁹/L au moment du diagnostic est un facteur péjoratif indépendant en terme de survie sans progression (115). Un temps de doublement des lymphocytes inférieur à 12 mois a également été rapporté comme un facteur péjoratif dans des études rétrospectives. D'autre part, un taux élevé de β 2-microglobuline, molécule reflétant la masse tumorale, est un facteur pronostique défavorable (116).

5.3 Anomalies cytogénétiques

La cytogénétique a profondément modifié la signification pronostique des classifications cliniques et la classification cytogénétique publiée en 2000 définit 5 groupes pronostiques en fonction de l'existence ou non de 4 anomalies : la délétion du chromosome 13 (del 13q14), la délétion du bras long du chromosome 11 (ou del 11q22.23), la trisomie (12) et la délétion du bras court du chromosome 17 (del 17p13) (117).

La délétion du bras long du chromosome 13 (del 13q14) est l'anomalie cytogénétique la plus fréquente. Détectée par la technique FISH dans environ 55% des cas, cette anomalie est de bon pronostic lorsqu'elle est isolée. Elle est actuellement considérée comme un évènement précoce dans la transformation leucémique (118).

La délétion du bras long du chromosome 11 aboutit à la perte du gène suppresseur de tumeur ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). Retrouvée chez 12 à 20% des patients, elle est associée à une atteinte ganglionnaire importante, à la mise en place d'un traitement plus précoce, ainsi qu'à une survie médiane inférieure à celle des patients dont les cellules tumorales ont une FISH normale (117, 119). Néanmoins, le caractère péjoratif de cette anomalie, démontré à l'ère des traitements par immuno-chimiothérapies, ne semble plus retrouvé sous traitement par ibrutinib (120).

La délétion 17p, qui conduit à la perte du gène suppresseur de tumeur TP53, est retrouvée par la technique FISH chez environ 5 à 7% des patients LLC non traités. Elle est en revanche retrouvée chez environ 30% des patients avec une LLC réfractaire. Par comparaison aux deux précédentes, cette anomalie chromosomique est de plus mauvais pronostic car elle est associée à une résistance à la chimiothérapie conventionnelle (analogue des purines et agents alkylants) (116, 117).

Récemment, plusieurs études ont également démontré qu'un caryotype complexe (≥ 3 anomalies chromosomiques) constitue également un facteur péjoratif, que les patients soient traités par immunochimiothérapie ou par ibrutinib (121-123).

5.4 Statut mutationnel du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines

Dans la LLC, l'établissement du statut mutationnel des IgHV s'effectue après séquençage des gènes codant pour les IgHV des lymphocytes B leucémiques puis par comparaison avec des séquences de références. Une homologie de plus de 98% avec la séquence de référence définit le statut LLC-NM alors qu'une homologie inférieure à 98% caractérise le statut LLC-M. Les patients, dont les cellules ont un statut mutationnel des IgHV 'NM' (environ 50% des patients), ont un pronostic défavorable avec une nécessité d'instauration d'un traitement plus précoce, une moins bonne réponse au traitement, des anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic ainsi qu'une survie globale inférieure (124, 125). L'utilisation de certaines séquences, comme le VH3-21, confère également un pronostic péjoratif, et ce quel que soit le statut mutationnel des gènes des IgHV. Malgré son impact pronostique fort mais non absolu, son établissement fait appel à une approche technique initialement difficile et coûteuse, ayant incité à rechercher des marqueurs de substitution.

5.5 Marqueurs immunophénotypiques

Analysée en routine par cytométrie en flux, l'expression membranaire du CD38, exprimé à la surface des cellules appartenant à la fraction proliférative du clone LLC, a été proposée comme un marqueur de substitution du statut mutationnel des IgHV. Cependant, la corrélation entre l'expression du CD38 et le statut mutationnel des IgHV n'est pas optimale et le seuil de positivité du CD38 n'est pas consensuel entre les laboratoires. Néanmoins, l'expression du CD38 par les cellules tumorales est recherchée systématiquement en routine et est considérée comme un facteur de mauvais pronostic (124, 125).

La protéine Zap-70 (Zeta-Associated Protein 70 kDa), une tyrosine kinase de la famille *syk*, est présente dans les lymphocytes T et NK. Phosphorylée après activation du récepteur à l'antigène des cellules T, elle est responsable de la transduction du signal et de l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Non détectée dans les lymphocytes B normaux, elle est exprimée dans les cellules leucémiques de certains patients atteints de LLC. Évaluée le plus souvent par cytométrie en flux, l'expression de Zap-70 constitue un facteur pronostique défavorable même si sa corrélation avec le statut NM des gènes des IgHV demeure imparfaite (126), et est actuellement de moins en moins étudiée.

Enfin, une méta-analyse colligeant les données de plus de 3000 patients a identifié l'expression du CD49d (considérée comme positive si le CD49d est exprimé à la membrane d'au moins 30% des cellules tumorales) comme le marqueur de mauvais pronostic le plus discriminant par cytométrie de flux (127).

5.6 Anomalies moléculaires

L'avènement des techniques de séquençage de nouvelle génération a permis le séquençage d'exomes ou de génomes de nombreux patients atteints de LLC. Il a contribué à une meilleure compréhension de la leucémogénèse par l'identification de mutations « drivers » et l'analyse de l'évolution clonale, ainsi qu'à la mise en évidence de nouveaux marqueurs pronostiques.

L'existence d'une mutation ponctuelle de TP53, retrouvée chez environ 10% des patients non traités et jusqu'à 30% des patients en rechute ou réfractaires, est associée dans environ 50% des cas à une délétion 17p. La dysfonction de la voie TP53 (délétion 17p ou mutation TP53) constitue à ce jour le facteur pronostique le plus péjoratif et doit être recherchée avant l'initiation de chaque ligne thérapeutique (128, 129). D'autres mutations également récurrentes ont été rapportées. Une mutation de NOTCH1 est retrouvée chez 10 à 15% des patients au diagnostic. Le gène NOTCH1 code pour un récepteur transmembranaire qui, une fois activé par son ligand, libère le domaine intra-cellulaire de NOTCH1 qui va transloquer dans le noyau et activer des gènes impliqués dans la survie et la résistance à l'apoptose (130). Toutes les mutations de NOTCH1 rapportées dans la LLC sont des mutations activatrices, mais l'impact pronostique des mutations de NOTCH1 reste controversé. De même, l'impact pronostique péjoratif de la présence de la mutation de SF3B1, codant pour une protéine du spliceosome et donc impliquée dans l'épissage, n'est retrouvé que de façon inconstante. Néanmoins, une méta-analyse récente confirmerait le caractère pronostique de la présence d'une mutation de SF3B1 (131). En revanche, les mutations bi-alléliques du gène ATM, ainsi que les mutations de BIRC3 (gène codant pour un régulateur négatif de la voie non canonique de NF- κ B), sont habituellement considérées comme des facteurs de mauvais pronostic (129).

Une classification fondée sur des données de la survie globale prenant en compte les données cytogénétiques et moléculaires des patients a été proposée. Même si cette

classification nécessite d'être validée, elle permet la distinction de 4 groupes d'individus avec des degrés de risques différents : haut (anomalies de TP53 ou de BIRC3), intermédiaire (anomalies de NOTCH1 ou SF3B1, mutations ATM et délétion 11q), faible (trisomie 12 ou caryotype normal) et très faible (délétion 13q isolée) (132).

De façon intéressante, deux modèles murins de LLC agressives ont été récemment générés suite à la délétion sélective des gènes TP53 et ATM dans la lignée lymphocytaire B grâce à un système Cre-Lox. L'existence de ces modèles murins pourrait servir de modèle pharmacologique pour des applications pré-cliniques (133).

6. Traitement de la leucémie lymphoïde chronique

A ce jour, la LLC demeure une pathologie incurable. Néanmoins, l'instauration d'un traitement n'est nécessaire que chez une minorité de patients présentant une LLC évolutive ; le reste des patients, dont la pathologie est considérée comme stable, sont uniquement surveillés en consultation. Quand il est nécessaire, le choix du traitement dépend à la fois des caractéristiques du patient (âge, état général, comorbidités) et de l'existence ou non d'une anomalie de TP53 (délétion 17p ou mutation ponctuelle) (figure 15). L'avènement de nouvelles thérapies dites « ciblées » a profondément modifié la prise en charge des patients. La place exacte de ces nouvelles molécules n'est pas encore totalement définie, et de nouvelles combinaisons associant des nouvelles molécules à la chimiothérapie ou dénuées de chimiothérapie conventionnelle (schémas dits « chemo-free ») sont actuellement à l'étude (134-136).

6.1 Immuno-chimiothérapie

En l'absence d'anomalie de TP53, une immuno-chimiothérapie associant un anticorps anti-CD20 à une chimiothérapie comprenant un agent alkylant, associé ou non à un analogue des purines, demeure à ce jour le traitement de référence. Chez les patients les plus jeunes et sans comorbidité notable, l'association de Rituximab, Fludarabine et Cyclophosphamide (RFC) a permis pour la première fois d'améliorer la survie globale par rapport au traitement standard de l'époque (137) ; cette combinaison semblant particulièrement intéressante pour les patients LLC-M (138). Pour les patients plus fragiles, non éligibles à un traitement à base

de Fludarabine, plusieurs options sont possibles. Deux schémas différents, associant Bendamustine et Rituximab (BR) d'une part, et Obinutuzumab et Chlorambucil d'autre part, ont montré leur supériorité sur le schéma de référence de type Rituximab et Chlorambucil dans cette population (138).

6.2 Thérapies ciblées

Du fait de l'implication majeure de la signalisation du BCR dans le développement et la progression de la LLC, plusieurs inhibiteurs d'effecteurs ayant une fonction kinase dans cette voie ont été générés. Si le premier inhibiteur bloquant la kinase Syk (fostamatinib) n'a pas conduit à des résultats satisfaisants en terme de réponse, deux autres molécules, l'ibrutinib et l'idelalisib, ciblant respectivement l'activité des kinases Btk et PI3K δ , ont permis l'obtention de taux et durées de réponse les plus longs jamais observés chez des patients en rechute (139-141). Ces excellents résultats ont conduit à leur autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le cadre des traitements de malades en rechute ou de patients naïfs de traitement (dits en première ligne) dont les cellules leucémiques portent des anomalies génétiques affectant la voie TP53. Malgré l'avancée thérapeutique majeure que représente l'utilisation de ces inhibiteurs dans la LLC, il est important de noter que ces drogues ont des effets indésirables liés à leur action sur des cibles à distance (effets « on target off tumor »). L'ibrutinib, qui inhibe la kinase Btk dans les cellules B a également été décrite pour interférer avec l'activité d'autres kinases de la même famille, la famille TEK, entraînant la survenue de saignements et de fibrillation auriculaire par son action sur les plaquettes et les cardiomyocytes (142, 143). Un traitement par l'idelalisib, qui cible une isoforme de la PI3K exprimée dans les lymphocytes, est souvent associé à la survenue de colites et d'hépatites d'origine auto-immunes, expliquées par un déficit à la fois qualitatif et quantitatif des lymphocytes T régulateurs induit par le traitement. Au regard de la fréquence de ces complications, il a été proposé une restriction des indications d'utilisation de l'idelalisib en première ligne (144). Pour diminuer les effets non spécifiques et améliorer l'efficacité des ces inhibiteurs ciblant Syk, Btk et PI3K, des molécules de seconde et troisième générations ainsi que des associations sont en cours de développement (145-150).

Malgré l'efficacité de ces inhibiteurs de kinase, un nombre non négligeable de patients est contraint d'arrêter ces traitements du fait d'effets indésirables ou de progression de la

maladie (151), ce qui renforce la nécessité de développer de nouvelles molécules. Ainsi, de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles font également l'objet d'études pré-cliniques ou d'essais thérapeutiques de phase précoce (133, 152-157). Une nouvelle classe d'agents thérapeutiques a récemment fait son apparition en ciblant le processus cellulaire d'apoptose par l'inhibition de la protéine anti-apoptotique BCL2 ; protéine surexprimée dans les cellules de LLC. Le Venetoclax a été le premier inhibiteur de BCL2 disponible en clinique. Il a permis d'obtenir des taux de réponse, et notamment de réponse complète, conséquents chez des patients en rechute, et de façon inhabituelle dans cette population, une négativité de la maladie résiduelle évaluée par cytométrie de flux chez un nombre non négligeable de patients (158). Le Venetoclax est maintenant proposé aux patients en rechute après l'utilisation d'au moins un inhibiteur de kinase.

La figure 16 résume les recommandations de l'ESMO (European Society for Medical Oncology) concernant le traitement de première ligne des patients atteints de LLC.

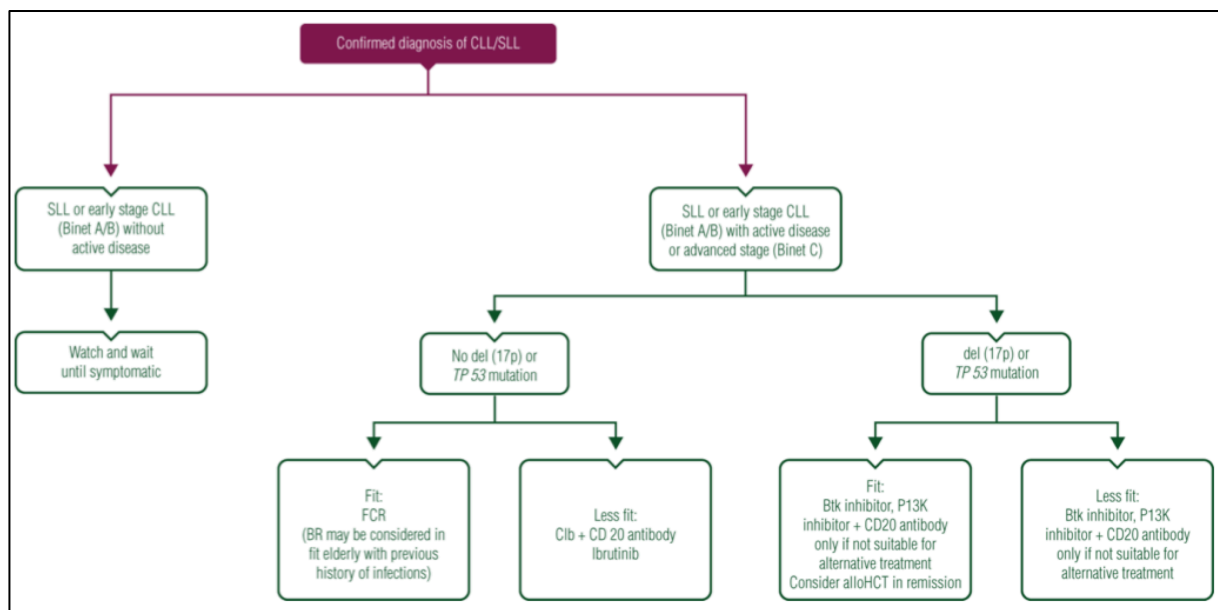


Figure 16. Recommandations de l'ESMO pour le traitement de première ligne de la LLC (adapté de Eichhorst, 2016) (159)

Stratification du choix de traitement de première ligne de la LLC selon l'état général des patients (bon état général ou 'fit', existence de comorbidités ou état général altéré : 'less fit') et de l'existence ou non d'une altération génétique de TP53 (del17p ou mutation TP53).

7. Mécanismes d'action de l'ibrutinib

7.1 Btk et signalisation

La fonction de Btk a été découverte en 1993 lors de l'étude des gènes potentiellement impliqués dans l'agammaglobulinémie liée au chromosome X (ou agammaglobulinémie de Bruton). Les patients atteints de cette pathologie génétique présentent non seulement une hypogammaglobulinémie sévère mais aussi un déficit quasi-complet en lymphocytes B sans anomalie apparente des autres cellules du système immunitaire (160).

7.1.1 Structure de Btk

Btk est une des cinq kinases de la famille Tec, qui comprend également les protéines TEC, ITK (Interleukine 2-inducible Kinase), RLK (Resting Lymphocyte Kinase) et BMX (Bone Marrow-expressed Kinase). Ces protéines sont principalement, mais pas exclusivement, exprimées par les cellules hématopoïétiques. En particulier, la structure secondaire de BTK comporte plusieurs domaines dont un SH2 (Src homology domains 2), un SH3 (Src homology domains 3) et un catalytique (kinase) dans sa partie C-terminale, ainsi qu'un PH (Pelckstrin Homology domain) et un TH (TEC homology) dans sa partie N-terminale ; l'ensemble de ces domaines conférant à Btk son activité et sa stabilité (figure 17). Les domaines PH et TH sont liés au domaine SH2 par une région riche en proline (PRR), et le domaine SH2 est lié au domaine kinase par un segment appelé SH2-kinase linker (figure 17). Par la liaison de son domaine PH au phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃) qui est majoritairement généré par la PI3K, Btk est transitoirement recrutée à la membrane plasmique et activée. A proximité des kinases de la famille Src et/ou de Syk, BTK est alors phosphorylée sur un résidu tyrosine en position Y551 situé dans son domaine catalytique. Cette phosphorylation entraîne une augmentation de son activité kinase qui se traduit par son autophosphorylation sur un résidu tyrosine en position 223 dans son domaine SH3. Si la phosphorylation Y223 est considérée comme le reflet de l'activation de Btk, son rôle n'est pas clairement établi. Elle ne semble pas affecter l'activité catalytique de Btk et aurait un rôle régulateur (161, 162). D'un point de vue structural, une première étude cristallographique sur 2 fragments de Btk, un premier comportant les domaines SH2, SH3 et kinase, et un second contenant les domaines PH et TH connectés à la kinase, a été réalisée. Ces deux constructions ont mis en évidence l'existence d'une conformation auto-inhibée par la formation d'une liaison entre le

domaine SH3 et le segment SH2-kinase linker ; conformation auto-inhibée comparable à celle retrouvée dans la structure des kinases de la famille Src. Cette conformation auto-inhibée rend inaccessible le domaine kinase et est stabilisée par une interaction entre le domaine PTHH et le domaine kinase. En revanche, elle serait réversible en présence de PIP3 (163). Très récemment, la combinaison de la résonance magnétique nucléaire et de l'échange d'hydrogène par du deuterium associé à de la spectrométrie de masse a proposé un nouveau modèle structural de la totalité de la protéine Btk. Cette analyse a tout d'abord confirmé l'existence d'une conformation auto-inhibée de Btk par la liaison entre le domaine SH3 et le segment SH2-kinase linker stabilisée par l'interaction entre les domaines PTHH et kinase. Elle confirme également la capacité du PIP3 à induire une modification allostérique de Btk vers une conformation active. De plus, cette étude démontre l'existence d'un rôle activateur, non connu jusqu'alors, du domaine riche en proline, par l'intermédiaire d'une interaction avec le domaine SH3 compétitive avec celle du SH2-kinase linker. La multiplicité des interactions régulatrices suggère clairement un mécanisme d'activation graduelle de Btk, par opposition à un modèle binaire « on / off » (164).

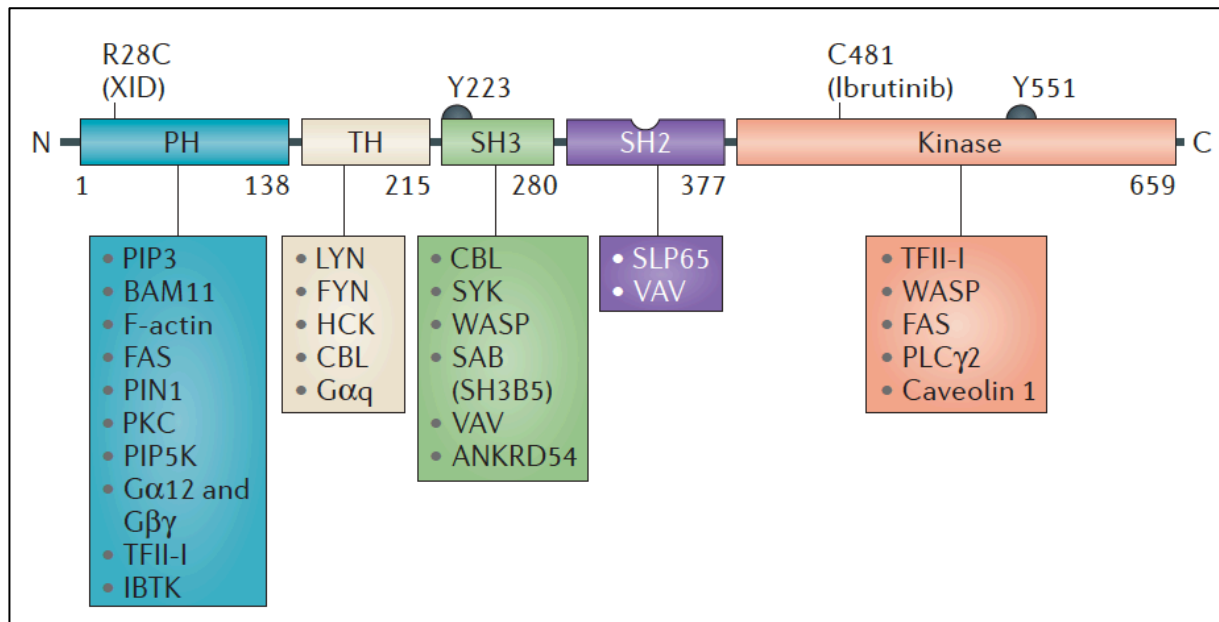


Figure 17. Structure de Btk (adaptée de Hendriks, 2014) (165)

Btk est composée de 5 domaines distincts qui lui permettent d'interagir avec différents partenaires listés dans les cadres de couleur. De plus, les protéines MYD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88), IRAK (IL-1R associated kinase) et plusieurs TLRs par leur domaine Toll/Il1 récepteur (TIR) se lient à Btk sans que le domaine d'interaction n'ait été formellement identifié.

7.1.2 *Btk et signalisation*

Si Btk est un effecteur clef de la signalisation du BCR et participe au développement lymphocytaire B (voir § 1.3), cette protéine est également impliquée dans d'autres voies de signalisation, notamment dans celles des récepteurs aux chimiokines et des TLR.

En effet, Btk joue un rôle déterminant dans la signalisation en aval du CXCR4 et probablement d'autres récepteurs à 7 domaines transmembranaires, par son interaction avec les sous-unités G α et G β des protéines G hétérotrimériques liées aux récepteurs. L'activation de Btk suite à l'activation du CXCR4 serait néanmoins dépendante de Lyn ou Syk (166-169).

L'implication de Btk dans la signalisation des TLR a été évoquée suite à la constatation d'une diminution de la réponse au LPS (lipopolysaccharide), ligand bactérien du TLR4. Après activation, la plupart des TLRs recrute MYD88 (Myeloid differentiation primary response 88). La signalisation TLR induit la transcription de NF- κ B, d'AP1 (Activator Protein 1) et de IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3), entraînant une activation et une prolifération des lymphocytes B, la production d'anticorps et de cytokines inflammatoires. Btk peut aussi interagir directement avec les récepteurs cytoplasmiques TIR (Toll/IL1 Receptor) de la majorité des TLRs, ainsi qu'avec MYD88, TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon- β), MAL (MYD88 adaptor-like protein) et IRAK-1 IL-1R-associated kinase 1 (figure 18) (165).

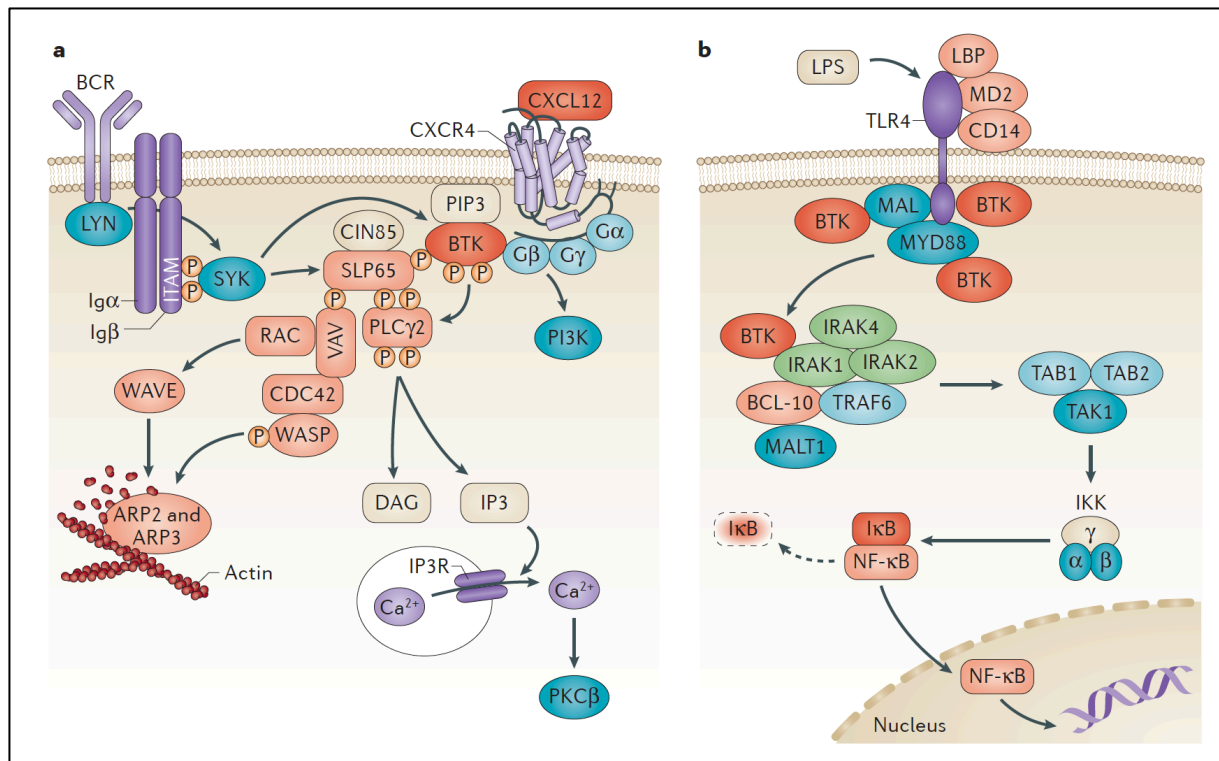


Figure 18. Rôle de Btk dans la signalisation de CXCR4 et des TLR4 (adapté de Hendriks, 2014) (165).

Modèles de la signalisation en aval de CXCR4 (a) et du TLR4 après stimulation par le LPS (b).

7.2 Mode d'action de l'ibrutinib et résistance

L'ibrutinib est le premier inhibiteur de Btk disponible en clinique. En se fixant de manière covalente et irréversible au résidu cystéine en position 481 (dans le domaine kinase) de Btk, il diminue le niveau de phosphorylation du résidu Y223 (dans le domaine SH3) sans changer celui du résidu Y551 (dans le domaine kinase). Si l'ibrutinib bloque l'activité kinase de Btk, il présente également une réactivité croisée avec les protéines TEC et ITK (170). De plus, le séquençage du génome de cellules tumorales de patients échappant au traitement par ibrutinib a démontré l'acquisition récurrente d'une mutation au niveau du résidu cystéine 481 dans le domaine catalytique de Btk, non retrouvée avant l'initiation de l'ibrutinib, empêchant la fixation covalente de l'ibrutinib à Btk et conférant donc une résistance au traitement (171-175). L'acquisition de mutations activatrices de PLCγ2 sous ibrutinib a également été rapportée (174-176). De plus, une analyse séquentielle prospective de l'exome de patients atteints de LLC et traités par ibrutinib a été réalisée, et a mis en

évidence l'existence de variations clonales (évaluées par l'évolution de la fréquence allélique des mutations présentes dans les différents clones) chez 31% des patients pendant la première année de traitement, sans modification significative de la fréquence des gènes drivers de la LLC tels TP53, ATM ou BIRC3, mais néanmoins corrélée à un pronostic défavorable (177).

7.3 Mécanismes d'action de l'ibrutinib dans la LLC

7.3.1 Prolifération et survie

Dans la LLC, l'initiation d'un traitement par ibrutinib se caractérise par une fonte ganglionnaire rapide (en quelques jours) qui est associée à une franche augmentation de la lymphocytose ; cette dernière pouvant perdurer pendant plusieurs mois. Des études de proliférations *in vivo*, réalisées avec des techniques d'eau deutériée, ont mis en évidence une mortalité tissulaire supérieure à la mortalité sanguine, suggérant que la réduction du volume tumoral ganglionnaire était d'avantage liée à une mortalité cellulaire qu'à une redistribution des lymphocytes tumoraux (178). De plus, il a été montré une diminution de la fraction cellulaire proliférative, caractérisée par l'expression du marqueur Ki67, dans les compartiments sanguin et ganglionnaire (179, 180).

A l'inverse des effets *in vivo* de l'ibrutinib, l'ajout de cette drogue sur des cellules leucémiques en culture n'induit pas une augmentation significative de la mort cellulaire. En revanche, l'ibrutinib interfère avec l'avantage de survie cellulaire habituellement observé quand les cellules B de LLC sont co-cultivées en présence de cellules stromales ou stimulées par un anticorps anti-IgM, du BAFF, de l'IL6, l'IL4 ou du TNF α (181, 182). Ces données indiquent que la mortalité des cellules leucémiques liée au traitement par ibrutinib pourrait être due à une privation des signaux de survie habituellement transmis par le microenvironnement.

Plusieurs études menées *in vitro* ou *ex vivo* ont confirmé l'impact du traitement par ibrutinib sur la signalisation du BCR. Notamment, il a été montré une diminution de la phosphorylation de la PLC γ 2 et des protéines ERK et AKT, ainsi qu'une réduction de la transcription de gènes cibles de la cascade du BCR et de gènes cibles de la voie NF- κ B dès 2 jours de traitement des patients par ibrutinib (180, 182). Par ailleurs, dans un modèle murin de LLC (μ TCL1), les cellules tumorales issues de souris traitées par l'ibrutinib présentaient

une réponse calcique diminuée suite à une stimulation *ex-vivo* par un anti-IgM ou du CXCL12 en comparaison aux cellules de souris non traitées (183).

Très récemment, une étude a rapporté l'existence d'une hypométhylation du facteur de transcription NFATC1, situé en aval de la voie du BCR. Cette modification est responsable d'une augmentation de la transcription de ce gène et est corrélée aux différents stades d'évolution de la maladie. Ce travail montre également que l'inhibition de la signalisation du BCR par l'ibrutinib induit une diminution de l'activité de NFAT dans des différentes lignées cellulaires (152).

7.3.2 Ibrutinib, adhésion et migration cellulaire

La chasse ganglionnaire observée chez les patients traités par ibrutinib et l'implication de Btk dans la signalisation en aval des récepteurs aux chimiokines (169) ont orienté les travaux de la recherche vers l'étude des capacités de homing des lymphocytes B de LLC après traitement par ibrutinib. *In vitro*, l'addition d'ibrutinib entraîne une diminution du chimiotactisme en réponse à un gradient des chimiokines CXCL12, CXCL13 ou CCL19 (182, 184, 185). L'analyse quantitative du niveau d'expression membranaire des récepteurs à certaines de ces chimiokines montre une baisse de l'expression membranaire du CCR7 (liant le CCL19) en présence de la drogue. En revanche, si un traitement par ibrutinib provoque une diminution de l'expression du CXCR4 à la surface des cellules leucémiques dans le modèle murin μ -TCL1, cette baisse d'expression n'a pas été confirmée sur des cellules de patients en cours de traitement par ibrutinib (183, 184, 186).

Une diminution de l'adhésion à VCAM-1 et à la fibronectine *in vitro* a été rapportée après traitement par l'ibrutinib, alors qu'aucune diminution significative du CD49d ou du CD29 n'a été mise en évidence. Il est néanmoins à noter que l'activation de la PKC, *via* une stimulation par le PMA, permet de restaurer l'adhésion par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant de VLA-4 (184, 185). Une autre étude récente a récemment démontré une capacité d'activation de VLA-4 après stimulation du BCR *in vitro*, dépendante de PI3K mais indépendante de Btk et persistant sous traitement par ibrutinib. Les données issues de 3 cohortes de patients traités par ibrutinib confirment que l'expression du CD49d est corrélée à une lymphocytose sanguine induite par l'ibrutinib et une fonte ganglionnaire inférieures, ainsi qu'à une survie sans progression plus courte (187).

Enfin, une augmentation de l'expression du S1PR a été mise en évidence sous ibrutinib, favorisant la sortie des LB-LLC du ganglion (186).

7.3.3 Impact de l'ibrutinib sur les lymphocytes T

L'inhibition d'ITK par l'ibrutinib suggère l'existence d'un impact direct de cette drogue sur les lymphocytes T et l'induction d'une polarisation Th1 des LT CD4⁺. En effet, ITK joue un rôle primordial dans la propagation du signal du récepteur des lymphocytes T (TCR) dans les lymphocytes Th2, alors qu'il ne joue qu'un rôle accessoire dans les lymphocytes Th1 ; la signalisation du TCR passant principalement par RLK dans les Th1. Cette polarisation Th1, dont l'effet anti-tumoral pourrait s'ajouter à celui lié à l'inhibition de Btk dans les cellules tumorales, a principalement été démontrée dans plusieurs modèles murins (188, 189).

Plusieurs équipes ont analysé l'évolution de la répartition des différentes sous-populations lymphocytaires T sous ibrutinib. Si trois études ont rapporté une diminution des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ en cours de traitement par ibrutinib (190-192), une troisième étude diverge sur ce point (193). Une diminution du nombre absolu de Treg est retrouvée de façon inconstante sous ibrutinib, mais deux études s'accordent sur le fait que le ratio Treg/CD4⁺ diminue en cours de traitement (192, 193). Une diminution du répertoire Th17, possiblement médiée par ITK, a également été décrite (190). L'analyse de la diversité du répertoire lymphocytaire T par séquençage de dernière génération a mis en évidence l'existence d'un répertoire T restreint chez les patients progressifs, ainsi qu'une augmentation de la diversité de ce répertoire après un an de traitement par ibrutinib (191).

Par ailleurs, toutes les études s'accordent sur l'existence d'une diminution significative de l'expression de PD1 par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et donc du phénomène d'épuisement lymphocytaire (190, 191, 193, 194). De façon concomitante, une diminution de l'expression de PD1-L par les lymphocytes B de LLC a été démontrée, et serait secondaire à l'inhibition de la phosphorylation de STAT3 (194). Une diminution de l'expression de CTLA-4, autre marqueur d'épuisement des lymphocytes T, a également été constatée sous ibrutinib (193).

7.3.4 Impact de l'ibrutinib sur les cellules stromales

L'analyse des interactions entre NLC et LB-LLC sur des biopsies ostéo-médullaires prélevées avant et en cours de traitement par ibrutinib montre une diminution du nombre d'extensions cytoplasmiques des NLC et, par conséquent, une diminution des interactions avec les LB-LLC. Associées à une baisse des concentrations des CCL3 et CCL4 dosées dans le surnageant de moelle, les auteurs ont proposé un modèle dans lequel ce déficit en chimiokines est à l'origine de la diminution du nombre de contacts entre les NLC et les cellules tumorales (190).

Par ailleurs, l'ibrutinib n'altère pas la différenciation des NLC à partir de monocytes sanguins, et ces NLC conservent leur capacité à protéger les lymphocytes B tumoraux de l'apoptose induite par des molécules de chimiothérapie *in vitro* (195). De plus, l'ibrutinib induirait une polarisation des macrophages en M2 immunosuppresseurs pro-tumoraux qui seraient capables de protéger les lymphocytes de LLC de l'apoptose chimio-induite (196). Enfin, un déficit des capacités d'ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) et de phagocytose des lymphocytes NK et des macrophages a été démontré en présence d'ibrutinib, alors même que la cytotoxicité passant par le complément n'est pas modifiée. Sur la base de leurs résultats, les auteurs suggèrent que l'ibrutinib pourrait diminuer l'efficacité de certains anticorps anti-CD20. Le déficit immunitaire, observé chez les patients LLC en cours de traitement par ibrutinib pourrait également expliquer la survenue d'infections inattendues et notamment la survenue de pneumocystoses, même en l'absence de lymphopénie CD4⁺ profonde (197, 198).

Objectifs

La constatation d'un dysfonctionnement du système immunitaire, caractérisé par un déficit de l'immunité anti-tumorale et anti-infectieuse, et la fréquente survenue de complications auto-immunes chez les patients atteints de LLC ont suggéré que les cellules tumorales étaient dotées de propriétés modulant la réponse immunitaire. L'expression de marqueurs phénotypiques communs entre les cellules de LLC et les différentes populations lymphocytaires B décrites dans la littérature nous a permis d'émettre l'hypothèse de l'existence d'une population lymphocytaire B tumorale régulatrice dans la LLC. Mon travail s'intègre dans un des projets du laboratoire qui consiste en l'analyse des propriétés régulatrices des lymphocytes B de LLC. Un travail antérieur a mis en évidence la présence de sous-populations lymphocytaires B sécrétant des facteurs solubles immuno-régulateurs tels que l'IL10 et le TGF β 1 et, exprimant le facteur de transcription FOXP3 connu pour être un marqueur de certaines cellules T régulatrices. Dans le cadre de la poursuite de ce travail, mon projet de thèse a constitué :

- A mettre en évidence la capacité fonctionnelle des lymphocytes tumoraux à induire une modulation du répertoire lymphocytaire T dans des expériences de co-culture par l'analyse de la prolifération lymphocytaire T, de la différenciation Treg et la capacité à des lymphocytes T CD4⁺ à sécréter des cytokines impliquées dans la différenciation Th1 comme le TNF α et l'IFN γ ;
- A affiner la signature phénotypique des lymphocytes B de LLC capables de produire de l'IL10 en analysant l'expression de marqueurs impliqués à la fois dans la prolifération, dans la migration et dans l'interaction avec les lymphocytes T, tout en étudiant l'impact de l'Ibrutinib sur cette signature par une analyse longitudinale d'échantillons de patients atteints de la LLC et traités à Avicenne et à Reims.

L'ensemble des résultats générés a permis la rédaction de deux manuscrits qui sont présentés ci-après.

Résultats

Manuscrit 1 : Les sous-populations de lymphocytes B immuno-régulateurs jouent un rôle majeur dans la progression de la LLC

L'objectif de ce travail était de caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les sous-populations lymphocytaires B de la LLC. L'analyse de la sécrétion cytokinique des cellules tumorales démontre l'existence d'une sécrétion cellulaire hétérogène entre les différents patients de cytokines immunomodulatrices, telles que l'IL10 et le TGFβ1 ; cette sécrétion étant constitutive et augmentée par une stimulation anti-IgM/CD40, respectivement. L'expression du facteur de transcription FOXP3, habituellement considéré comme un des facteurs de transcription majeurs dans les lymphocytes T régulateurs, a également été mise en évidence dans les lymphocytes B de LLC. La production de ces différentes protéines a été corrélée à une signature phénotypique associant une expression élevée du CD5 et du CD19 à des marqueurs des lymphocytes B mémoires et de cellules B activées. De plus, la capacité immunomodulatrice des lymphocytes B de LLC a été validée dans des analyses fonctionnelles grâce à des expériences de co-cultures de lymphocytes B et T. Les résultats démontrent une capacité des lymphocytes tumoraux à induire une différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs, ainsi qu'à inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et leur sécrétion de cytokines impliquées dans la différenciation Th1 (TNFα et IFNγ). Enfin, la création d'un score polyfonctionnel, combinant l'expression de l'IL10, du TGFβ1 et de FOXP3, a permis de le corrélérer aux facteurs pronostiques défavorables de la LLC, que sont le statut non muté des IGHV et l'expression de Zap70 ; la valeur de ce score étant liée à la progression de la LLC tout en pointant l'importance de la dysfonction immunitaire dans la maladie.

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

Arsene Mekinian (1, 2), Anne Quinquenel (1, 2), Marouane Boubaya (4), Maïssa Mhibik (1, 2), Laure Aubard (1, 2), Elisabetta Dondi (1, 2), Noémie Abisoror (1, 2), Fanny Baran-Marszak (1, 2, 3), Rémi Letestu (1, 2, 3), Luc Mouthon (5,6), Vincent Lévy (2, 4), Florence Ajchenbaum-Cymbalista (1, 2, 3), Christine Le Roy* (1, 2) and Nadine Varin-Blank* (1, 2).

(1) INSERM, U978, Bobigny, France

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

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

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

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

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

* Co-senior and corresponding authors

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

UMR InsermU978/ Université Paris 13

UFR SMBH

74 Rue Marcel cachin

93000 Bobigny

France

Email: nadine.varin@inserm.fr and christine.le-roy@inserm.fr

Original Article

Key words: CLL, BCR, IL10, TGFb1, FOXP3, regulatory B cells

Funding and financial conflicts of interest: none

Running title: B regulatory cells function in CLL

Words: Title 96/100; abstract (176), manuscript (5460), 3 Tables and 6 figures, 7 supplementary figures

Abstract

Depending on the cytokines produced, several regulatory B cell (Breg) subsets contribute to immune resolution and their enrichment leads to disease-associated immunosuppression. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a heterogeneous clonal B cell neoplasm ranging from indolent to rapidly progressive clinical course that eludes tumor clearance. This study presents a comprehensive phenotypic and functional analysis of the regulatory subpopulations in CLL patients at various stages of the disease. Cytokines profiling of CLL-B cells evidences the production at various extents of IL-10 and TGFb1. Remarkably, CLL cells express also the FOXP3 transcription factor, an original marker of regulatory T cells. The three proteins are produced by subpopulations with markers of activated and memory B cells defining a specific signature. Based on CD5 CD19 expression, intraclonal heterogeneity showed differential regulatory factors production relevant to disease evolution. Functional studies proved their regulatory capacities targeting T cell differentiation, proliferation and secretion. IL-10, TGFb1 and FOXP3 expressions combined in a polyfunctional index strongly correlated with high-risk factors of progression. This profiling helps to predict progression and pinpoints immune dysfunction in CLL.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoid malignancy prevalent in the elderly presenting with a heterogeneous clinical course. Some patients experience a progressive disease with rapid poor outcome while others exhibit an indolent leukemia that does not impact life expectancy (1). The disease results in the clonal expansion of small, mature B lymphocytes, which accumulate in the bone marrow, blood and secondary lymphoid organs. In progressive patients chemo- and immunotherapies are not curative and residual clonal cancer cells re-populate both lymphoid organs and peripheral blood; the antitumor immune surveillance being ineffective (1, 2). The heterogeneity of CLL has been investigated and related to immunophenotypic markers including CD5, CD19 or CD38 expressions. Moreover, genetic studies have pointed out the importance of stereotyped CDR3 sequences of immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) genes and of antigen receptor (BCR)-triggered pathways leading to apoptotic defect (3, 4). These membrane and signaling features converge to an active antigen-driven selection in the clonal expansion of the malignant cells. Indeed, functional studies have confirmed the relevance of signals propagated by BCR triggering in the heterogeneity of leukemic cell survival *in vitro*. BCR effectors such as Spleen tyrosine kinase, Phospholipase C γ or NFAT transcription factors are often overexpressed and/or constitutively activated in B-CLL cells and allow the expression of target genes important for cell survival (5, 6). Expression of unconventional activators, such as the zeta chain associated protein (ZAP-70) commonly expressed in T and NK cells, is also associated with increased cell survival. In addition, the capacity to generate and propagate such activating signals at the cellular level correlates with disease progression. By contrast, defective signal transduction is prevalent in indolent disease and related to an anergic phenotype of the leukemic cells (7, 8). The important driving force of BCR initiated signals is especially encountered in lymph nodes, which are important sites for antigen recognition and

may account for the accumulation of malignant cells in synergy with microenvironmental factors (9).

Besides heterogeneous signaling capacity, the malignancy is also characterized by an imbalance of the immune subpopulations present in peripheral blood and lymphoid organs of CLL patients. T cell subsets that account for immune surveillance in tumor development encompassing CD4⁺ helpers (Th) and regulatory T cells (Tregs) have an altered ratio in these hematological malignancies (10, 11) Thus, Tregs are increased in CLL and correlate with several clinical/biological features of progressive disease, whereas CD8⁺ T cells from CLL patients show functional defect in proliferation and cytotoxicity, but preserved cytokine production reflecting T-cell exhaustion (12). Such impairment of immunological homeostasis is often observed when ineffective antitumor immunity takes place during neoplasm progression and has been attributed to the production of several regulatory molecules and cytokines by specific B cell subsets ascribed to regulatory B cells (13-16) . Recent data have shown that these B cell subsets play an important role in the direct or indirect suppression of inflammatory response and in the maintenance of tolerance through the production of IL10 (17-20). Various teams have undertaken the phenotypic characterization of these subsets both in murine models and in human pathologies. However, this strategy did not identify a unique consensus but several phenotypes of progenitor populations with suppressive activity (15). Among others, murine CD5⁺ B1a and CD1d^{high}CD5⁺CD19^{high} B10 cells are IL-10 producing cells (21, 22). Studies unraveling the functional properties of the CD5⁺ B1a lineage have uncovered regulatory properties leading to bias of the immune cells repertoire amongst which expansion of the Treg population and suppression of Th1 and Th17 differentiation (23). Human Breg subsets, identified by their capacity to suppress Th1 differentiation and convert CD4⁺ T cells into Tregs *via* IL10 production, have also been described (24, 25). In peripheral blood from both healthy individuals and patients with autoimmune diseases or neoplasms,

various IL10 producing subtypes have been reported (25). The latter include CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} immature B cells, CD19⁺CD24^{high}CD27⁺ B10 cells, CD19⁺CD38⁺CD1d⁺IgM⁺CD147⁺Granzyme⁺ B cells and CD27^{intermediate}CD38^{high} plasmablasts (18, 26, 27). Induction of IL10 in the various subsets seems to require signals from activated CD4⁺ T cells with CD40L playing a major stimulatory role, while IL21-dependant signals rather induce Granzyme (GrB) producing regulatory B cells preferentially (28). Additional induced Bregs can also exert a suppressive mechanism *via* the production of TGFb1 and indoleamine-2,3 dioxygenase (IDO) (29).

Remarkably, the majority of these phenotypic features are commonly observed in B-CLL populations irrespective of their IGHV mutational status. Due to the expression of CD5, CLL-B cells have been hypothesized for long as being derived from a human B1 lineage recognizing natural antibodies (30, 31). At present, CLL-B cells are considered as antigen-experienced B cells with an IGHV mutational status reflecting a T-dependent (mutated IGHV, M-IGHV) or T-independent (unmutated IGHV, UM-IGHV) memory phenotype with expression of CD27 in both cases (1). CLL malignant B cells have a clear survival advantage over the other normal B cells (32). Furthermore, diverse triggering events have been shown to induce IL10 in these cells, which share immunosuppressive capacities with B10 cells (20).

In the present study, we systematically analyzed the capacity for CLL cells from donors with indolent and progressive disease to produce in response to BCR/CD40 triggering key cytokines involved in immune modulation and in tumor surveillance. We found that a subset of leukemic cells of variable prominence produced constitutive IL10 and induced TGFb1. Those cells also expressed the transcription factor FOXP3 that is a hallmark of Tregs. Cells that produce these three regulatory proteins display a specific signature somehow different from the already described B10 cells. Evidently, these cells share the regulatory properties attributed to Bregs toward CD4⁺T cells. Finally, we give evidences that the combination of

the three factors in a polyfunctional score is indicative of progression and might be used for the stratification of the disease. These novel findings provide also important insights on how CLL cells modify their immunological environment to their advantage.

Results

CLL-B cells express heterogeneous immunoregulatory cytokines profile.

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

further induction of TGFβ1 expressing cells upon stimulation while others remained at comparable levels (**Figure 1B**). Nonetheless, the intracellular levels of expression of the two cytokines revealed by the median of fluorescence of the cells was not modified upon stimulation (**Sup Figure 1**) Indeed, flow cytometry on CD5⁺CD19⁺ gated cells revealed a subset of cells co-expressing IL10 and TGFβ1 (**Figure 1C**).

Capacity to secrete various immune modulatory cytokines was also quantified. Cells in culture for 3 days and stimulated with CD40L/anti-IgM showed low levels of IL10 (mean = 0.5 pg/ml) and high levels of TGFβ1 (mean = 800 pg/ml). Interestingly, TGFβ1 was secreted at low or high levels allowing the segregation of two groups. Furthermore, the amount of secreted TGFβ1 in the high secreting group was correlated to the fraction of expressing cells with levels similar to healthy controls (**Figure 1D-E**). All the other cytokines tested were produced at low levels as compared to healthy controls. Similarly to TGFβ1, secretion of TNFα, IL8 and IL6 was induced upon stimulation while IL4, IL1b, IFNγ, IL13, IL2 and IL17 were unchanged (**Figure 1E-F and Sup Figure 2A**). However, their production was not correlated to TGFβ1 secretion (**Figure 1E**). Granzyme B (GrB) expressing cells were rarely observed even when cells were triggered with a major inducer such as IL21/CD40L in contrast with B cells isolated from healthy subjects (**Sup Figure 2B**). Taken together, our results support the idea of a B-CLL cellular subpopulation, present at various extents among cases with a specific cytokine profile evocative of an immunoregulatory population that can further respond to BCR/CD40 stimulation.

CLL-B cells constitutively express FOXP3.

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

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

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

Next, we determined whether a particular CLL-B subtype could account for the expression of IL-10, TGFβ1 and FOXP3. Purified pathological B cells were split into IL-10, TGFβ1 and FOXP3 positive or negative subsets and were then assessed for the level of expression (MFI) of phenotypic markers (CD5, CD19, CD27, CD24, CD25 and CD38), previously described in various regulatory subsets (**Figure 3A-B** and **Sup Figure 4A**). As shown in **Figure 3A**, three phenotypic markers *e.g.* CD5, CD19 and CD27 presented significant differences of

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

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

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

Importantly, the evaluation of IL10, TGFβ1 and FOXP3 expressing cells showed striking differences for every regulatory factor between the two subpopulations, both in unstimulated

or CD40/BCR stimulated cells (**Figure 4C**). This analysis defined the CD5^{high}CD19^{high} subpopulation as the major source of the regulatory factors among CLL-B cells. In comparison the CD5^{dim}CD19^{dim} subset exhibited a lower ability to express IL10, TGFβ1 and FOXP3 (**Figure 4C**). Altogether, these results outline the heterogeneous profile of CLL cells within a single case and a particular subset, defined as CD5^{high}CD19^{high} B cells showing high expression levels of all three regulatory factors IL10, TGFβ1 and FOXP3 and diverging from already described regulatory B cells subsets.

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

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

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

toward the induction of CD4⁺ Tregs and at contrary a suppressive role on TH1 cellular response.

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

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

values were more elevated in IGHV unmutated or ZAP-70 positive cells. A similar analysis on CD5^{low}CD19^{low} subset or on global CLL population associated the score with Zap70 expression only.

By contrast, the novel regulatory score was never correlated with Binet staging of the disease at diagnosis, CD38 expression or metabolic activity (**Figure 6B and Sup Figure 6B-C**) (5, 6). Remarkably, all the patients for whom the frequency of the immunomodulating subpopulations were low (upper cluster of cases in Figure 6A) experienced an indolent disease that did not require treatment. Their negative polyfunctional score was weakly associated with factors at risk of progression (20%, **Table 3**, UPN 14, 28, 20, 21, 24, 13). At the opposite, cases with high frequency of immunomodulating subpopulations (lower cluster of cases in Figure 6A) presented with a progressive disease requiring treatment. Their positive polyfunctional score was majorly associated with factors at risk of progression (58%, **Table 3**, UPN 1, 23, 6, 22, 25). Moreover, a longitudinal analysis for several patients confirmed that the polyfunctional score was negative and stable for patients with an indolent disease (UPN 14, 28 and 13) while those experiencing a progression showed rise of the immunoregulatory score (UPN 2 and 8). Altogether the striking link between the capacity to detect higher levels of the three immunoregulatory factors in the tumor clone and the progressive profile of the patients argues for the validation of the polyfunctional score as a novel independent indicator of risk of progression. It also gives insights into the immunoregulatory capacity of the leukemic population.

Discussion

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

Several reports have suggested implication of IL10 producing CLL-B cells in the immune deficit in CD4⁺ T cells observed along disease progression (19, 20, 26). The major population characterized in the initial study had phenotypic features resembling those of CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B10 cells, the human counterpart of murine CD1d^{hi}CD5⁺CD19^{hi}B10 cells (26). CD5⁺CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ cells formed a relevant subset in the CLL-B cells of our cohort (**Sup Figure 7**). However, the proportions of IL-10⁺, TGFβ1⁺ and FOXP3⁺ cells in this subset were not significantly different from those found in CD24^{inter}CD27⁺ or CD24⁺CD27⁺ cells. In addition, both CD5⁺CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ and CD5⁺CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} subsets were able to produce IL-10 and TGFβ1 cytokines (**Sup Figure 7**). Several other subtypes

such as immature $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$, $CD1d^+CD19^+CD38^+IgM^+CD147^+GrB^+$ or $CD11b^+CD19^+$ cells have also been described as IL10 competent cells (17, 18, 26, 31, 33). The frequency of $CD11b^+$ and $CD24^{hi}CD38^{hi}$ cells among $CD19^+CD5^+$ CLL-B cells was less than 1% and could not account for the IL-10, TGF β 1 and FOXP3 expressions observed (**Sup Figure 7**). Also GrB^+ cells did not represent a significant proportion of CLL-B cells and GrB expression was only slightly induced upon IL21/CD40L triggering as compared to healthy controls (**Sup Figure 2**). Finally, mechanisms of suppression *via* IL10 production have also been ascribed to mature B cells that do not express typical phenotypic markers of CLL-B cells such as plasmablasts or Br1 cells (17). Our results indicate that the major IL10 $^+$ and TGF β 1 $^+$ producing cells are memory $CD5^+CD19^+CD27^+$ that differ from the other described regulatory subtypes with markers such as CD25, CD24 and CD38. Importantly, CLL-B cells also showed differential propensity to induce expression of TGF β 1, an immunoregulatory factor for Tregs induction and CD8 $^+$ T cell anergy. These two immunomodulation have also been documented in CLL (10, 34, 35). Moreover, TGF β 1 expression, when not already at the highest levels, was induced in a BCR/CD40 dependent manner, mimicking T/B cells interactions. We have previously shown that establishment of a threshold response to BCR triggering is mandatory for CLL-B cell heterogeneous survival (5). This result places the signal emanating from antigenic stimulation and crosstalk with the surrounding T cells at the center of the mechanisms responsible for a specific cytokine pattern with regulatory properties. In agreement with this central role of the BCR, we observed induction of several other cytokines involved in the remodeling of the immune response in a pathological environment such as IL6, IL8 or TNF α . The cytokines that rather promote specific helper T cells responses and pro-inflammatory signals, such as IL1 β , IL2, IL4 or IFN γ , were not induced and produced at very low levels as compared to healthy controls. In the pathological context, TGF β 1 was induced at elevated levels while its secretion was not linked to the other

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

Interestingly, CLL-B cells and mainly CD5^{high}CD19^{high} cells expressed also the transcription factor FOXP3 regardless of stimulation. Given that this factor is a major indicator of Tregs and of their immunomodulatory functions, our results demonstrated that FOXP3 is a novel indicator in CLL-B cells. A previous report described FOXP3 as present only in pre-apoptotic B cells in healthy controls (16). Therefore, we comforted our finding using different approaches including viability marker in flow cytometry and cell sorting to exclude any apoptotic cells or Tregs contamination that could account for FOXP3 expression. In CD5⁺CD19⁺ samples we observed a strong match between the productions of the two immunoregulators FOXP3 and TGFβ1. Phenotypically, FOXP3⁺ B cells also expressed CD25, another key marker of Tregs, which has been observed in IL10⁺ Br1 cells with antigen specific suppressive functions (36). Whether some coordinated regulation of FOXP3, TGFβ1, CD5 and CD25 expressions might occur in CLL-B cell subtypes remains to be determined. A relationship between expression of CD5 and IL10 was already documented in CLL-B cells involving STAT3 and NFAT2 activation (37). Moreover, flow cytometry analysis revealed subpopulations expressing both IL10 and TGFβ1 or IL10 and FOXP3. Actually, FOXP3 and STAT3 that is constitutively phosphorylated in CLL are interacting partners for the expression of IL10 in a subset of regulatory T cells and a common regulation of the various proteins should be hypothesized (38).

The regulatory function of such CLL-B cells was demonstrated in co-culture experiments with autologous T cells. First, we observed a strong orientation of T cells toward a regulatory profile with the expansion of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ Tregs. This orientation might

result from the secretion by CLL-B cells of the two main suppressive cytokines IL10 and TGFβ1 (25). This expansion was accompanied by a reduction of two major CD4⁺ T cell populations, *e.g.* expressing TNF-α and IFNγ targets of regulatory B cells, tumor clearance and cytotoxic response (17, 18, 39). This suppressive mechanism was dependent on the ratio in the co-culture between T and B cells and reflecting the cellular distortion observed in CLL patients. Finally, CLL-B cells hindered or suppress, in a T/B ratio dependent manner again, CD4⁺ T cells division, a major hallmark of Bregs. Remarkably, our analysis of the three suppressive factors expression identified the CD5^{high}CD19^{high} subpopulation as the functional subset expressing the highest levels of IL10, TGFβ1 and FOXP3. This CD5^{high}CD19^{high} subset allowed distinction of two groups of cases with differential evolution during patients follow up. A reasonable interpretation of this finding is that high levels of regulatory factors provoke exhaustion of tumor survey mechanisms and tumor escape. At the opposite, the lower levels seen in CD5^{dim}CD19^{dim} do not generate warning signals toward tumor survey. Among the three suppressive factors, TGFβ1 only was statistically linked to ZAP70 expression or to BCR/CD40 triggering in IGHV unmutated patient samples arguing for the involvement of BCR signaling in the induction of TGFβ1⁺ cells. In agreement with this result induction of TGFβ1⁺ Bregs was reported upon stimulation with CTLA-4 by T cells (29). Using T cell-independent CpG stimulation IL10 expressing cells were increased in IGHV mutated cases (20). Besides, our results indicate the presence of a constitutive pool of IL10⁺ cells that was not induced upon B/T triggering.

In contrast with an individual analysis of suppressive factors, recent studies have interestingly reported a combinatorial evaluation of various cytokines or factors as better indicators of a functional subset. For instance, the balance between IL10 and TNFα expression in CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} Bregs was further associated with renal allograft rejection than individual evaluation (40). Similarly, a polyfunctional index for T cells assembling expression

of various cytokines was shown efficient during infectious disease response (41). Our analysis proved the benefit of using such a combinatorial score for its possible association with indicators at risk of progression of CLL patients. Computation of the three factors allowed better understanding of CLL-B cell activation and more importantly of the induction of its regulatory functions. When faced to the cohort of patient biological annotations, the polyfunctional score of the CD5^{high}CD19^{high} subset correlated with two major indicators of B cell activation and antigenic recognition, *e.g.* IGHV mutational status and ZAP70 expression. Similarly, higher polyfunctional score was associated with higher number of pejorative factors and patient disease progression necessitating treatment. With a measure of three different regulatory factors, the additional information given by the polyfunctional score might therefore become a better orientation indicator of disease progression and lack of tumor clearance.

Patients, Materials and Methods

A cohort of 42 CLL patients was used in this study. CLL diagnosis was confirmed using international guidelines (42, 43) and approved by the local ethic committee (CLEA, GHPSSD, Avicenne hospital). The clinical and biological parameters (Service d'Hématologie Biologique de l'Hôpital Avicenne) such as Binet stage at the experiment time, CD38 and ZAP-70 expressions, IGHV gene mutational status, cytogenetic features, P53 mutation, other genetic mutations and need of treatment were analyzed (**Tables 1-3**).

Human cells isolation and cell culture

B and T CD4⁺ lymphocytes were isolated from total blood using Rosette B and CD4⁺ T isolation kits (STEMCELL). Isolated B and T cells subsets purity was assessed by flow cytometry analysis and was typically > 95%. Isolated B and T cells were cultured in RPMI

1640 containing L-glutamine and supplemented with 100 U/mg/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies, USA), and 10% FCS (Biosera) at 37°C in humidified incubator containing 5% CO₂ at the concentration of 2.10⁶/ml for 72 hours. B cells were stimulated or not with a combination of soluble CD40L (1 µg/ml; Miltenyi Biotec) and coated anti-IgM (20 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) or a combination of soluble CD40L and IL21 (50ng/ml, Gibco by Life Technologies). CD4⁺ T cells were stimulated or not by coated anti-CD3 mAb (Hit-3a, 10 µg/ml; Ebioscience) and anti-CD28 mAb (CD28-2, 1 µg/ml; Ebiosciences). For cytokine detection by flow cytometry, Brefeldin A (BFA) (10 µg/ml; Sigma Aldrich), PMA (500 ng/ml; Sigma Aldrich) and Ionomycin (1 µg/ml; Sigma Aldrich) were added for the last 4 hours of culture. For B and CD4⁺ T cells co-culture experiments, B and T cells were mixed at different ratios (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10) reaching a total cell number of 2x10⁶ cells. MTS was assessed as previously described (5, 6).

Cell sorting

Cell sorting was performed with purified CD5⁺CD19⁺ peripheral blood CLL-B cells further labeled with PE-Vio770 anti-CD19 (LT19), PerCP-Vio700 anti-CD3 (REA613), APC-Vio770 anti-CD5 (UCHT2) and VioBlue anti-CD27 (M-T271) (Miltenyi Biotec). After doublet cells exclusion, gating on CD19⁺, CD3⁻, CD5⁺ and CD27^{high} cells was performed. Sorted cells were then lysed to perform Western Blot. Cell-sorting experiments were performed on a FACS ARIA III cell sorter (BD Bioscience).

Western blotting

Sorted cells were lysed in NP40 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 10% Glycerol with protease inhibitors). Proteins (2 to 20 µg) were separated on a 10% SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and incubated with rabbit monoclonal anti-FOXP3 antibody (D608R, Cell Signaling Technologies) and with anti-

β actin mAb (AC-74, Sigma Aldrich), followed by appropriate secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody. Detection was performed using ECL kit (Bio-Rad) and images acquired with a Chemidoc MP (BioRad).

Flow cytometry

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

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

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

Quantification of cytokine secretion in cell supernatants

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

Statistical analysis

Data are expressed as means with SEM or numbers with frequencies. For the comparison of qualitative values, the parametric chi-square test or Fisher's exact test was used and Mann-Whitney U test for the continuous variables or Wilcoxon signed-rank test (paired data). Association between cytokine secretion and producing cells was analyzed using Pearson correlation (r). Unsupervised hierarchical cluster analysis was performed using IL10, TGF β 1 and FOXP3 expression in unstimulated and stimulated state. An index called polyfunctional score was built by combining IL10, TGF β 1 and FOXP3 expression in each state (unstimulated or stimulated) using first component of principal components analysis. The assumption of unidimensionality of these three factors was examined based on the eigenvalues plot (**Supplemental Figure 6A**). All tests were two-sided at a 0.05 significance level. Analyses were carried out using R statistical software version 3.1.2 and Graphpad (Prism 7).

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

Acknowledgments

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

Abbreviations

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

Figure legends

Figure 1: CLL-B cells express immune regulatory cytokines

A-C: Analysis of purified CD5⁺CD19⁺ CLL-B cells from blood or lymph nodes for IL10 and TGFb1 production by flow cytometry. (A and C) Representative dot plots with the percentage of positive populations, (B) Graphic representation of IL10⁺ or TGFb1⁺ cells among blood CD5⁺CD19⁺ cells at the time of isolation (0, n=5) or after three days of culture (3, IL10 n=26, TGFb1 n=30) in the presence (+) or not (-) of stimulatory CD40L and anti-IgM. Dotted lines link individual patient samples. (C) Representative co-expression of IL10 and TGFb1. (D-F) Levels of the indicated cytokines secreted in the culture supernatant were evaluated by MSD technology (n=17). (D right) Linear regression between levels of TGFb1 in the culture supernatant and the percentage of TGFb1⁺ cells is presented (r=0.82, n=9). (E) Secreted cytokines levels from 17 CLL cases (UPN) and 3 healthy control (HC) are shown in a heat map representation. (F) Cells were stimulated (+) or not (-) with CD40L and anti-IgM. Wilcoxon signed-rank test and Pearson's correlation. *P≤ 0.05, ** P≤ 0.01; *ns*, not significant P >0.05.

Figure 2: CLL-B cells express FOXP3

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

antibodies. The dotted line indicates that both sides are obtained from the same western blot. Wilcoxon signed-rank test, *ns*, not significant $P > 0.05$.

Figure 3 : Phenotypic Characterization of CLL-B cells.

(A-B) : Purified B cells were cultured for 72 hours and stained with the indicated membrane markers, and for IL-10, TGF β 1 or FOXP3. MFI of CD5, CD19, CD25, CD27 were compared between IL10 \pm (n=16), TGF- β 1 \pm (n=16) and FOXP3 \pm (n=14) cells in unstimulated (A) and stimulated conditions (CD40L and anti-IgM, B). Ratio of membrane markers MFI between positive and negative cells is graphed. Wilcoxon signed-rank test * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, *ns*, not significant $P > 0.05$.

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

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

Figure 5 : Regulatory functions of CLL-B cells

(A) Purified CD4⁺T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 (S) or not (NS) were cultured for 48 hours in presence or not (-) with CLL-B cells activated with CD40L and anti-IgM at the indicated ratios (T/B). Scatter dot plots indicate the frequency of TNF α ⁺ (left, n=5) and IFN γ ⁺ (right, n=9) cells among CD4⁺T cells. ANOVA test * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$. (B) Bar graphs show the frequency of FOXP3⁺ among CD4⁺ T cells and

CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ Treg cells upon coculture (+) or not (-) with CLL-B cells (1:1 ratio; n=5) Cells were stimulated (+) or not (-) as indicated. Wilcoxon signed-rank test * P≤0.05, ** P≤0.01, ***P≤0.001. (C) Flow cytometry analysis of T cells division cycles using cell trace violet. T cells stimulated (S) or not (NS) were cocultured for 48h with CLL-B cells with the indicated ratios. Representative profile of 4 experiments is depicted.

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

(A) Unsupervised hierarchical cluster analysis of IL-10, TGFβ1 and FOXP3 expressions in a cohort of 28 patients (UPN). Immunoregulatory factors levels in CLL-B cells stimulated or not are depicted in shades of red (higher) and green (lower). (B) Dimensional analysis of the polyfunctional score according to major risk factors: IGHV (Mutate, M; Unmutated, UM), ZAP70 and CD38 expressions (-, Negative and +, positive), Binet stage (A and B or C), and %MTS (Non responder, NR; Responder, R) of CLL progression in the CD5^{high}CD19^{high} subpopulation. Median and [Q1,Q3] are depicted. * P ≤0.05 (Mann-Whitney U test).

Supplementary Figure 1: Expression of immune regulatory cytokines

Flow cytometry analysis of purified CD5⁺CD19⁺ CLL-B cells, stimulated (+) or not (-) with CD40-L and anti-IgM. Median of fluorescence intensity (MFI) of IL10⁺ or TGFb1⁺ cells relative to respective control isotype is presented. *ns*, not significant P>0.05.

Supplementary Figure 2: Expression of cytokines and Granzyme B

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

Supplementary Figure 3: Expression of FOXP3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References

1. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145-62. doi: 10.1038/nrc.2016.8. PubMed PMID: 26911189.
2. Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(6):431-8. Epub 2010/10/27. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.09.006. PubMed PMID: 20920582.
3. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194(11):1639-47. PubMed PMID: 11733578; PubMed Central PMCID: PMC2193523.
4. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous

phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194(11):1625-38. PubMed PMID: 11733577; PubMed Central PMCID: PMCPMC2193527.

5. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(2):356-65. doi: 10.1182/blood-2011-12-397158. PubMed PMID: WOS:000307412400020.

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

7. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008;112(1):188-95. Epub 2008/02/21. doi: 10.1182/blood-2007-09-111344. PubMed PMID: 18292287.

8. Märklin M, Heitmann JS, Fuchs AR, Truckenmüller FM, Gutknecht M, Bugl S, et al. NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 2017;8(1):755. Epub 2017/10/02. doi: 10.1038/s41467-017-00830-y. PubMed PMID: 28970470; PubMed Central PMCID: PMCPMC5624906.

9. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17008. Epub 2017/02/09. doi: 10.1038/nrdp.2017.8. PubMed PMID: 28179635.

10. Taylor JG, Gribben JG. Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects. *Semin Cancer Biol*. 2015;34:36-45. Epub 2015/07/29. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.07.004. PubMed PMID: 26232774; PubMed Central PMCID: PMCPMC4592463.

11. Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J, Wasik E. T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia--the three-color flow cytometry analysis. *Leuk Res*. 2002;26(7):657-60. PubMed PMID: 12008083.

12. Jitschin R, Braun M, Büttner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood*. 2014;124(5):750-60. Epub 2014/05/21. doi: 10.1182/blood-2013-12-546416. PubMed PMID: 24850760.

13. Inoue S, Mai A, Dyer MJ, Cohen GM. Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2006;66(13):6785-92. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4563. PubMed PMID: 16818655.
14. Gorosito Serrán M, Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Acosta Rodriguez EV, Montes CL, Gruppi A. The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. *FEBS Lett.* 2015;589(22):3362-9. Epub 2015/09/28. doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.048. PubMed PMID: 26424657.
15. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity.* 2015;42(4):607-12. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.005. PubMed PMID: 25902480.
16. Noh J, Choi WS, Noh G, Lee JH. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune Netw.* 2010;10(6):247-9. Epub 2010/12/31. doi: 10.4110/in.2010.10.6.247. PubMed PMID: 21286386; PubMed Central PMCID: PMC3026945.
17. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity.* 2014;41(6):1040-51. Epub 2014/11/04. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.016. PubMed PMID: 25484301.
18. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 2010;32(1):129-40. Epub 2010/01/14. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009. PubMed PMID: 20079667.
19. DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia.* 2013;27(1):170-82. Epub 2012/07/13. doi: 10.1038/leu.2012.165. PubMed PMID: 22713648; PubMed Central PMCID: PMC3742013.
20. Drennan S, D'Avola A, Gao Y, Weigel C, Chrysostomou E, Steele AJ, et al. IL-10 production by CLL cells is enhanced in the anergic IGHV mutated subset and associates with reduced DNA methylation of the IL10 locus. *Leukemia.* 2017. Epub 2017/01/03. doi: 10.1038/leu.2016.356. PubMed PMID: 27890932.

21. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(1):34-46. Epub 2010/12/10. doi: 10.1038/nri2901. PubMed PMID: 21151033.
22. Horikawa M, Minard-Colin V, Matsushita T, Tedder TF. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4268-80. Epub 2011/10/24. doi: 10.1172/JCI59266. PubMed PMID: 22019587; PubMed Central PMCID: PMC3204847.
23. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol.* 2011;186(10):5569-79. Epub 2011/04/04. doi: 10.4049/jimmunol.1100284. PubMed PMID: 21464089.
24. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med.* 2013;5(173):173ra23. doi: 10.1126/scitranslmed.3005407. PubMed PMID: 23427243.
25. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol.* 2015;27(10):479-86. Epub 2015/06/12. doi: 10.1093/intimm/dxv038. PubMed PMID: 26071023; PubMed Central PMCID: PMC4587489.
26. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011;117(2):530-41. Epub 2010/10/20. doi: 10.1182/blood-2010-07-294249. PubMed PMID: 20962324; PubMed Central PMCID: PMC3031478.
27. Shalpour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature.* 2015;521(7550):94-8. Epub 2015/04/29. doi: 10.1038/nature14395. PubMed PMID: 25924065; PubMed Central PMCID: PMC4501632.
28. Hagn M, Blackwell SE, Beyer T, Ebel V, Fabricius D, Lindner S, et al. B-CLL cells acquire APC- and CTL-like phenotypic characteristics after stimulation with CpG ODN and IL-21. *Int Immunol.* 2014;26(7):383-95. Epub 2014/02/04. doi: 10.1093/intimm/dxu001. PubMed PMID: 24497611; PubMed Central PMCID: PMC4133571.
29. Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J*

Autoimmun. 2015;59:53-60. Epub 2015/03/07. doi: 10.1016/j.jaut.2015.02.004. PubMed PMID: 25753821.

30. Hamblin TJ, Oscier DG. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev.* 1997;11(3):119-28. PubMed PMID: 9370043.

31. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J Exp Med.* 2011;208(1):67-80. Epub 2011/01/10. doi: 10.1084/jem.20101499. PubMed PMID: 21220451; PubMed Central PMCID: PMC3023138.

32. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:841-94. Epub 2001/12/19. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141018. PubMed PMID: 12615894.

33. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* 2013;73(8):2468-79. Epub 2013/02/05. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3450. PubMed PMID: 23384943.

34. Parekh VV, Prasad DV, Banerjee PP, Joshi BN, Kumar A, Mishra GC. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol.* 2003;170(12):5897-911. PubMed PMID: 12794116.

35. Jak M, Mous R, Remmerswaal EB, Spijker R, Jaspers A, Yagüe A, et al. Enhanced formation and survival of CD4+ CD25hi Foxp3+ T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(5):788-801. doi: 10.1080/10428190902803677. PubMed PMID: 19452318.

36. Vadasz Z, Peri R, Eiza N, Slobodin G, Balbir-Gurman A, Toubi E. The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *J Immunol Res.* 2015;2015:254245. Epub 2015/10/04. doi: 10.1155/2015/254245. PubMed PMID: 26504851; PubMed Central PMCID: PMC4609458.

37. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, et al. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol.* 2011;186(8):4835-44. Epub 2011/03/11. doi: 10.4049/jimmunol.1003050. PubMed PMID: 21398617.

38. Hossain DM, Panda AK, Manna A, Mohanty S, Bhattacharjee P, Bhattacharyya S, et al. FoxP3 acts as a cotranscription factor with STAT3 in tumor-induced regulatory T cells. *Immunity*. 2013;39(6):1057-69. Epub 2013/12/05. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.005. PubMed PMID: 24315995.
39. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun*. 2011;36(3-4):228-38. Epub 2011/02/12. doi: 10.1016/j.jaut.2011.01.005. PubMed PMID: 21316922.
40. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, Carter CR, Davison A, Hernandez-Fuentes M, et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(7):1575-85. Epub 2014/03/07. doi: 10.1681/ASN.2013080837. PubMed PMID: 24610932; PubMed Central PMCID: PMC4073434.
41. Larsen M, Arnaud L, Hié M, Parizot C, Dorgham K, Shoukry M, et al. Multiparameter grouping delineates heterogeneous populations of human IL-17 and/or IL-22 T-cell producers that share antigen specificities with other T-cell subsets. *Eur J Immunol*. 2011;41(9):2596-605. Epub 2011/08/04. doi: 10.1002/eji.201041131. PubMed PMID: 21688259.
42. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-56. Epub 2008/01/23. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906. PubMed PMID: 18216293; PubMed Central PMCID: PMC2972576.
43. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26 Suppl 5:v78-84. doi: 10.1093/annonc/mdv303. PubMed PMID: 26314781.

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

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

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

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

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

Footnotes:

- A. F: female and M: male
- B. UM: unmutated; M: mutated; ND: not determined
- C. POS: positive; NEG: negative
- D. Metabolic activity in response to anti-IgM stimulation; R: Responder \geq 25%; NR: Non-Responder $<$ 25%

Table 3: CLL features and polyfunctional score

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

- A. 0: no treatment at experiment time; 1: treatment at the experiment
 B. 0: A at the experiment time; 1: B or C treatment at the experiment
 C. 0: Zap70 negative; 1: Zap70 positive
 D. 0: IGVH mutated; 1: IGVH unmutated
 E. 0: CD38 negative; 1: CD38 positive
 F. 0: del17 and/or del11 negative; 1: del17 and/or del11 positive
 G. 0: TP53 WT; 1: TP53 mutated
 H. 0: no mutated; 1: at least one mutated gene (NOTCH1, POT1, RPS15, SF3B1, BIRC3, FBW7, ATM, MYD88, PLCG2)

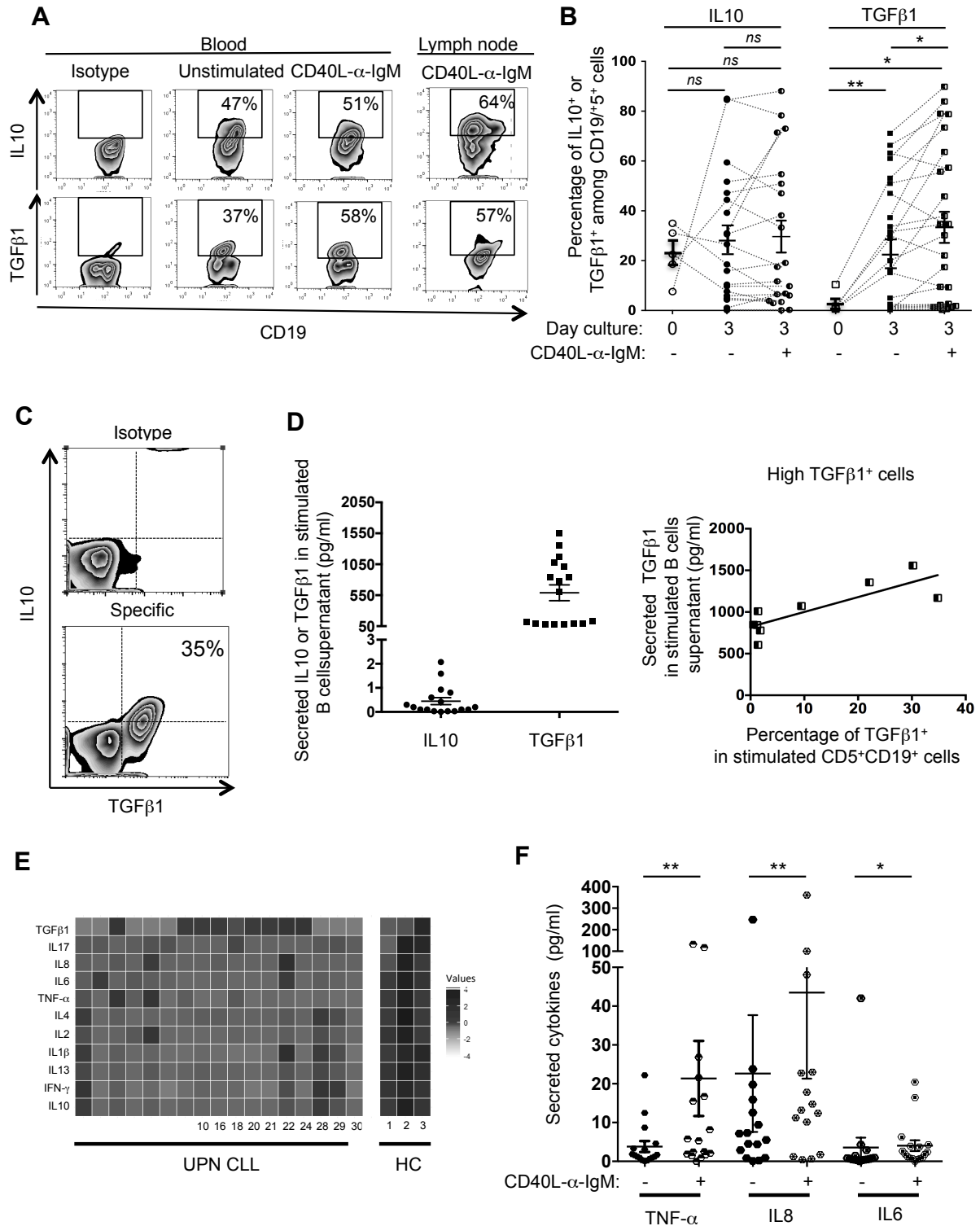


Figure 1

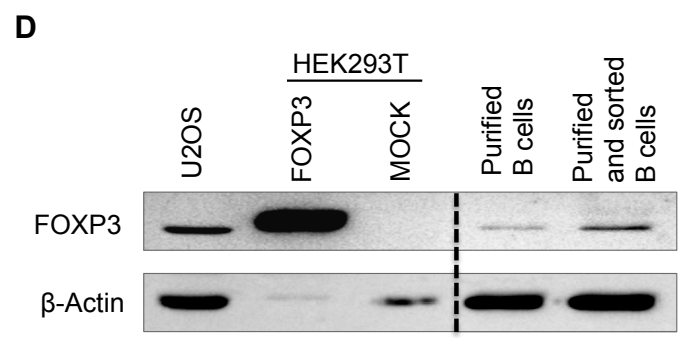
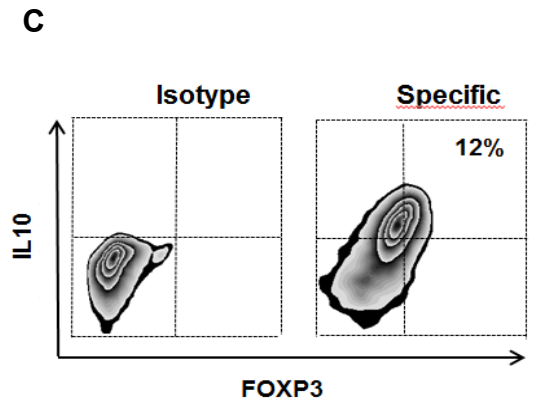
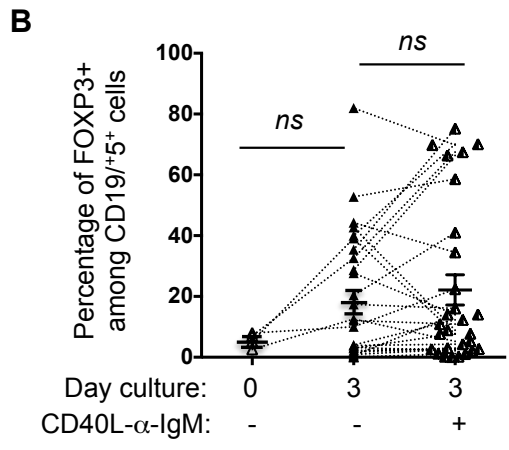
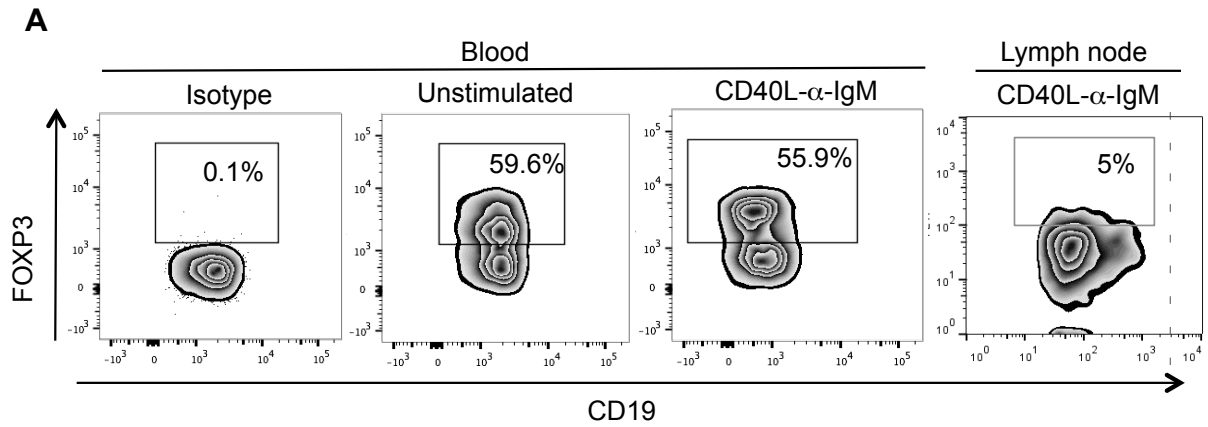


Figure 2

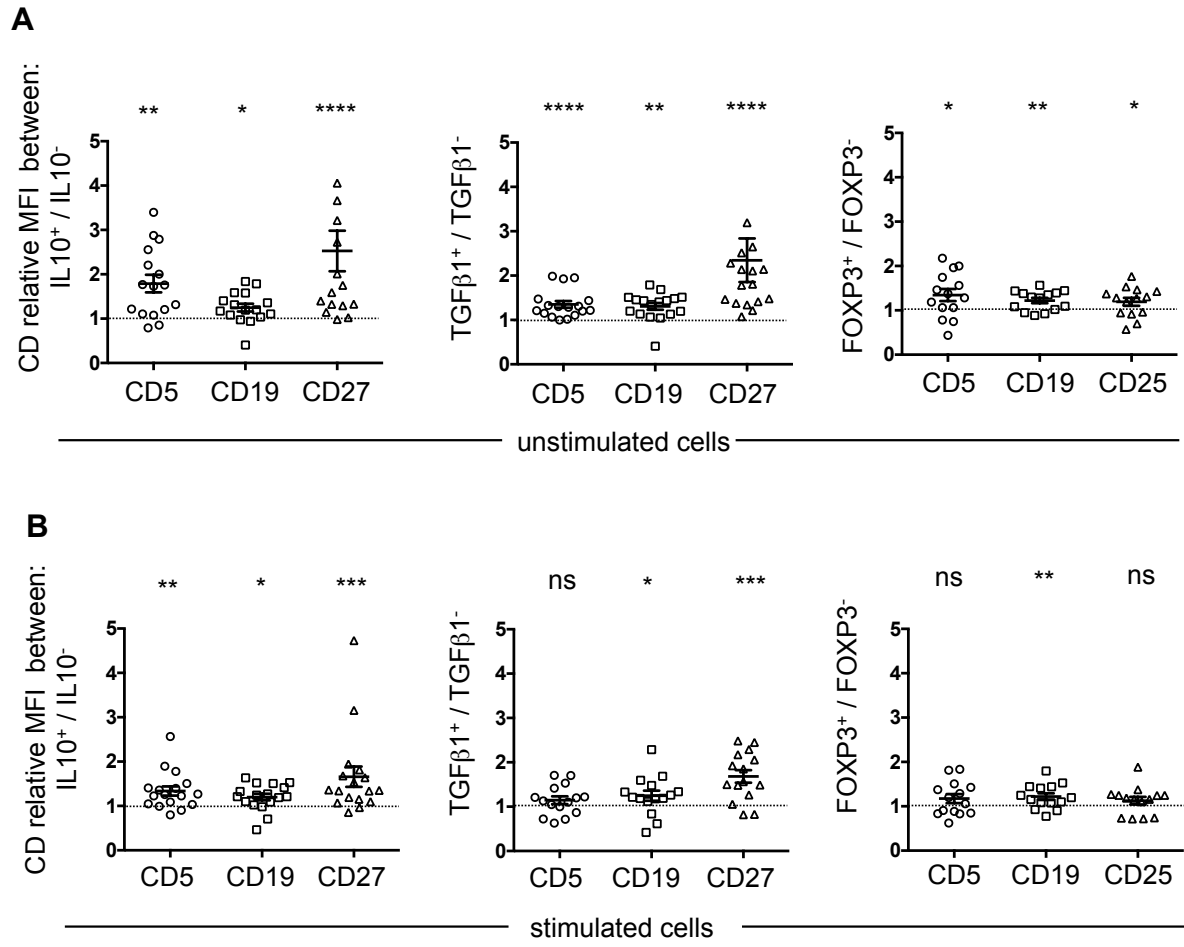


Figure 3

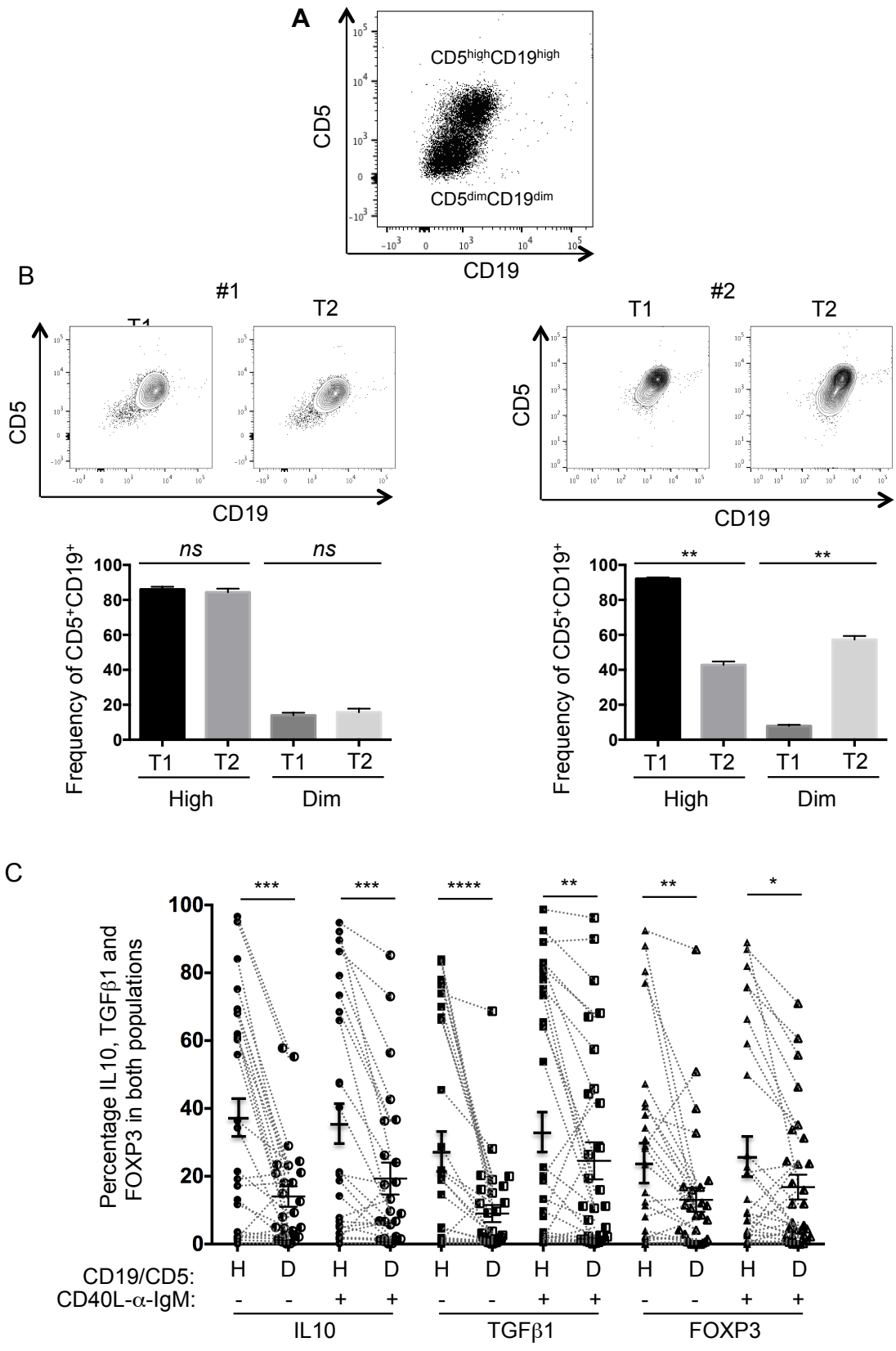


Figure 4

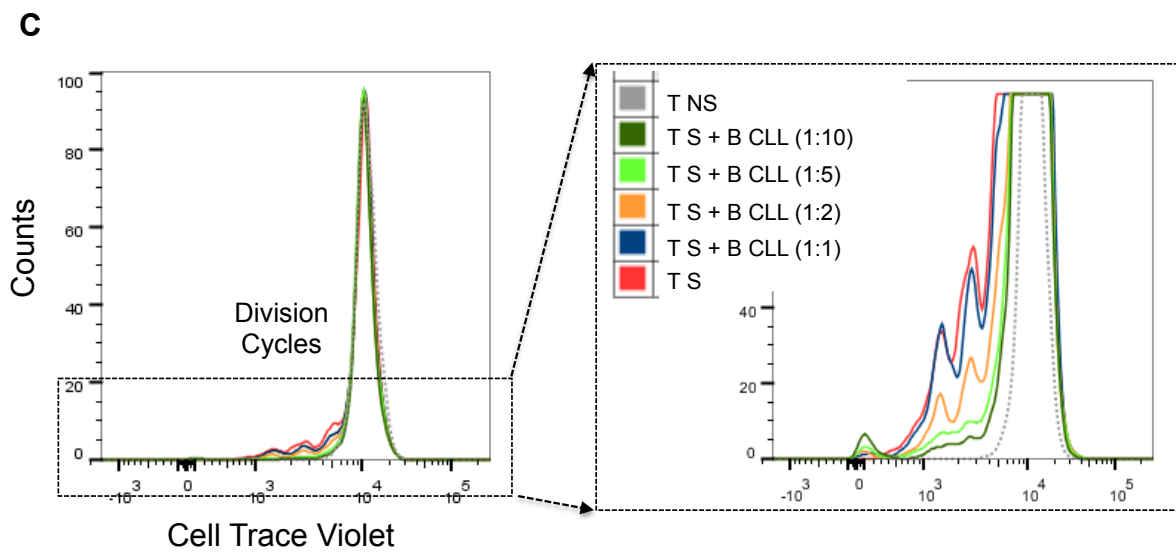
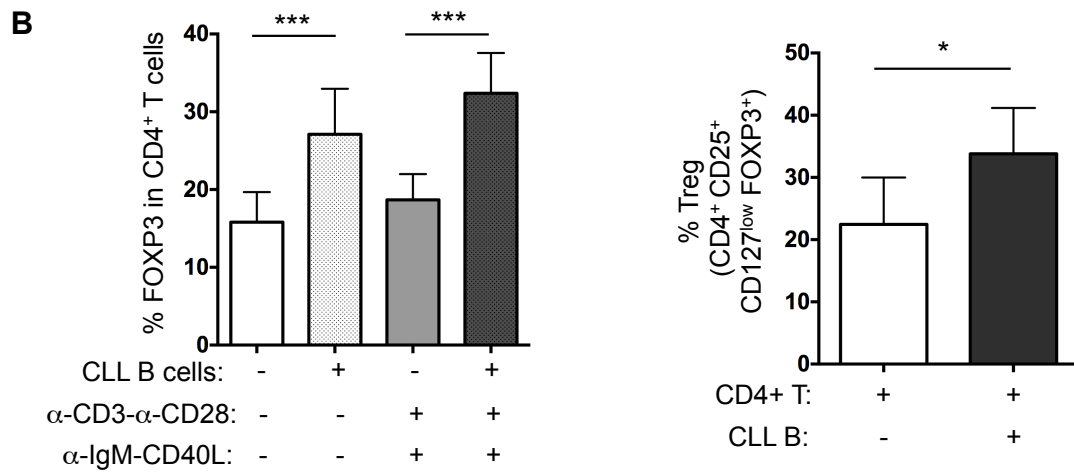
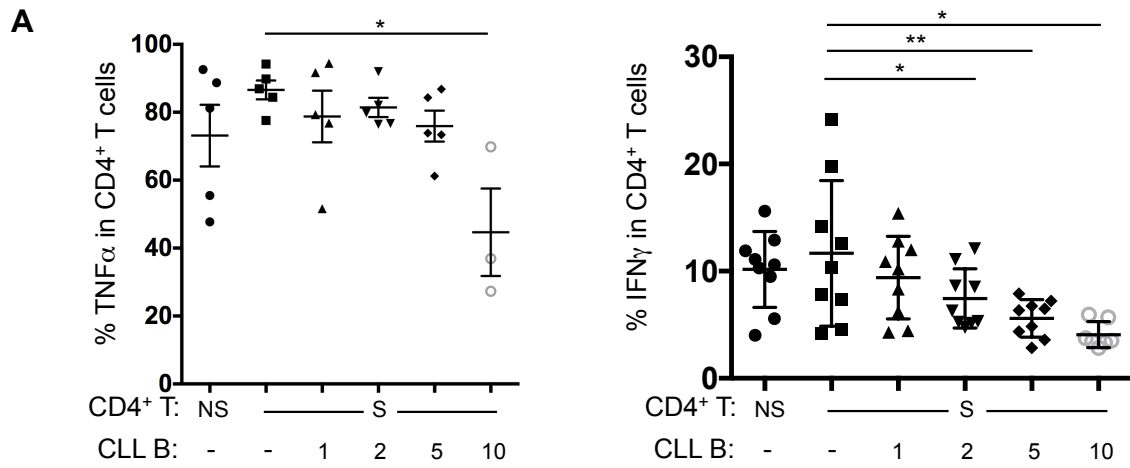
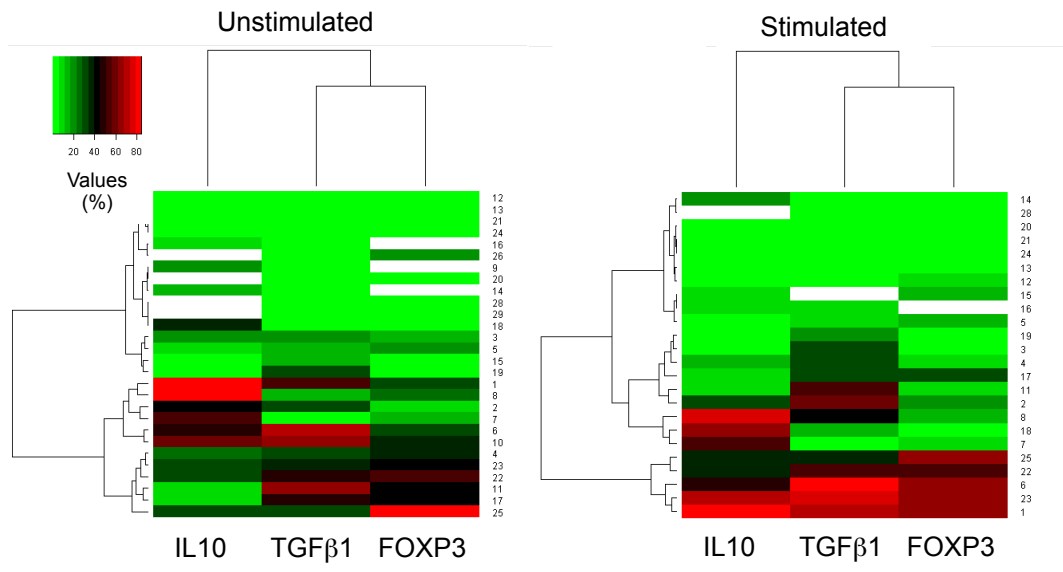
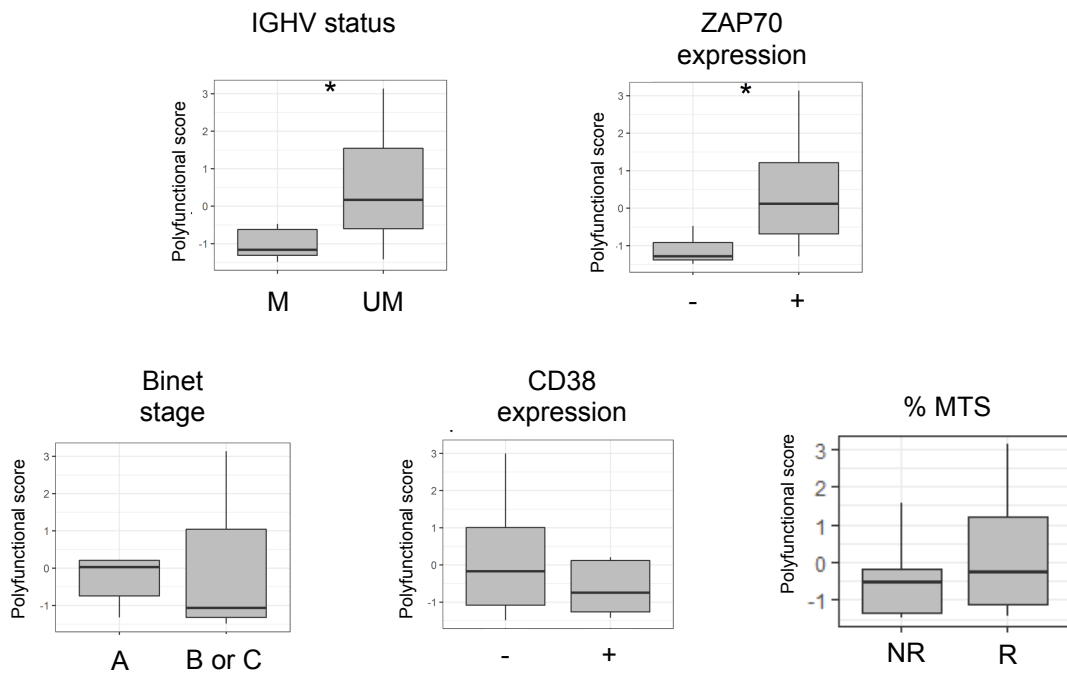
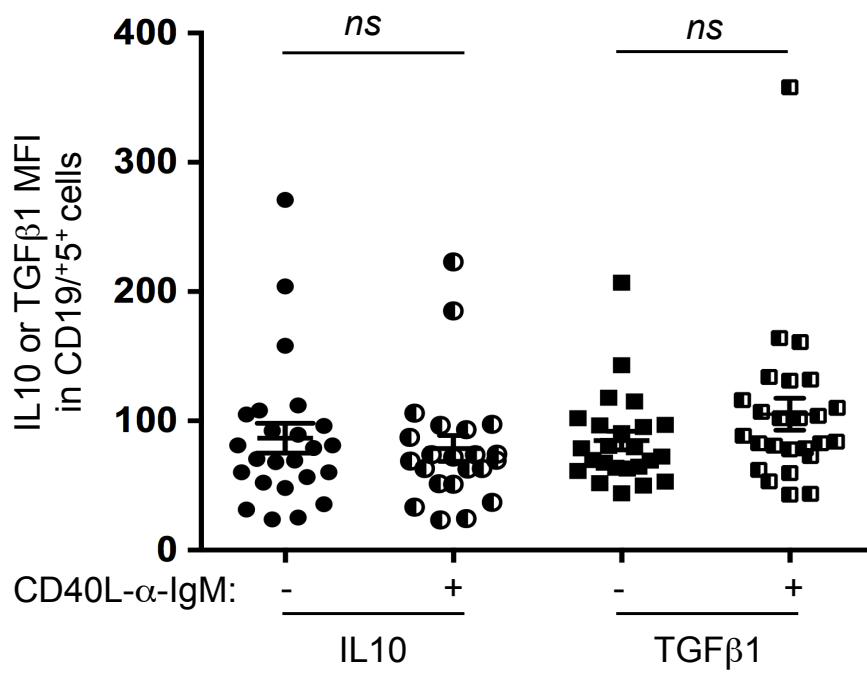
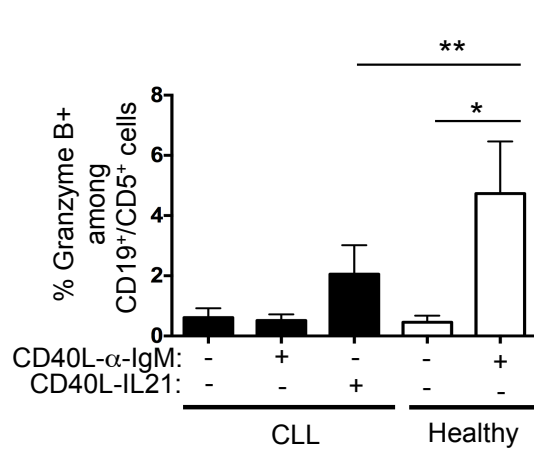
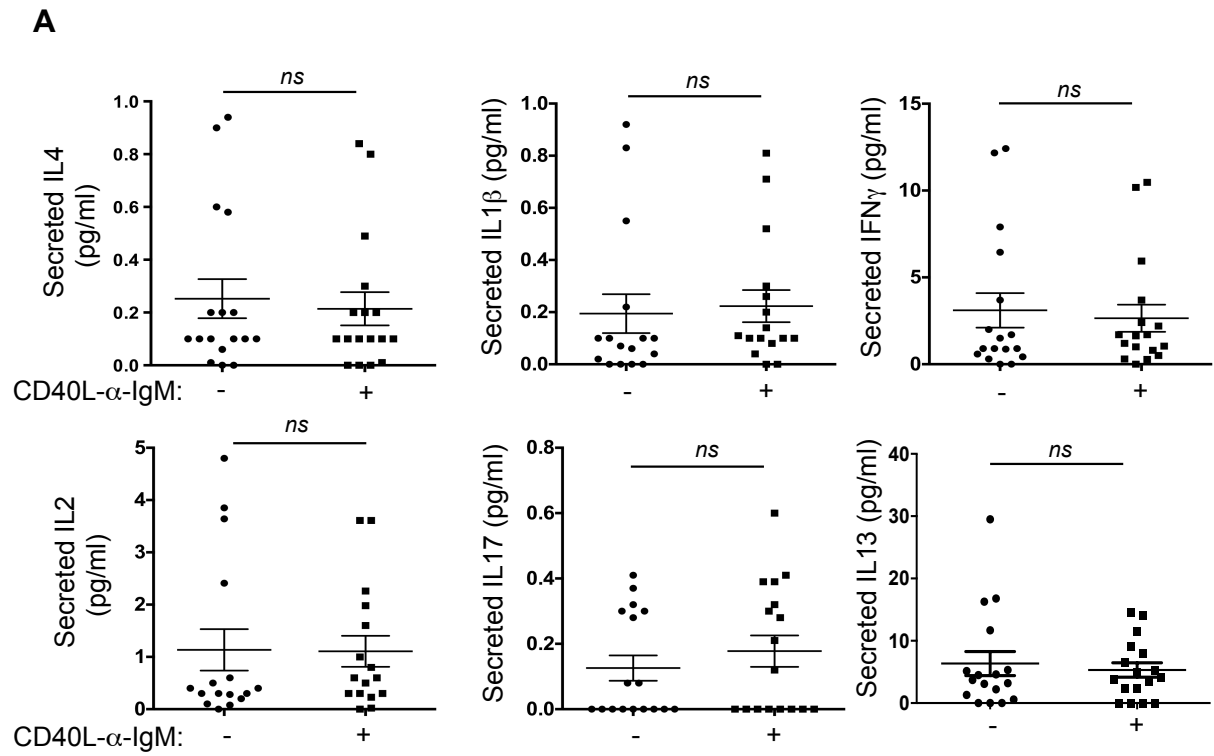


Figure 5

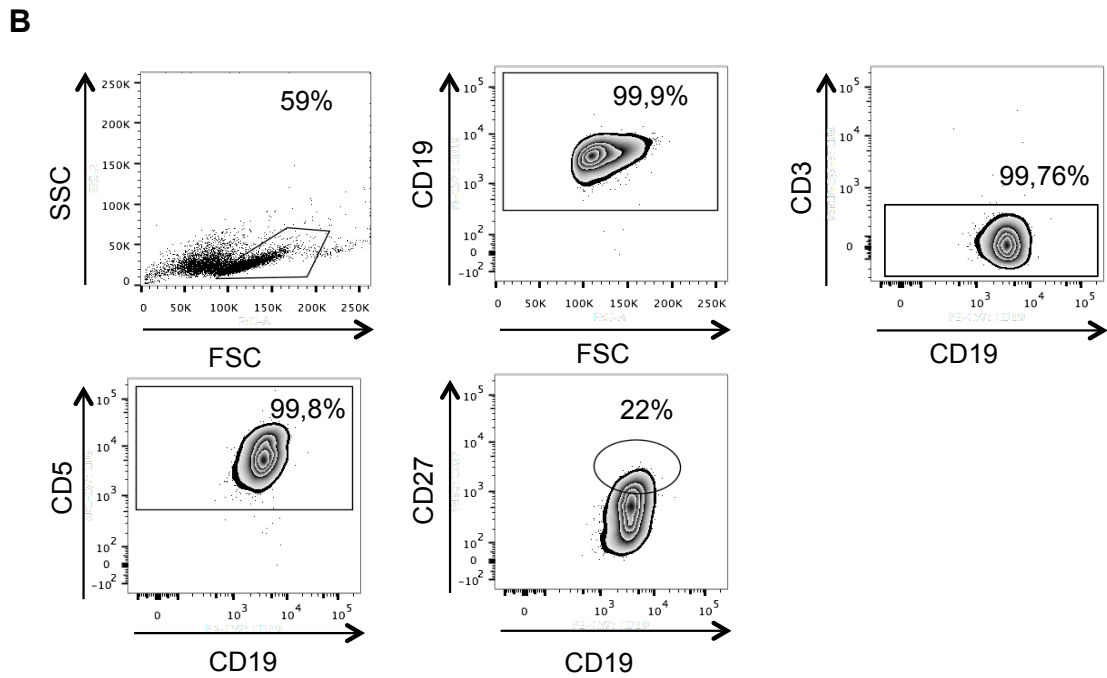
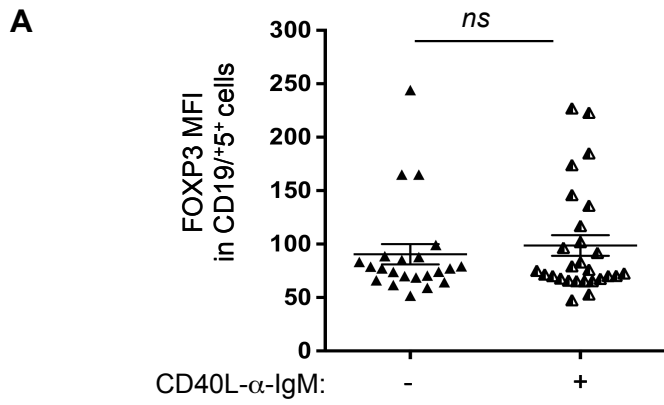
A**B****Figure 6**



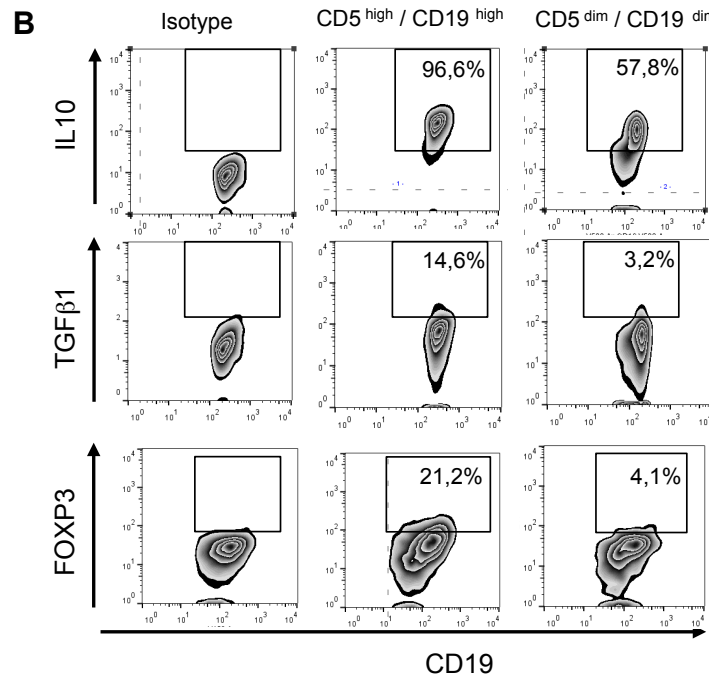
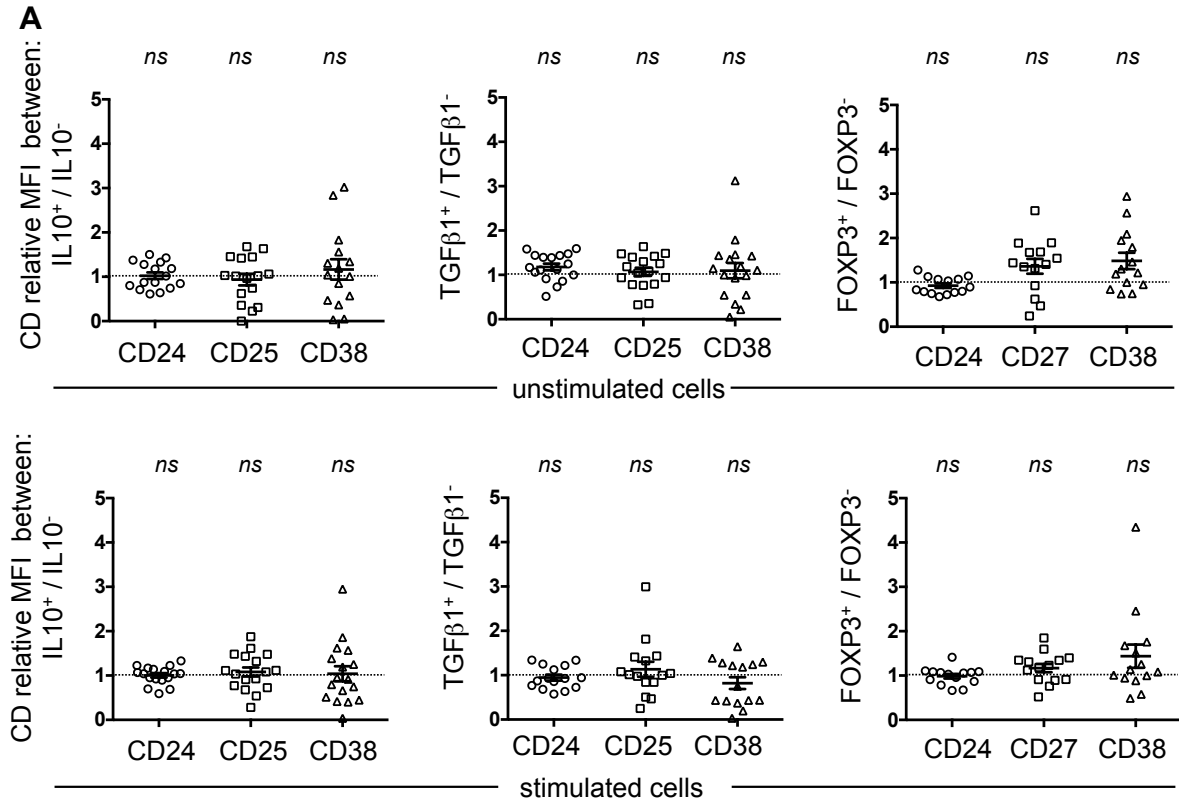
Supplementary Figure 1



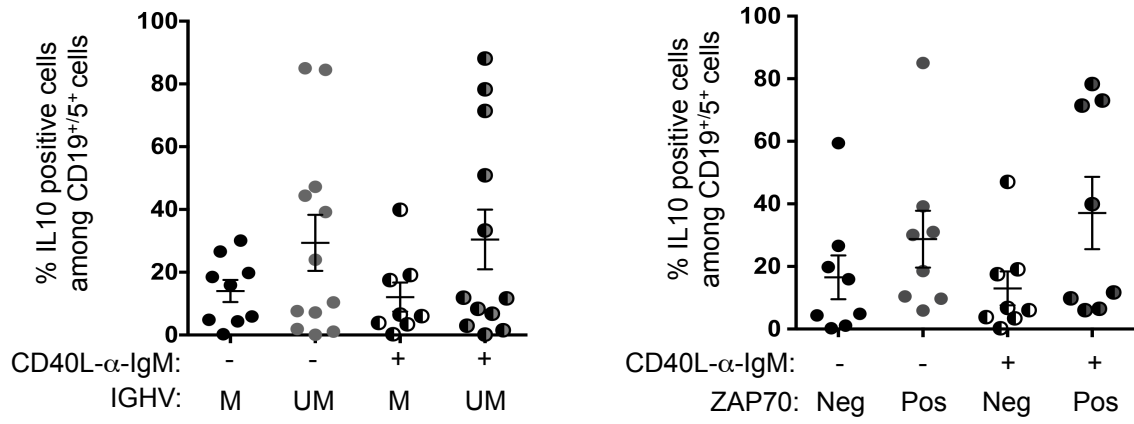
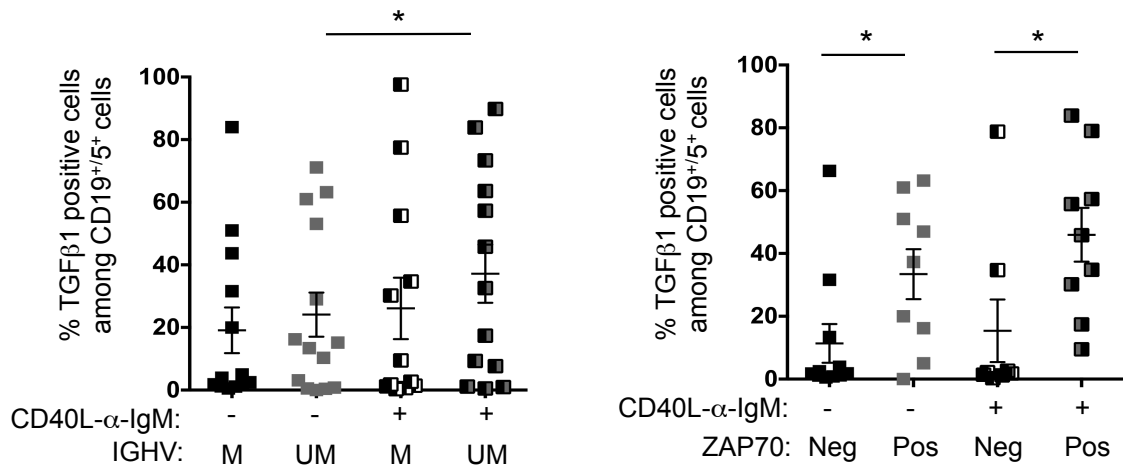
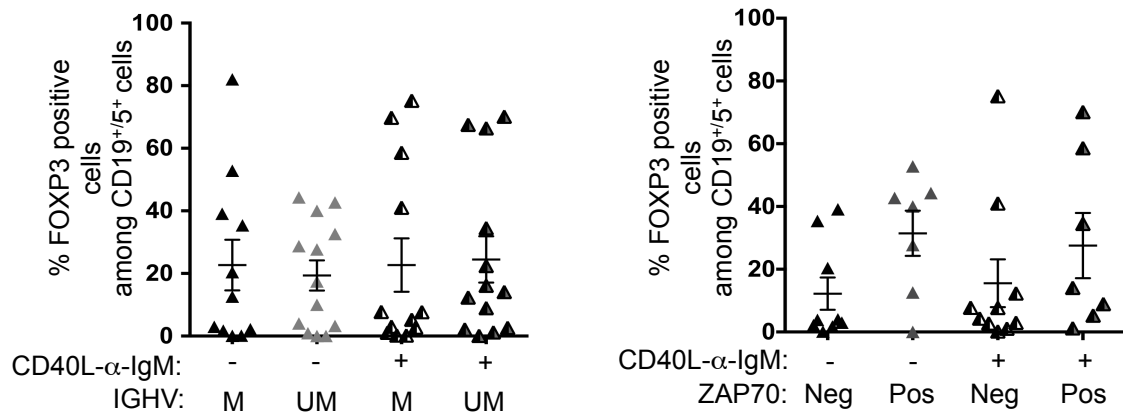
Supplementary Figure 2



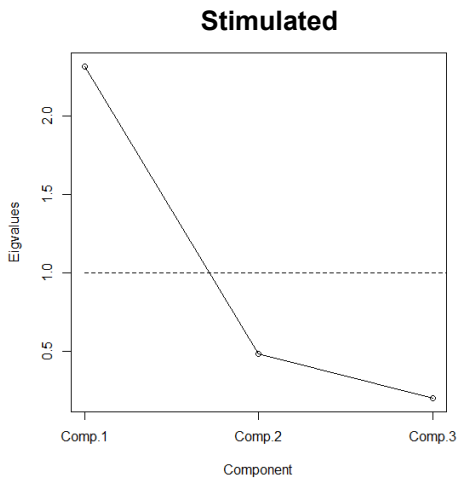
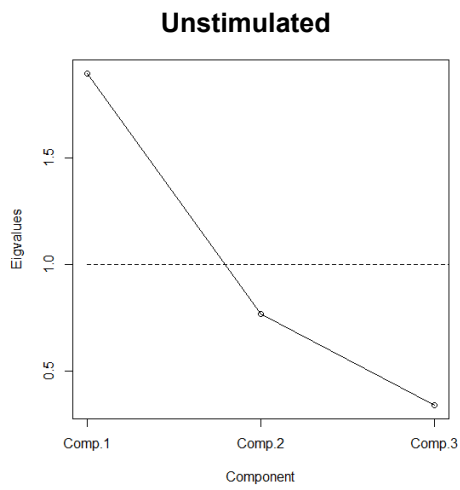
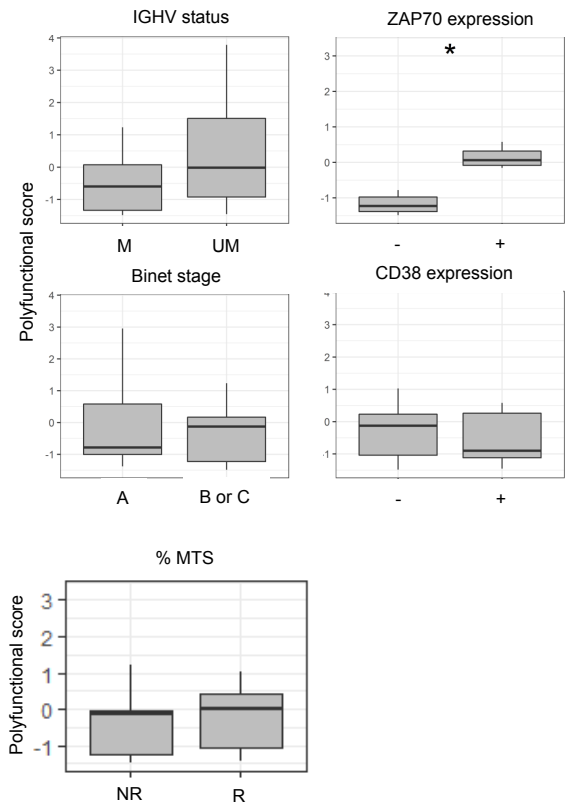
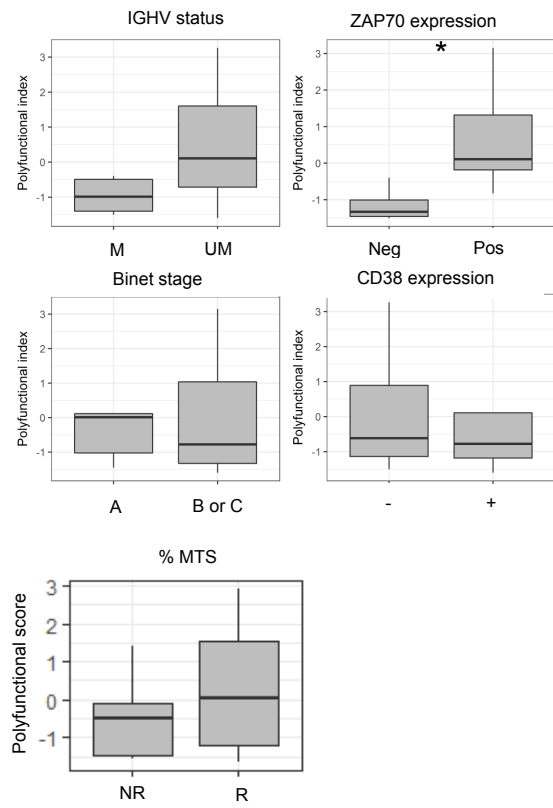
Supplementary Figure 3

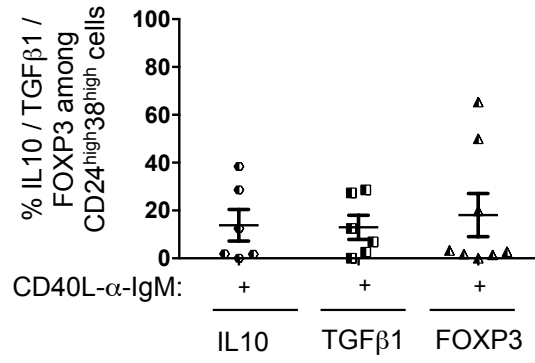
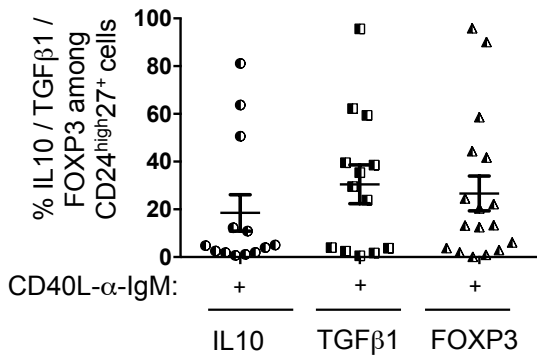
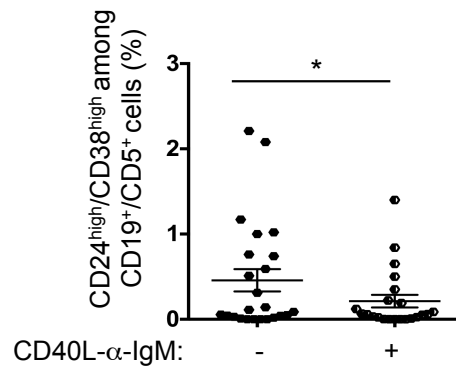
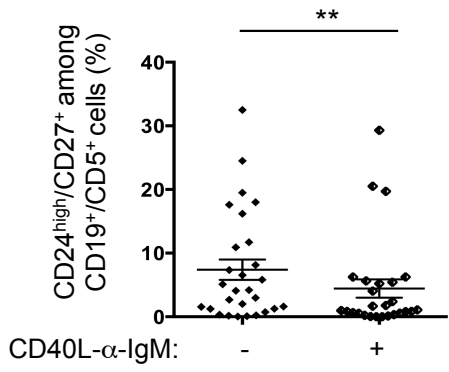


Supplementary Figure 4

A**B****C**

Supplementary Figure 5

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



Supplementary Figure 7

Manuscrit 2 : Les cellules productrices d'IL-10 possèdent des caractéristiques communes avec celles de la fraction proliférative et sont la cible précoce d'un traitement par ibrutinib des patients LLC.

Suite à la démonstration de l'existence de sous-populations régulatrices chez les patients LLC (manuscrit 1), nous nous sommes focalisés sur la sous-population IL10⁺ en la définissant plus précisément d'un point de vue phénotypique et fonctionnel ainsi qu'en l'évaluant chez des patients indolents et progressifs, avant et en cours de traitement Ibrutinib. Sur ces deux cohortes de patients, la capacité des cellules B de LLC à sécréter de l'IL10 a été effectuée après 72 heures de culture *in vitro* en l'absence ou en présence d'une co-stimulation avec de l'anti-IgM/CD40L ou d'une stimulation simple avec du CpG.

Nos résultats de cytométrie en flux après un co-marquage extra- et intra-cellulaire des cellules de LLC chez des patients indolents et progressifs montrent une fréquence de la sous-population IL10⁺ significativement plus élevée chez les patients évolutifs, et ce quelle que soit la condition de culture. De plus, une caractérisation phénotypique par cytométrie de flux des niveaux d'expression de différentes molécules de surface impliquées dans le homing, la migration et les interactions entre les lymphocytes B et T démontre que les cellules IL10⁺ ont des caractéristiques communes à celles de la fraction proliférative ; fraction cellulaire considérée comme ayant émigré des centres de prolifération des ganglions lymphatiques. Ces caractéristiques communes sont une diminution de l'expression membranaire du CXCR4 (CXCR4^{lo}), une hausse de l'expression en surface du CD5, de l'IgM, du CD40 et HLA-DR.

Ces résultats nous ont conduit à suivre l'évolution de la sous-population IL10⁺ dans des cellules de patients atteints de LLC et traités par ibrutinib à Reims et Avicenne. Nos données de cytométrie en flux, normalisées par la lymphocytose des patients à chaque point du traitement, démontrent une diminution du nombre de cellules IL10⁺ rapidement après l'initiation du traitement. A l'inverse, après une augmentation précoce transitoire, aucune modification du nombre de cellules IL10⁻ n'a été observée au cours de cette période de suivi. Ce comportement différentiel des deux sous-populations suggère une action ciblée de l'ibrutinib sur la sous-population IL10⁺. De plus, la clairance sanguine de cette sous-population est similaire à celle de la fraction CXCR4^{low}, confortant l'idée selon laquelle les cellules IL-10+ appartiennent à la fraction proliférative.

L'ensemble de ces résultats établit un lien entre la capacité de production de l'IL10 et la fraction proliférative de la LLC et démontre l'importance de cette production par les cellules B de LLC dans la progression tumorale. L'existence d'une diminution rapide de l'IL10 sous ibrutinib apporte un nouvel éclairage sur les capacités immunomodulatrices d'un traitement par ibrutinib.

**IL10-producing CLL B cells share features with the proliferative fraction targeted
during Ibrutinib therapy**

Quinquenel Anne (1, 2, 3), Aubard Laure (1, 2), Pascale Cornillet-Lefebvre (4), Lévy Vincent (2, 5), Delmer Alain (3), Ajchenbaum-Cymbalista Florence (1, 2, 6), Varin-Blank Nadine* (1, 2) and Le Roy Christine* (1, 2).

(1) INSERM, U978, Bobigny, France

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

(3) Service d'hématologie clinique, CHU de Reims, hôpital Robert Debré, Reims, France

(4) Service d'hématologie biologique, CHU de Reims, hôpital Robert Debré, Reims, France

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

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

* Co-senior and corresponding authors

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

UMR InsermU978/ Université Paris 13

UFR SMBH

74 Rue Marcel cachin

93000 Bobigny

France

Email: christine.le-roy@inserm.fr and nadine.varin@inserm.fr

Letter to Editor:

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a mature CD5⁺ B cells neoplasm that accumulates in the peripheral blood and other tissues, including bone marrow, spleen and lymph nodes [1]. By interfering with other blood cells and/or altering the architecture of several invaded tissues, malignant B lymphocytes alter the immune system from CLL patients [2-7]. Indeed, increased regulatory T cells (Treg) number in CLL cases contributes to immune-suppression that facilitates disease progression [8, 9]. Human and mouse CLL B cell subpopulations produce the immune-regulatory factor, IL-10, and the IL-10 producing tumor B cells not only support Treg differentiation but also suppress monocyte/macrophage function as well as Helper T cell proliferation and differentiation ([10-14] and submitted manuscript). The B cell production of IL-10 is regulated by various pathways [15, 16], including Toll like receptors and the B Cell Receptor (BCR) mediated signaling; the latter playing a crucial role in CLL pathogenesis and progression [16, 17]. In CLL, ibrutinib, an efficient present therapy triggers this pathway by targeting Btk [18]. IL-10 production is also dependent on the interaction between B and T lymphocytes, as *ex-vivo* stimulation with CD40L enhances the ability of B cells to produce the interleukin in various murine and human models [15]. To date, the impact of IL10 production by CLL B cells in disease progression remains unclear, especially regarding IGHV mutational status, a well-accepted prognostic factor in CLL [10, 11]. In this work, we gained insight on characterizing IL-10 producing CLL B cells in untreated patients and followed their frequency among indolent, progressive and Ibrutinib-treated CLL patients.

We first characterized the proportion of the CLL B cells which produces the soluble factor IL-10 in samples purified from indolent cases and from progressive cases immediately prior to Ibrutinib treatment. Cells from both CLL cases were stimulated or not with anti-IgM/CD40L or CpG for 3 days, treated for 5 hours with PIB (PMA, Ionomycin, Brefeldin)

before being labelled for extracellular CD19 and CD5 markers and intracellular IL10 cytokine and then analyzed by flow cytometry (Figure 1A, dot plots). The proportion of IL-10⁺ CD19⁺ CD5⁺ cells (Figure 1A, graph) was not modified upon three days of stimulation with anti-IgM/CD40L but was significantly enhanced upon CpG stimulation in samples from both indolent and progressive patients. Remarkably, the IL-10⁺ CD19⁺ CD5⁺ cell proportion was much higher in samples from progressive patients compared to the indolent ones, regardless of the stimulation conditions. These data suggested an association between the amount of IL-10 producing CLL B cells and disease progression.

To characterize phenotypically the IL-10⁺ CLL subpopulation in samples from untreated patients (n=10), cells were co-labelled with various cell surface markers. After flow cytometry analysis, markers MFI ratios between IL-10⁺ and IL-10⁻ cell subpopulations were calculated and graphed. As shown in Figure 1B, in unstimulated conditions, IL-10⁺ cells compared with IL-10⁻ cells expressed higher IgM/BCR, CD5, CD40 and HLA-DR, lower CXCR4 as well as equivalent CXCR5 levels. The IL-10⁺/IL-10⁻ ratio signature in basal conditions remained unchanged upon anti-IgM/CD40L or CpG stimulation (Figure 1B). Despite that both IL-10⁻ and IL-10⁺ CLL B cells were all positive for the tested membrane markers, the higher or lower densities of these proteins defined an IL10⁺ extracellular signature that contains some of the main phenotypic characteristics of CLL proliferative cells that reside in lymph nodes and are released within blood flow. Similarly to CLL proliferative fraction, IL10⁺ cells showed diminished CXCR4 that may maintain B cells in contact with stromal components, up-regulated CD5 revealing B cell activation [19-22], upper IgM expression [21] indicating BCR-dependent cell survival advantage [17], as well as upper CD40 [7] and HLA-DR reflecting an improved ability to enhance T-cell activation and immune synapse formation [21]. Despite its crucial role for tumor cell trafficking into B cell follicles [23], similar CXCR5 expression between IL10⁻ and IL10⁺ cells in unstimulated

conditions and its increase in IL10⁺ cells upon stimulations indicates that it should not be considered as a differential marker of IL10⁺ B cells.

Further investigation of the IL10⁺ cells activation profile was completed by flow cytometry measurement of intracellular phosphorylated Btk and PLC γ 2, two downstream effectors involved in multiple signaling pathways. Using phosphorylation sites reflecting protein activation, IL10⁺ cells compared to their negative cell counterparts showed enhanced activation of both proteins. The higher phospho-signature of both signaling effectors in IL-10⁺ cells compared to IL-10⁻ cells was not modified upon anti-IgM/CD40L and CpG stimulations (Figure 1C). This result argued for the IL10⁺ cells being a more activated fraction.

Furthermore, the functional characterization of both subpopulations by flow cytometry revealed that IL-10⁺ cells produced higher levels of CCL3 and CCL4 chemokines as compared to IL10⁻ cells in both basal and stimulated conditions (Figure 1D). As CCL3 and CCL4 chemokines are strongly upregulated genes in CLL cells retained in lymph nodes [20], the signature of the IL-10⁺ cells in the blood stream comforts the idea that the IL-10⁺ subpopulation was part of the proliferative fraction that overflowed from lymphoid tissues where activation and proliferation are more active.

Since our results demonstrated that the IL-10⁺ subpopulation from untreated patients recapitulates most of the features of the CLL proliferative fraction and that its frequency was strongly increased in progressive patients, we envisioned a differential outcome for the two subpopulations during ibrutinib therapy. Ibrutinib was shown to disrupt the interaction between CLL cells and their microenvironment. To follow the evolution of both IL-10⁺ and IL-10⁻ subpopulations, we analyzed serial blood samples from 13 CLL patients, who received Ibrutinib treatment for 1, 4 and 12 weeks. The absolute numbers of IL-10⁻ and IL10⁺ cells in CLL samples were evaluated by normalizing the frequency of IL10⁺ CD19⁺ CD5⁺ and IL10⁻

CD19⁺ CD5⁺ cells to patients' lymphocytosis at each time point. As shown in Figure 2A, the absolute number of IL-10⁻ cells increased in the blood during the first week of therapy and then stayed unchanged up to 12 weeks. This kinetic curve reflected the observed Ibrutinib-dependent egress of the CLL B cells from the lymph nodes with the rapid release of the malignant B cells into the blood (data not shown). In contrast, the absolute number of IL-10⁺ cells that are 5 times less abundant before treatment did not change during the first week of therapy but dropped dramatically at week 4 and remained very low at week 12. None of the *ex-vivo* stimulations, *e.g.* anti-IgM/CD40L or CpG, modified both kinetics (Figure 2A and Supplementary Figure S1A). Interestingly, the variation of IL10⁺ CD19⁺ CD5⁺ cell numbers up on ibrutinib treatment was differential with those of CCL3⁺- or CCL4⁺- CD19⁺ CD5⁺ cells isolated from the same CLL patients. The number of CCL3⁺ CD19⁺ CD5⁺ cells decreased at week 12 only while the number of CCL4⁺ CD19⁺ CD5⁺ cells did not change all along ibrutinib treatment (Figures 2B and C, left panels). Upon *ex-vivo* anti-IgM/CD40L stimulation, both numbers of CCL3⁺ and CCL4⁺ CLL B cells were enhanced and remained constant during the first 12 weeks of therapy (Figures 2B and C, right panels). In contrast, their negative counterparts (IL10⁻, CCL3⁻ and CCL4⁻ CD19⁺ CD5⁺) behaved similarly with a peak in the blood at week 1 and remained unchanged for at least 12 weeks of treatment. These data confirmed the enhancement of both chemokines upon *ex-vivo* BCR engagement of CLL B cells but appeared contradictory with the decreased CCL3 and CCL4 plasma concentrations observed in ibrutinib-treated patients [24, 25]. One possible explanation might be the absence of direct correlation between the presence of both chemokines in patients' blood with their productions by CLL B cells. Thus, our data demonstrated that ibrutinib treatment led to a much faster clearance of the IL-10⁺ subpopulation compared to the IL-10⁻. Considering the various clearances of IL-10⁺, CCL3⁺ and CCL4⁺ subpopulations, our results demonstrated that CLL cells' capacity to produce various soluble factors was differentially sensitive to *in vivo*

Btk inhibition. Phosphoflow measurement of the activated form of Btk (pY²²³) in unstimulated CLL B cells confirmed a gradual decrease of these levels at weeks 1 and 4 of Ibrutinib treatment without a complete abrogation of the phosphorylation (Supplementary Figure S1B). Comparison between the IL-10⁺ subpopulation total clearance and the relative decrease of active Btk in CLL B cells during therapy suggested that the IL-10⁺ proliferative fraction is dependent on a minimal Btk activity. Another possible explanation of this result would be a differential expression of Btk's conformational forms [26] between IL10⁺ and IL10⁻ subpopulations that might be differentially targeted by Ibrutinib. Interestingly, following by flow cytometry CXCR4 expression at the plasma membrane of CLL B cells upon Ibrutinib treatment showed no change of the global CXCR4 MFIs (Supplementary Figure S1C). However, two clear subpopulations expressing low and high levels of the chemokine receptor were observed (Figure 2D, left panels). Normalizing the percentage of CXCR4^{low} and CXCR4^{high} cell populations by patients' lymphocytosis at each time point of ibrutinib therapy revealed that the two subpopulations behaved differentially during *in vivo* treatment. The CXCR4^{high} cell number reached a peak at week 1 and remained steady (Figure 2D, right graph). In contrast, CXCR4^{low} cell number decreased rapidly within the first week and remained weak until twelve weeks of *in vivo* ibrutinib treatment. The clear parallel between the drops of the IL10⁺ cells and the CXCR4^{low} cells during drug therapy argues for ibrutinib targeting the most proliferative fraction of CLL released from lymph node.

Altogether, identifying IL-10⁺ subpopulation as part of the proliferative fraction of the CLL cells, underscore the significance of this subpopulation in the progression of the disease and provide new clues on the mechanisms underlying the therapeutic effect of Ibrutinib.

Figure legends:

Figure 1. Frequency of CLL B cells expressing IL-10 is higher in progressive compared with indolent cases and share characteristics with a proliferative fraction.

A: Analysis of purified CD5⁺ CD19⁺ CLL B cells for IL10 expression by flow cytometry (left panel). Graphic representation of percentages of IL10⁺ cells after three days of culture in the presence (+) or absence (-) of anti-IgM/CD40L or CpG stimulation. Comparison between indolent previously untreated patients (N=8) and progressive patients (N=13) (right panel). Mann Whitney test * P≤0.05, ** P≤0.01, ***P≤0.001, **** P≤0.0001, *ns*, not significant P >0.05. **B-D:** Comparison between IL10⁺ and IL10⁻ cells in 10 previously untreated patients. Cells were cultured and stimulated (+) or not (-) with anti-IgM/CD40L or CpG for three days. Comparison of the expression of IgM, CD5, CD40, HLA-DR, CXCR4 and CXCR5 (**B**), of pY²²³BTK and pY⁷⁵⁹PLCg2 (**C**) and of the percentage of cells expressing CCL3 and CCL4 (**D**) in the IL10⁺ and IL10⁻ subpopulations is expressed as the ratio between the MFI or percentage in IL10⁺ and IL10⁻ cells. Wilcoxon test * P≤0.05, ** P≤0.01, ***P≤0.001, **** P≤0.0001, *ns*, not significant P >0.05.

Figure 2. The IL-10⁺ and CXCR4^{low}, but not CCL3⁺ and CCL4⁺ subpopulations, are rapidly decreased in CLL Ibrutinib-treated patients.

A: Evolution of IL10 producing cells from patients upon ibrutinib therapy. Graphic representation of the total number of IL10⁺ producing B cells prior to ibrutinib treatment and after 1, 4 and 12 weeks of therapy. Cells were cultured for 3 days in the absence (left) or presence (right) of anti-IgM/CD40L stimulation and the frequency of IL10⁻ and IL10⁺ cells was assessed by flow cytometry. The percentage of cells was normalized to the total lymphocytosis to determine the total number of IL10 producing cells. **B and C:** Evolution of

CCL3 (B) and CCL4 (C) producing cells from patients upon Ibrutinib therapy. Culture conditions and graphic representations are similar to A. **D:** Evolution of CXCR4^{low} and CXCR4^{high} subpopulations among CLL B cells from ibrutinib-treated cases. Flow cytometry analysis of purified CD5⁺ CD19⁺ CLL B cells for CXCR4 expression showed two subpopulations, CXCR4^{low} and CXCR4^{high} respectively (dot plots, left). Graphic representation of the total number of both CXCR4 subpopulations before Ibrutinib treatment and after 1, 4 and 12 weeks of therapy. The percentage of CXCR4^{low} and CXCR4^{high} were normalized to corresponding patients' lymphocytosis to determine the total number of cells in both subpopulations (right panel). Wilcoxon test * P≤0.05, ** P≤0.01, ***P≤0.001,**** P≤0.0001, *ns*, not significant P >0.05.

Supplementary Figure S1. *In vivo* Ibrutinib treatment impacts IL-10⁺ subpopulation stimulated *ex-vivo* with CpG, Btk activation and plasma membrane CXCR4 in CLL B cells.

A: Graphic representation of the total number of IL10⁺ producing B cells before ibrutinib treatment and after 1, 4 and 12 weeks of therapy. Cells were cultured for 3 days in the presence of CpG stimulation and the frequency of IL10⁺ cells was assessed by flow cytometry. Results are presented as described in Figure 2. **B:** Phosphoflow analysis of CLL B cells with an antibody directed against activated Btk (pY²²³) allowed to graph its MFIs before and during Ibrutinib therapy. **C:** Evolution of the total CXCR4 membrane expression in CLL B cells during Ibrutinib therapy. Results are expressed as the ratio of the CXCR4 MFI at each time point over CXCR4 MFI before treatment and graphed. Wilcoxon test * P≤0.05, ** P≤0.01, ***P≤0.001,**** P≤0.0001, *ns*, not significant P >0.05.

Author Contributions: AQ and AL performed the experiments. AQ, NVB and CLR apprehended the project, analyzed the data, generated figures and wrote the manuscript. AQ, VL, AD, PCL and FAC assumed follow-up of the patients, provided patients samples and contributed patients clinical and biological parameters.

Acknowledgments

AQ was the recipient of a Jansen fellowship. We thank the Labex INFLAMEX, contract ANR11 IDEX00502 for its financial support as well as the Tumorothèque of Champagne-Ardenne for the patients' samples.

REFERENCES

1. Fabbri, G. and R. Dalla-Favera, *The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(3): p. 145-62.
2. Riches, J.C. and J.G. Gribben, *Understanding the immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia: potential clinical implications*. Hematol Oncol Clin North Am, 2013. **27**(2): p. 207-35.
3. Moreira, J., et al., *Infectious complications among individuals with clinical monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): a cohort study of newly diagnosed cases compared to controls*. Leukemia, 2013. **27**(1): p. 136-41.
4. Forconi, F., *Three years of ibrutinib in CLL*. Blood, 2015. **125**(16): p. 2455-6.
5. Solomon, B.M., et al., *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*. J Clin Oncol, 2013. **31**(7): p. 930-7.
6. Morrison, V.A., *Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches*. Best Pract Res Clin Haematol, 2010. **23**(1): p. 145-53.
7. van Attekum, M.H., E. Eldering, and A.P. Kater, *Chronic lymphocytic leukemia cells are active participants in microenvironmental cross-talk*. Haematologica, 2017. **102**(9): p. 1469-1476.

8. Giannopoulos, K., et al., *Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Oncol Rep*, 2008. **20**(3): p. 677-82.
9. Jak, M., et al., *Enhanced formation and survival of CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ T-cells in chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2009. **50**(5): p. 788-801.
10. DiLillo, D.J., et al., *Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function*. *Leukemia*, 2013. **27**(1): p. 170-82.
11. Drennan, S., et al., *IL-10 production by CLL cells is enhanced in the anergic IGHV mutated subset and associates with reduced DNA methylation of the IL10 locus*. *Leukemia*, 2017. **31**(8): p. 1686-1694.
12. Alhakeem, S.S., et al., *Role of B cell receptor signaling in IL-10 production by normal and malignant B-1 cells*. *Ann N Y Acad Sci*, 2015. **1362**: p. 239-249.
13. Saulep-Easton, D., et al., *The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells*. *Leukemia*, 2016. **30**(1): p. 163-72.
14. Mohr, A., et al., *Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(5): p. e1132977.
15. Mauri, C. and A. Bosma, *Immune regulatory function of B cells*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 221-41.
16. Mauri, C. and M. Menon, *Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(3): p. 772-779.
17. Le Roy, C., et al., *The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2012. **120**(2): p. 356-65.
18. Byrd, J.C., et al., *Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(1): p. 32-42.
19. Calissano, C., et al., *Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells*. *Mol Med*, 2011. **17**(11-12): p. 1374-82.
20. Herishanu, Y., et al., *The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 563-74.
21. Pasikowska, M., et al., *Phenotype and immune function of lymph node and peripheral blood CLL cells are linked to transendothelial migration*. *Blood*, 2016. **128**(4): p. 563-73.

22. Herndon, T.M., et al., *Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood*. *Leukemia*, 2017. **31**(6): p. 1340-1347.
23. Heinig, K., et al., *Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(12): p. 1448-65.
24. Burger, J.A., et al., *High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation*. *Blood*, 2009. **113**(13): p. 3050-8.
25. Ponader, S., et al., *The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo*. *Blood*, 2012. **119**(5): p. 1182-9.
26. Joseph, R.E., et al., *Achieving a Graded Immune Response: BTK Adopts a Range of Active/Inactive Conformations Dictated by Multiple Interdomain Contacts*. *Structure*, 2017. **25**(10): p. 1481-1494.e4.

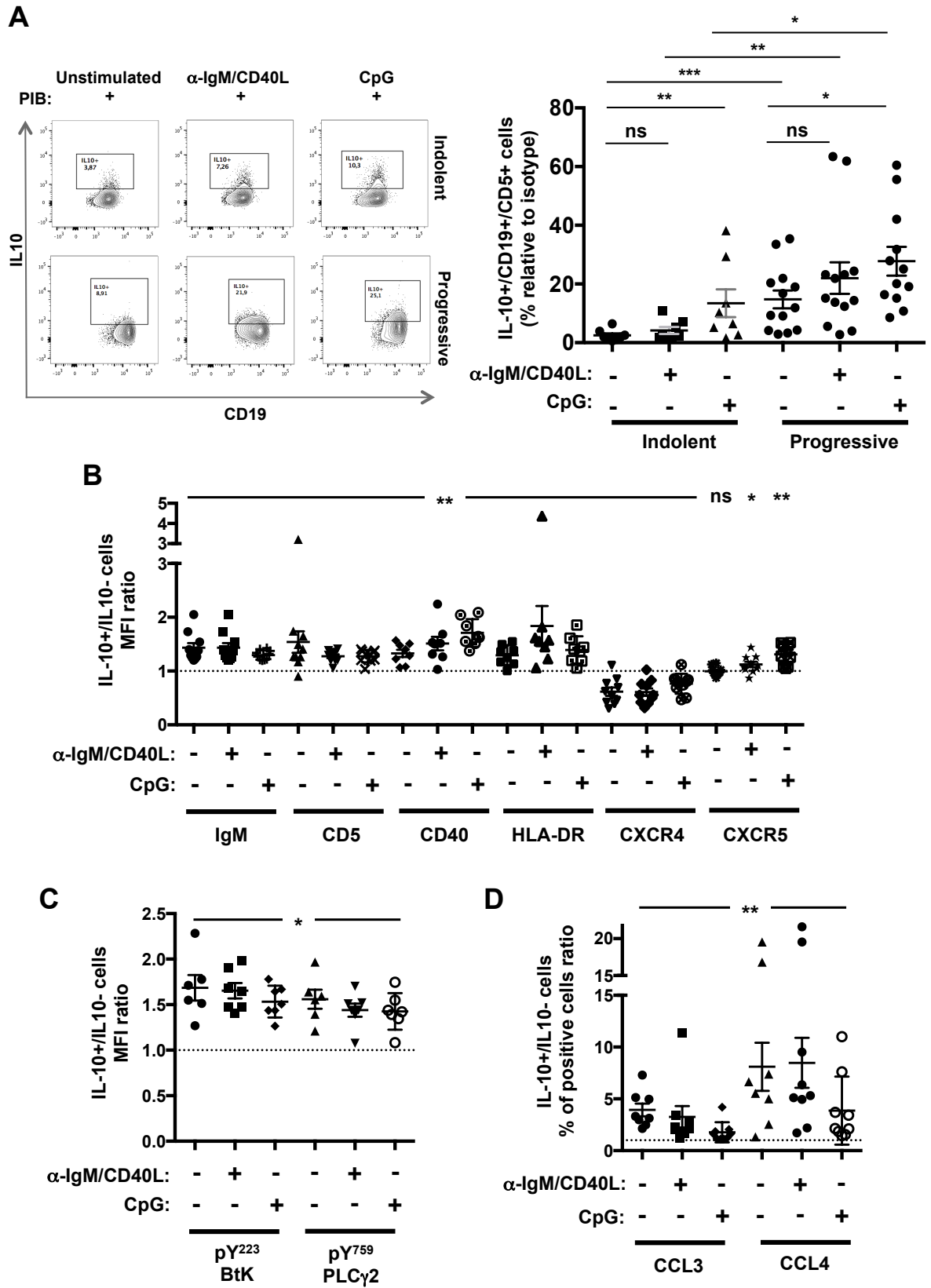
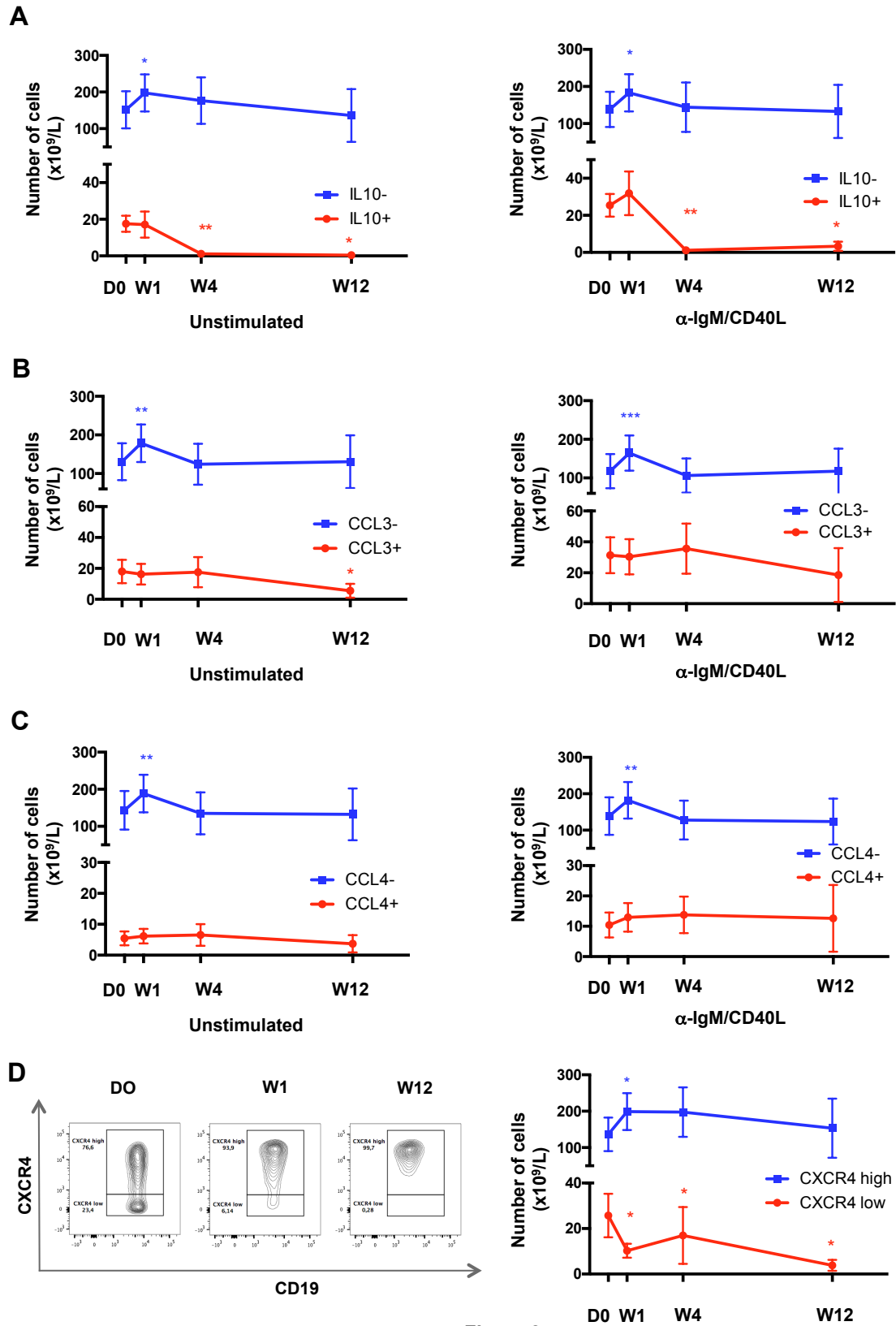


Figure 1



Supplementary information:

Material and Methods:

Patients:

Two different cohorts were used in this study. The first cohort consists of samples obtained from 10 CLL treatment-naive patients followed at the Avicenne Hospital. The second cohort is composed of 17 CLL patients treated with ibrutinib and followed at Avicenne Hospital or at Reims University Hospital. For the second group, samples were collected at visits prior to initiation of Ibrutinib treatment and after 1, 4 and 12 weeks. Samples from Reims University Hospital were kindly provided by the Tumorothèque of Champagne-Ardenne. CLL diagnosis was confirmed using international guidelines and the local ethic committee approved the study. The clinic-biological parameters were analyzed for each patient (Supplementary table S1).

Human cells isolation and cell culture:

B-lymphocytes were isolated from total blood using MACSxpress B cell isolation Kit (Miltenyi biotech) following the manufacturer's instructions. Isolated B cells purity was assessed by flow cytometry analysis and was typically superior to 95 %. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on density gradient and further analyzed either freshly or after viable thawing from liquid nitrogen storage in fetal bovine serum (FBS; Biosera) and 10 % DMSO (Sigma-Aldrich). Isolated cells were cultured in RPMI 1640 containing L-glutamine and supplemented with 100 U/mg/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies, USA), and 10 % FBS (lab) in 24-well plates (Nunc, Langensfeld, Germany) at the concentration of $2 \cdot 10^6$ /ml for 72 hours in humidified incubator containing 5 % CO₂ at 37°C. B cells were stimulated or not with a combination of soluble CD40L (1 µg/ml;

Miltenyi) and plate-bound anti-IgM (20 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) or with CpG (10 µg/ml; Miltenyi) alone. For cytokine detection by flow cytometry, Brefeldin A (BFA) (10 µg/ml; Sigma Aldrich), PMA (500 ng/ml; Sigma Aldrich) and Ionomycin (1 µg/ml; Sigma Aldrich) were added for the 4 last hours of culture.

Flow cytometry assays:

Membrane Staining

Expression of cell surface molecules was analyzed by flow cytometry, using the following mouse antibodies (mAbs) : anti-CD3/PerCP-Vio700, CD5/APC-Vio770, CD19/APC-Vio700 (Miltenyi), CXCR4/APC, CXCR5/BB515, CD40/PE, HLA-DR/BB515 (BD Biosciences), IgM/RPE (Dako) or relevant isotypic controls. Cell viability was systematically assessed with Fixable viability stain 510 (BD Biosciences). In brief, cells were labeled with Fixable viability stain for 10 minutes according to the manufacturer's protocol, and then washed and labeled in 1X phosphate-buffered saline (PBS) containing saturating concentrations of mAbs for 20 minutes, washed twice, and then analyzed immediately or further subjected to intracellular labeling.

Intracellular labelling

To assess the profile of IL10, CCL3 and CCL4 secreting CLL cells, the latter were labeled for extracellular staining and then fixed and permeabilized with the Inside stain Kit (Miltenyi) as recommended by the manufacturer. After washes, cells were stained with anti-IL10/APC (BD Biosciences) and CCL3/FITC and CCL4/PE (Miltenyi) or with their respective isotypes for 2 hours at 4°C.

To study the phosphorylation of pY²²³ BTK and pY⁷⁵⁹ PLCγ2, cells were labeled for extracellular staining and then fixed and permeabilized with the Inside stain Kit (Miltenyi) as recommended by the manufacturer. After washes, cells were stained with anti-pY²²³BTK

/BV421 and pY⁷⁵⁹PLC γ 2/PE (BD biosciences) or with their respective isotypes for 2 hours at 4°C.

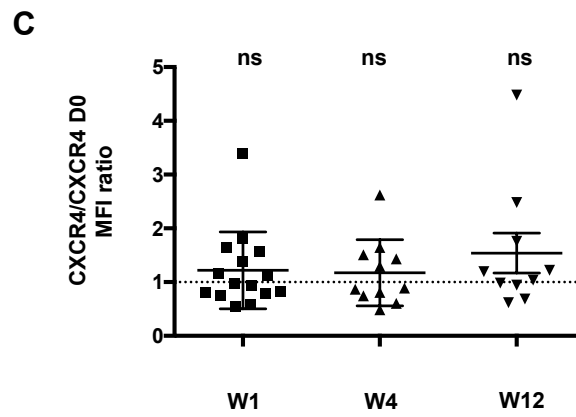
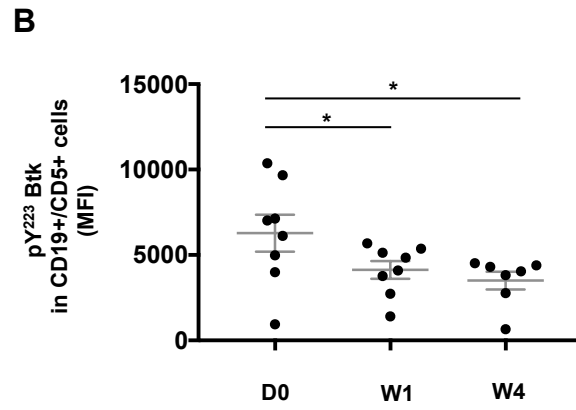
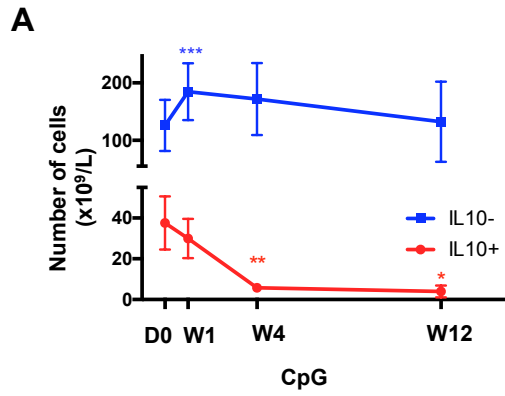
Flow cytometry analysis was performed using the FACS Canto II driven by DIVA software (Becton Dickinson) and analyzed with the FlowJo software. Both CST and rainbow beads analysis were performed before each experiment to ensure reproducibility.

Statistical analysis

All analysis were carried out using Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) with statistical significance defined as: * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; ***p-value < 0.001; ****p-value < 0.0001. Non parametric tests including Mann-Whitney U-test were used for two group independent comparisons. Statistical comparisons of paired samples were performed with Wilcoxon matched-pairs signed rank test because of nonparametric data distribution.

Supplementary table S1: Patients' characteristics

	Cohort 1	Cohort 2
	Previously untreated patients	Ibrutinib-treated patients
Number of patients	10	17
Age (years)	73.7 (52-85)	71.2 (44.4-98.5)
Sex M/F	3/7	12/5
Progressive disease	2/10	17/17
Previous lines of treatment	0	1 (0-3)
- FCR		7/17
- BR		7/17
Unmutated IgHV	5/10	9/13
17p deletion and/or TP53 mutation	0/10	8/17
11q deletion	0/10	5/16
Complex karyotype	0/10	3/16



Supplementary Figure S1

Résultats complémentaires

Objectifs

Notre analyse des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de la sous-population IL10⁺ indique que ces cellules ont des caractéristiques communes à celles de la fraction proliférative décrite dans la LLC. De plus, un traitement des patients par ibrutinib entraîne la diminution rapide de la sous-population IL10⁺ qui est parallèle à la disparition de la sous-population CXCR4^{low}, un marqueur de la fraction proliférative. L'effondrement du nombre absolu de cellules IL10⁺ dès le premier mois de traitement ibrutinib et la quantité limitée de matériel cellulaire obtenu chez ces patients ne nous ont malheureusement pas permis d'analyser les cinétiques d'expression des marqueurs de surface de la population IL10⁺, qui la définissent comme des cellules de la fraction proliférative chez patients indolents. Néanmoins, l'étude de l'expression de ces marqueurs a été effectuée sur la population CD5⁺ CD19⁺ globale.

Matériel et méthodes

A partir des échantillons issus de 17 patients traités par ibrutinib, nous avons étudié par cytométrie de flux l'expression membranaire de récepteurs impliqués dans la signalisation du BCR (IgM de surface), dans le homing et la migration cellulaire (CXCR5, CCR7), et dans l'interaction entre les lymphocytes B et les lymphocytes T (CD40, HLA DR). Le protocole expérimental de cytométrie en flux utilisé est décrit dans le manuscrit 2.

Résultats

S'il n'existe pas de modification significative de l'expression du CD5 et que l'expression de l'IgM ne semble pas modifiée de façon constante dans le temps, nos résultats indiquent l'existence d'une diminution significative de l'expression à la fois du CXCR5, d'HLA-DR et du CD40 à la membrane des lymphocytes B CD5⁺ CD19⁺ en cours de traitement par ibrutinib.

Conclusion

Ces résultats complémentaires suggèrent que sous ibrutinib, les lymphocytes B de LLC ont une moins bonne capacité d'interaction avec le microenvironnement, d'une part du fait d'une diminution de l'expression de récepteurs impliqués dans le homing et la migration, comme le CXCR5 et le CCR7, et d'autre part par la baisse de l'expression de molécules impliquées dans le dialogue lymphocyte B-lymphocytes T. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'ibrutinib, en modifiant les interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement, réduit l'action immunosuppressive des cellules B de LLC.

Figure

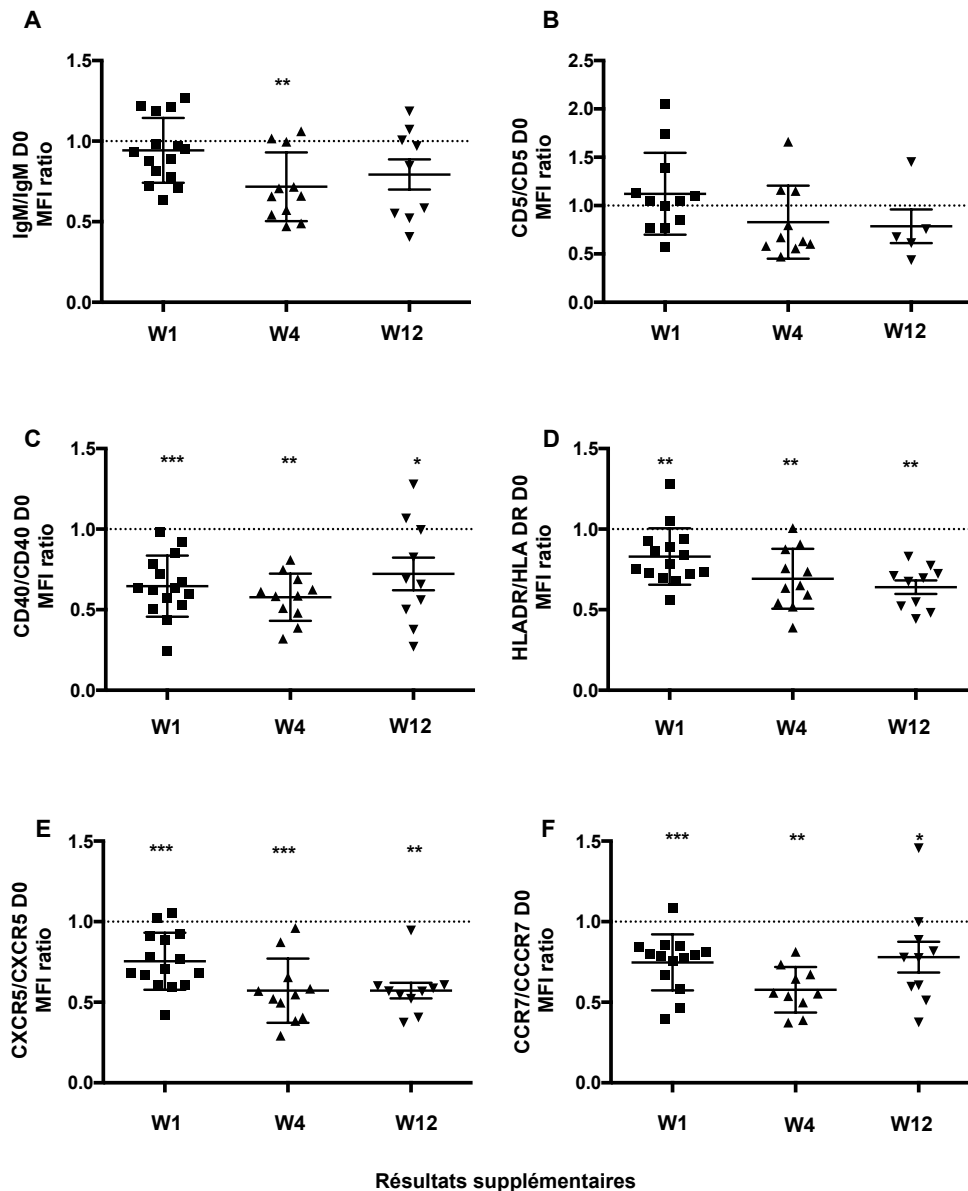


Figure 19. Cinétiques d'expression membranaire de molécules impliquées dans la migration et l'interaction B-T dans les cellules tumorales de patients LLC avant et en cours de traitement ibrutinib.

Représentation graphique des cinétiques d'expression membranaire de l'IgM (A), du CD5 (B), CD40 (C), HLA-DR (D), CXCR5 (E) et CCR7 (F) dans des cellules CD19⁺ CD5⁺ CD3⁻ chez des patients prélevés juste avant, et après 1 (W1), 4 (W4) et 12 (W12) semaines de traitement Ibrutinib. Les résultats obtenus en cytométrie de flux sont exprimés après normalisation des MFIs des différents marqueurs aux différents temps avec les MFIs des marqueurs respectifs avant traitement (ratio MFI/MFI D0).

Discussion et perspectives

1. Caractérisation des sous-populations B régulatrices dans la LLC

L'existence d'un déficit de l'immunité à la fois anti-infectieuse et anti-tumorale (106, 199), ainsi que l'expression de marqueurs phénotypiques communs à certaines populations B régulatrices décrites dans différents modèles murins (200, 201), nous ont conduit à étudier les capacités immuno-régulatrices des lymphocytes B de LLC. Chez l'homme, la première population B régulatrice, exprimant un phénotype $CD5^+ CD19^+ CD24^{hi} CD27^+$ et capable de réguler négativement la production cytokinique des monocytes, a été caractérisée en 2011. De façon parallèle aux données issues des modèles murins, les auteurs ont distingué deux types de cellules capables de sécréter de l'IL10. Les premières, appelées B10, sont retrouvées en très faible quantité dans le sang (moins de 1%) et produisent de l'IL10 en réponse à 5 heures de stimulation *ex-vivo* associant un traitement avec du PMA, de l'ionomycine et de la brefeldine A (association dénommée PIB). Les secondes, appelées B10pro (pour progéniteurs), ont comme principale caractéristique de produire de l'IL10 en réponse à 48 heures de stimulation *in vitro* par différentes molécules (LPS, CPG, CD40L) suivie d'un traitement avec du PIB pendant les 5 dernières heures. Après 48 heures de co-stimulation par du CpG et du CD40L, la population B10pro représente environ 5% des lymphocytes sanguins chez les sujets sains (26). La capacité à produire de l'IL10 par des populations lymphocytaires B a également été rapportée dans d'autres types cellulaires, tels des lymphocytes B immatures $CD19^+ CD24^{hi} CD27^{hi}$ et des lymphocytes B $CD38^+ CD1d^+ IgM^+ CD147^+$, et l'implication de ces populations Breg a été démontrée dans différentes pathologies associées à un dysfonctionnement immunitaire telles les pathologies auto-immunes dont le lupus érythémateux disséminé, les tumeurs solides et les infections virales chroniques notamment par le VIH (30-34). Cette compétence à sécréter de l'IL10 a aussi été décrite dans des populations lymphocytaires B plus matures, tels les plasmablastes ou les cellules br1, n'exprimant pas de marqueurs phénotypiques connus de la LLC (35, 36). L'ensemble de ces résultats confirme l'existence de nombreuses populations lymphocytaires B qui sont capables d'acquérir la capacité de produire de l'IL10 en réponse à une stimulation appropriée. En revanche, cette capacité à sécréter de l'IL10 ne représente pas le seul

mécanisme d'action des lymphocytes B régulateurs. En effet, une population Breg a été fonctionnellement caractérisée par sa capacité à sécréter en plus de l'IL10, du TGF β et une molécule immunorégulatrice, l'IDO. Fonctionnellement, cette sécrétion est responsable d'une inhibition de la prolifération des lymphocytes T et de la différenciation Th1, ainsi que d'une induction de la différenciation Treg. L'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre le TGF β et l'IL10 dans un système de co-culture de lymphocytes B et lymphocytes T a permis de mettre en évidence l'existence d'une régulation différentielle mais complémentaire entre l'IL10 et le TGF β ; le blocage de l'IL10 avait un effet important sur la sécrétion de l'IFN γ alors que le blocage du TGF β conduisait à la perte de l'inhibition de la prolifération lymphocytaire T. Cette étude a également démontré l'importance des contacts cellulaires entre lymphocytes B et T dans le processus d'induction des Breg. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA4 inhibant l'interaction entre le CTLA4 exprimé par les lymphocytes T et les CD80 et CD86 exprimés par les lymphocytes B entraînait une diminution de la sécrétion d'IDO par les lymphocytes B (38). L'ensemble de ces résultats confirme la multiplicité des mécanismes impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire lymphocytaire T par les lymphocytes B.

Le premier objectif de ce travail a été d'évaluer la capacité de sécrétion par les lymphocytes B de LLC des cytokines immunomodulatrices comme l'IL10 et le TGF β 1. Dans le modèle de la LLC, deux équipes ont rapporté l'existence d'une capacité de sécrétion d'IL10 en réponse à une stimulation avec du CPG, associé ou non à du CD40L. Ces données suggèrent un rôle important de la signalisation déclenchée par l'activation des TLR, et notamment celle du TLR9, mais également de la coopération lymphocytaire B-T, aboutissant à la sécrétion d'IL10 par les cellules B de LLC (102, 103). Par ailleurs, une stimulation *in vitro* avec le facteur BAFF induit également la production d'IL10 par les cellules de la LLC (104). Des travaux antérieurs publiés par le laboratoire ont montré un lien entre la capacité de survie induite par une stimulation antigénique *in vitro* et la progression de la maladie, mettant en exergue le rôle du BCR dans la progression de la maladie (67). Le dialogue lymphocytaire T-B est également essentiel dans la physiopathogénie de la LLC, et les interactions bi-directionnelles entre les lymphocytes B et T entraînent à la fois une activation des lymphocytes tumoraux et un profond déficit lymphocytaire T. Ainsi, de manière similaire à la stimulation antigénique, la

capacité de réponse en termes de survie cellulaire après à une stimulation *in vitro* avec du CD40 a été mise en évidence (92, 93). Sur la base de ces données, nous avons étudié l'impact de la stimulation du BCR et de l'interaction lymphocytaire B-T, mimée par le CD40L, sur la capacité des cellules B de LLC à sécréter les deux cytokines immunomodulatrices que sont l'IL10 et le TGF β 1. Nos résultats démontrent l'existence d'une capacité basale des lymphocytes B de LLC à sécréter à la fois de l'IL10 et du TGF β 1. Si la stimulation par l'anti-IgM immobilisé et le CD40L soluble ne modifie pas la capacité de production de l'IL10, cette co-stimulation augmente celle du TGF β 1, suggérant un mécanisme de régulation différentielle (manuscrit 1, figure 1A). Cette absence d'induction de la sécrétion d'IL10 après co-stimulation avec un anticorps anti-IgM immobilisé et du CD40L a été retrouvée sur une deuxième cohorte indépendante, à la fois chez des patients stables et des patients progressifs (manuscrit 2, figure 1 A). Ce résultat ne remet pas en cause l'implication du BCR dans la production d'IL10 par les cellules tumorales. En effet, de nombreux auteurs s'accordent à écrire que la capacité sécrétoire des lymphocytes B est acquise grâce à des signaux reçus *in vivo*. En revanche, les B10pro n'auraient pas acquis toutes les compétences requises à la sécrétion d'IL10 qui ne serait détectable en cytométrie de flux qu'après une stimulation additionnelle. Au niveau moléculaire, si le locus du gène codant pour l'IL10 est possiblement accessible à la transcription dès le stade B10pro, des facteurs additionnels nécessiteraient d'être activés pour une transcription efficace du gène. Ainsi, le terme B10pro n'est pas lié à un stade de maturation des lymphocytes B mais est associé à un stade d'activation cellulaire (200). De nombreuses données issues de modèles murins démontrent le rôle du BCR dans l'acquisition de la compétence à la sécrétion de l'IL10 par les lymphocytes B. Tout d'abord, dans différents modèles d'inflammation, les cellules B10 murines soumises à une stimulation antigénique montrent une efficacité d'immunomodulation supérieure à celle des B10 de souris naïves pour l'antigène dans des expériences de transferts adoptifs (202-204). Ces résultats suggèrent donc un rôle de la stimulation antigénique dans l'acquisition de la capacité à sécréter de l'IL10. De plus, les souris déficientes en CD19 ou invalidées pour BLNK n'ont que très peu de B10 et développent des maladies auto-immunes (204, 205). L'étude du répertoire du BCR des cellules B10 issues de la cavité péritonéale de souris révèle l'utilisation d'un répertoire VDJ varié, poly-réactif, ainsi que l'absence d'hypermutation somatique dans la majorité des cellules (206). D'autre part, il a été montré dans un modèle transgénique que les souris dont

les lymphocytes B exprimant un BCR mono-réactif sont capables d'induire une quantité inférieure de B10 après stimulation (207).

En accord avec les travaux publiés (102, 103), nous avons démontré la capacité des lymphocytes tumoraux à produire de l'IL10 après stimulation du TLR9 par le CPG pendant 72 heures (102, 103) (manuscrit 2, figure 1A). Dans ces deux études, la question d'une éventuelle corrélation entre la capacité à produire de l'IL10 des cellules B et les différents facteurs pronostiques de la LLC a été posée. Cependant, les résultats divergent. Dans la première étude, la production d'IL10 en réponse à une co-stimulation CPG/CD40L de 48 heures est similaire dans les cellules des patients et ce, quel que soit leur statut mutationnel des IgHV. De plus, cette capacité de sécrétion n'est corrélée à aucun facteur pronostique cytogénétique tel qu'une délétion 11q ou 17p (103). Dans la deuxième étude, l'induction de la production d'IL10 est supérieure dans les cellules des patients dotés d'un statut IgHV muté par rapport aux patients dont le statut IgHV est non muté (102). En revanche, notre analyse qui met en jeu un protocole de stimulation différent des lymphocytes tumoraux en culture ne révèle aucune différence significative entre les cellules de patients avec LLC-M ou LLC-NM en termes de capacité de sécrétion d'IL10 après 72 heures de culture en l'absence ou présence d'une co-stimulation anti-IgM/CD40L. Ces résultats apparemment contradictoires suggèrent l'existence de plusieurs mécanismes d'induction de l'IL10 par les cellules tumorales, d'autant plus que la capacité à sécréter de l'IL10 peut également être induite par d'autres mécanismes et notamment après une stimulation des cellules B de LLC par le facteur BAFF (104). Néanmoins, les caractéristiques du BCR des B10 décrites dans les différents modèles murins, à savoir poly-réactif, répondant à des auto-antigènes et ayant un répertoire IgHV principalement non muté, se rapprochent d'avantage des caractéristiques du BCR des LLC-NM que de celui des LLC-M.

En plus de la sécrétion de cytokines immunomodulatrices par les lymphocytes B, nous avons émis l'hypothèse d'une expression de FOXP3 par les cellules tumorales ; FOXP3 étant considéré comme le principal facteur de transcription des lymphocytes T régulateurs. L'existence d'une population Breg humaine exprimant FOXP3 a déjà été suggérée par plusieurs équipes dans différentes pathologies auto-immunes telles que la sclérose en plaque, la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux diffus. Cette expression a

parfois été corrélée au stade évolutif de la maladie (208-211). L'existence de ces populations lymphocytaires B est parfois remise en cause par certaines équipes, qui considèrent que l'expression de FOXP3 par les lymphocytes B serait liée au caractère apoptotique des cellules et non à la présence d'une population lymphocytaire B régulatrice (212). Une des principales données de notre étude est la mise en évidence d'une expression de FOXP3 dans la population lymphocytaire B tumorale définie par les marqueurs CD5 et CD19. Le niveau d'expression, mesuré par cytométrie de flux, est variable entre les différents échantillons après 3 jours de culture. Pour écarter toute contamination avec des cellules T résiduelles lors de la première purification, une seconde étape de purification par un tri cellulaire des cellules CD19⁺ CD5⁺ CD27⁺ CD3⁻ a été effectuée. Un western blot avec ces cellules lysées et hybridé avec un anticorps dirigé contre un épitope différent de celui utilisé en cytométrie de flux, a bien confirmé la présence de FOXP3 dans les cellules B de LLC. Il est important de préciser qu'au cours de cette étude un marqueur de viabilité a été systématiquement intégré aux panels d'anticorps couplés afin d'éliminer toutes les cellules apoptotiques. Par ailleurs, l'expression de FOXP3 a également été rapportée dans des tumeurs solides murines, ainsi que dans des lignées cellulaires issues de tumeurs solides humaines. En revanche, le rôle de ce facteur de transcription, ainsi que son impact sur la progression tumorale, reste incertain à ce jour (208).

Après la détermination du profil cytokinique des cellules B de LLC, l'objectif suivant a consisté à caractériser fonctionnellement leurs capacités régulatrices. Pour ce faire, des expériences de co-cultures ont été réalisées et la capacité des cellules leucémiques à remodeler la population lymphocytaire T CD4⁺ a été mesurée. Nos résultats *in vitro*, à partir d'une population lymphocytaire B totale, démontrent une capacité des lymphocytes tumoraux à induire une différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs, ainsi qu'à inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et leur sécrétion de cytokines impliquées dans la différenciation Th1 (TNF α et IFN γ) (manuscrit 1, figure 5). Il est néanmoins important de relever que la capacité de division des lymphocytes T est altérée. En effet, le pourcentage de lymphocytes T ayant proliféré après stimulation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 immobilisés, même en l'absence de lymphocytes B, est faible, en comparaison avec les résultats habituellement obtenus dans des expériences

d'inhibition de la prolifération lymphocytaire T (38, 213). Ce constat est un argument fort en faveur de l'existence d'une inhibition de la prolifération lymphocytaire T par les cellules tumorales *in vivo*. En effet, une diminution de la capacité de prolifération des lymphocytes T *in vitro* a déjà été rapportée dans la LLC, mais ciblait la fraction T CD8⁺ (97). Même si la stimulation des lymphocytes T CD4⁺ n'induit que faiblement la production d'IFN γ , nos résultats montrent une inhibition de cette sécrétion qui est dépendante du nombre de lymphocytes B tumoraux (manuscrit 1, figure 5). L'expression de marqueurs phénotypiques d'épuisement, tels que le PD-1 ou le CTLA4, par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans la LLC expliquerait ce déficit d'activation *in vitro* (96, 97). Pour s'affranchir de ce dysfonctionnement lymphocytaire T préexistant et démontrer *in vitro* les propriétés immunorégulatrices des lymphocytes B tumoraux, il aurait été intéressant de co-cultiver les cellules B tumorales avec des lymphocytes T hétérologues issus de donneurs sains ; approche déjà utilisée pour démontrer la capacité des lymphocytes B de LLC à former des synapses immunologiques. En effet, un déficit de synapse immunologique a tout d'abord été mis en évidence entre les lymphocytes B tumoraux et les lymphocytes T issus du même patient. Mais, dans ce modèle, la co-culture de lymphocytes T hétérologues issus de donneurs sains avec des lymphocytes B tumoraux a également conduit à un défaut de polarisation de l'actine dans les lymphocytes T sains et à une anomalie de la formation d'une synapse immunologique fonctionnelle. Cette approche a donc validé la capacité des lymphocytes B de LLC à induire une dysfonction des lymphocytes T (100).

Pour montrer la pertinence clinique des lymphocytes tumoraux en tant que cellules immuno-régulatrices, nous avons établi des liens entre leurs propriétés immunomodulatrices et la progression de la maladie. Une analyse comparative de marqueurs extracellulaires et intracellulaires entre les lymphocytes B IL10⁺ et sa contrepartie, les lymphocytes B IL10⁻, au sein de chaque patient LLC, révèle que les cellules IL10⁺ ont des caractéristiques communes à celles des cellules appartenant à la fraction proliférative de la LLC (manuscrit 2, figure 1 B à D). Différentes études définissent la fraction proliférative comme des lymphocytes B récemment émigrés des ganglions lymphatiques. Cette fraction exprime de façon significativement plus importante des gènes impliqués dans la signalisation du BCR et est caractérisée par une forte expression membranaire du CD5 et une faible

expression en surface du CXCR4 (population dénommée CD5^{hi} CXCR4^{lo}) (74, 214, 215). Plus récemment, cette fraction a été décrite pour son expression supérieure du HLA-DR, CD80 et CD86 (216). Nos résultats mettent en évidence une expression plus élevée du CD5 et plus faible du CXCR4 dans la population IL10⁺, et ce quelles que soient les conditions de culture utilisées (sans stimulation, avec stimulation anti-IgM/CD40L ou CpG). Les cellules l'IL10⁺ expriment également des taux d'IgM, de CD40 et d'HLA-DR plus élevés à leur membrane, autant de caractéristiques communes à la fraction proliférative décrite dans la LLC. Parallèlement, quelques cytoponctions ganglionnaires de patients évolutifs ont pu être réalisées, et leur analyse montre également la présence d'une population IL10⁺ ganglionnaire (manuscrit 1, figure1A). Il serait intéressant de vérifier les niveaux d'expression des autres récepteurs (IgM, CD40, HLA-DR) sur de nouvelles cytoponctions pour enrichir le modèle des cellules de la fraction proliférative. Par ailleurs, une analyse de la signalisation intracellulaire par une mesure de l'activation de et PLCγ2 révèle un taux de phosphorylation supérieure des résidus tyrosine 223 de Btk et 759 de PLCγ2 dans les cellules IL10⁺ par rapport aux cellules négatives pour l'interleukine. Ceci témoigne d'une activation intracellulaire plus forte de la population l'IL10⁺.

Contrairement à la mise en évidence d'une capacité de sécrétion supérieure d'IL10 des cellules de LLC chez les patients dotés d'un statut IGHV muté après co-stimulation avec du CpG et CD40L, notre modèle propose que la capacité des cellules tumorales à sécréter de l'IL10 joue un rôle dans la progression de la maladie. A ce jour, une dérégulation de la balance Treg/Th17, une expansion des cellules Treg et une inhibition des Th17 ont été retrouvées dans la LLC et associées à la progression de la maladie (217). En revanche, l'existence d'un biais de polarisation Th1-Th2 demeure incertaine. Seule une étude a suggéré l'apparition d'un biais Th2 au cours de l'évolution de la maladie (218). Les résultats de ces différentes études impliquent donc un lien entre l'intensité de l'immunomodulation et la progression de la maladie. Dans ce contexte, nous avons mené une analyse comparative de la capacité de sécrétion de l'IL10 entre deux populations de patients : une cohorte de patients stables, non traités et suivis en consultation et, une cohorte de patients évolutifs, d'ores et déjà traités pour la majorité d'entre eux et avant l'initiation d'une thérapie par ibrutinib. Nous avons démontré que la capacité de sécrétion de l'IL10 est significativement

supérieure chez les patients progressifs, et ce quelles que soient les conditions de culture testées (manuscrit 2, figure 1 A).

Si dans notre modèle, la sécrétion d'IL10 est associée à la progression de la LLC, l'immunomodulation induite par les lymphocytes B tumoraux est très probablement multifactorielle en impliquant non seulement la sécrétion d'autres cytokines, telle que le TGF β 1, mais aussi de potentiels contacts intercellulaires. En effet, la sécrétion de microparticules par les cellules tumorales joue également un rôle important dans le remodelage du microenvironnement, et notamment de la population lymphocytaire T (219). Même si le rôle de FOXP3 dans l'immunomodulation engendrée par les lymphocytes B de LLC reste à définir, l'association du niveau d'expression de ce facteur de transcription à ceux de l'IL10 et du TGF β 1 dans un score polyfonctionnel a permis de distinguer deux catégories de patients. Les patients avec un score polyfonctionnel bas (*ie*, faible sécrétion d'IL10, de TGF β 1 et faible expression de FOXP3) ont un faible de progression alors les patients présentant un score élevé présentent un risque de progression plus important.

2. Impact de l'ibrutinib sur les sous-populations lymphocytaires B

Au regard du rôle important des capacités immuno-régulatrices des lymphocytes B de LLC dans la progression de la maladie, l'objectif suivant de notre étude a consisté à définir l'impact du traitement par l'ibrutinib, inhibiteur de tk dont l'utilisation a été associée à des bénéfices sur la survie globale des patients, notamment en rechute. Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'évolution de la sous-population lymphocytaire capable de sécréter de l'IL10 chez des patients traités avec de l'ibrutinib. Au cours de cette étude, nous avons recueilli des échantillons issus de 17 patients traités à Avicenne et à Reims et prélevés avant l'initiation du traitement par ibrutinib, et après 1, 4 et 12 semaines de traitement. Cette cohorte est constituée de patients évolutifs, en rechute pour la majorité d'entre eux (N=13) ou naïfs de traitement antérieur et traités en première ligne par ibrutinib du fait d'une anomalie de TP53 (délétion 17p ou mutation TP53) identifiée dans les cellules leucémiques (N=4).

Pour l'analyse de la capacité de sécrétion de l'IL10, nous avons choisi de cultiver les lymphocytes B de LLC en l'absence de stimulation ou en présence d'une co-stimulation avec un anti-IgM/CD40L ou d'une simple stimulation avec du CpG. Nos résultats montrent une inhibition rapide de la capacité des lymphocytes B de LLC à sécréter de l'IL10, et ce quelles que soient les conditions de stimulation ; le pourcentage des cellules IL10⁺ étant en baisse dès la première semaine de traitement. La baisse observée du pourcentage de ces cellules au cours d'un traitement avec de l'ibrutinib est similaire à celle de deux travaux précédemment publiés et qui utilisent une co-stimulation CPG/CD40L (193, 194). Pour lier ce résultat à la chaise ganglionnaire consécutive à un traitement avec de l'ibrutinib, nous avons rapporté le nombre de cellules capables de produire ou non de l'IL10 à la lymphocytose totale (manuscrit 2, figure 2 A et supplementary 1 A). Dans toutes les conditions de culture, les cinétiques de suivi des deux sous-populations, positive et négative pour l'IL10, diffèrent. En effet, il existe une nette diminution du nombre de cellules IL10⁺ dès le premier mois de traitement, alors que le nombre de cellules IL10⁻ n'est pas significativement modifié, démontrant ainsi une régulation différentielle de ces sous-population au cours du traitement sous ibrutinib des patients LLC. D'un point de vue moléculaire, l'implication de STAT3 dans la capacité des lymphocytes B de LLC à sécréter de l'IL10 a été démontrée. Une première étude a mis en évidence un site de fixation de STAT3 sur une région à méthylation variable du locus de l'IL10, suggérant une possible régulation épigénétique du locus de l'IL10 dépendante de STAT3. Dans ce modèle, l'inhibition de l'activation de STAT3 qui passe par l'activation de Syk provoque une diminution de la production d'IL10 (102). De plus, l'utilisation *in vitro* d'un inhibiteur spécifique de la forme phosphorylée sur le résidu sérine 723 de STAT3 conduit à une diminution de la sécrétion d'IL10. Plusieurs études évoquent une induction de la phosphorylation de STAT3 en réponse à une stimulation du BCR ou du CD40, qui est inhibée en présence d'ibrutinib *in vitro*. De même, une diminution de la pS⁷²³STAT3 a été constatée dans des cellules de patients en cours de traitement par ibrutinib et corrélée à une diminution de la capacité de sécrétion de l'IL10 (194).

Du fait d'une quantité limitée de matériel cellulaire et de la diminution majeure de la fraction IL10⁺ chez des patients au cours du traitement par ibrutinib, nous avons été dans l'incapacité de comparer l'évolution des marqueurs de surface de la population IL10⁺ qui

avaient des caractéristiques communes avec la fraction proliférative. Pour contourner cet obstacle et être au plus près de cette fraction, nous avons analysé l'évolution de l'expression du CXCR4 et du CD5 sur les cellules B de LLC des patients traités. Malgré l'absence de modification significative de l'expression du CD5 sous ibrutinib (résultats supplémentaires, B), nos résultats démontrent une modulation de l'expression membranaire du CXCR4 en cours de traitement *in vivo* avec l'inhibiteur de Btk. Si plusieurs équipes démontrent une nette diminution des capacités de migration des cellules tumorales en réponse à la chimiokine CXCL12 chez les patients sous ibrutinib (182, 184, 185), l'évolution de l'expression de son récepteur membranaire, le CXCR4, est très controversée chez les patients traités. En effet, si deux équipes décrivent l'absence de modification significative de l'expression membranaire du CXCR4 sous ibrutinib (184, 186), une autre équipe rapporte une diminution du CXCR4 à la surface des cellules causée par un défaut de recyclage à la membrane dans un modèle murin de LLC agressive (220). Dans notre étude sur la population tumorale CD5⁺ CD19⁺, aucune modification significative du niveau global de l'expression membranaire du CXCR4 n'a été observée chez les patients en cours de traitement. En revanche, l'expression de ce récepteur permet de distinguer deux sous-populations, une de forte intensité (CXCR4^{hi}) et l'autre de faible intensité (CXCR4^{lo}); cette dernière étant retrouvée de façon constante bien qu'hétérogène chez les patients progressifs avant l'initiation du traitement par ibrutinib. Un suivi de ces deux populations démontre que la sous-population CXCR4^{lo} diminue précocement chez les patients sous ibrutinib, alors que la population CXCR4^{hi} n'est pas significativement modifiée (manuscrit 2, figure 2D). Cette sous-population CXCR4^{lo} qui a une des caractéristiques majeures de la fraction proliférative de la LLC correspondrait donc à des cellules tumorales récemment sorties du compartiment ganglionnaire. Sa diminution rapide s'expliquerait par une incapacité des cellules tumorales à ré-entrer dans les ganglions lymphatiques. Elle représenterait également une augmentation du processus d'apoptose causée par la privation de signaux de survie habituellement prodigués par le microenvironnement tumoral. Malgré l'impossibilité de comparer l'évolution de l'expression de CXCR4 dans les deux sous-populations IL10⁺ et IL10⁻, la diminution concomitante des fractions CXCR4^{lo} et IL10⁺ sous ibrutinib suggère un mécanisme de régulation commun de ces deux marqueurs.

Enfin, l'étude des taux d'expression du CD40 et du HLA-DR sous ibrutinib montre une diminution de ces deux récepteurs membranaires dans les cellules des patients en cours du

traitement ibrutinib (résultats supplémentaires C et D). Ces données suggèrent une diminution de la capacité des lymphocytes tumoraux à interagir avec les lymphocytes T. De manière intéressante, une diminution des interactions entre les NLC et les cellules B de LLC a également été rapportée sous ibrutinib par l'analyse du nombre de contacts entre les lymphocytes B et les NLC sur des biopsies ostéo-médullaires réalisées avant et en cours de traitement par ibrutinib (190).

L'inhibition de la capacité des cellules tumorales à sécréter de l'IL10, ainsi que la diminution de leur capacité à interagir avec le microenvironnement, soulèvent la question de l'évolution du répertoire lymphocytaire T sous ibrutinib. Dans ce contexte, cette question est d'autant plus intéressante qu'il existe très probablement une action directe de l'ibrutinib sur les lymphocytes T en inhibant ITK. L'existence d'un biais Th1 sous ibrutinib, suggérée dans des modèles murins, n'a toutefois pas été confirmée chez l'homme (193, 194). Cette inhibition d'ITK par l'ibrutinib a néanmoins conduit à proposer l'ibrutinib dans d'autres pathologies telles que la maladie du greffon contre l'hôte, une pathologie complexe impliquant à la fois les lymphocytes B et les lymphocytes T. Suite à un essai prospectif publié récemment, l'ibrutinib vient d'être autorisé aux Etats-Unis pour le traitement de cette maladie du greffon contre l'hôte après un échec d'une première ligne de traitement (221). A cause des effets secondaires liés à l'inhibition d'autres kinases de la famille Tec par l'ibrutinib, de nouveaux inhibiteurs plus spécifiques de Btk, comme l'acalabrutinib, ont été développés. L'importance relative de l'inhibition des 2 kinases, Btk et ITK, a été mesurée par une comparaison du phénotype lymphocytaire T et des capacités immunosuppressives des lymphocytes B issus de patients atteints de LLC traités par ibrutinib ou acalabrutinib. L'inhibition de la capacité de sécrétion de l'IL10 par les lymphocytes B est identique chez les patients des deux cohortes, de même que la réduction de l'expression membranaire de marqueurs d'épuisements lymphocytaires tels que PD1 et CTLA4 par les lymphocytes T. Ces données suggèrent un mécanisme de régulation dépendant de Btk. En revanche, l'évolution du répertoire lymphocytaire T diffère entre les patients traités par ibrutinib et acalabrutinib, indiquant l'implication d'ITK chez les patients traités par ibrutinib (193). Enfin, l'amélioration de la fonctionnalité des CAR T cells (Chimeric Antigen Receptor) anti-CD19 développés à partir de lymphocytes T de patients ayant reçu un traitement par ibrutinib est une autre

preuve de la capacité de l'ibrutinib à lever l'immunomodulation induite par les lymphocytes B sur les lymphocytes T (222-224).

Si l'immunomodulation induite par les lymphocytes B dans la LLC est un phénomène complexe, notre travail démontre que les lymphocytes B de LLC ont des propriétés immunosuppressives, notamment par la production de cytokines et de facteurs de croissance comme l'IL10 et le TGF β 1. Comme cela a été suggéré dans d'autres modèles, l'expression du facteur de transcription FOXP3 par les cellules tumorales participerait à ce mécanisme. En revanche, la fonction de FOXP3 dans les lymphocytes B de LLC est loin d'être élucidée. Dans notre étude, la capacité de production de l'IL10 par les cellules tumorales a été liée à la fraction proliférative de la LLC et à l'évolutivité de la maladie. L'ibrutinib inhibe rapidement cette capacité de sécrétion. L'ensemble de nos résultats sur la LLC, associé à ceux montrant une diminution des marqueurs d'épuisement lymphocytaire sur les lymphocytes T en cours de traitement par ibrutinib et à l'utilisation de cet inhibiteur dans d'autres pathologies telles la maladie du greffon contre l'hôte, indiquent que l'ibrutinib peut être considéré comme un traitement immunomodulateur.

Annexes

Au cours de mes 4 années de thèse, j'ai également contribué à des travaux complémentaires qui ont donné lieu à des manuscrits qui s'inscrivent dans des contextes de recherche fondamentale et clinique.

Une des autres thématiques du laboratoire consiste à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui participent à la pathogénicité d'un autre syndrome lymphoprolifératif B CD5⁺, le lymphome à cellules du manteau. Dans le lymphome à cellules du manteau, comme dans la LLC, la signalisation du BCR joue un rôle primordial dans la survie des cellules tumorales. Dans certains cas de lymphomes à cellules du manteau, la voie WNT / β -caténine est activée et contribue à l'expression de la cycline D1 et de myc. Nos travaux démontrent que la stimulation du BCR induit une augmentation de la concentration de la β -caténine, qui est inhibée par un pré-traitement par l'ibrutinib *in vitro*. Après stimulation du BCR, la β -caténine transloque dans le noyau et participe à la régulation de gènes transcrits après activation de la voie NF- κ B tels l'IL6, l'IL8 et l'IL1b. Enfin, l'inhibition de l'interaction entre NF- κ B et la β -caténine induit l'apoptose de cellules primaires de lymphomes à cellules du manteau. Mon travail consisté à analyser l'évolution de la sécrétion de l'IL6 par cytométrie de flux après stimulation antigénique et incubation avec un agent favorisant la dégradation de la β -caténine. Il a contribué à la rédaction d'un manuscrit actuellement soumis et intitulé « cross-talk between B-cell receptor signaling and WNT / β -catenin pathway in mantle cell lymphoma ».

Mon travail de recherche clinique est également dirigé sur la LLC et comporte tout particulièrement deux axes de recherche qui sont les cytopénies auto-immunes associées à la LLC et les traitements par inhibiteurs de kinases dans la LLC. Les cytopénies auto-immunes, telles l'anémie hémolytique auto-immune, la thrombopénie périphérique auto-immune et l'érythroblastopénie sont des complications fréquentes au cours de la LLC. Elles induisent des cytopénies qui ne sont pas liées à un envahissement médullaire et doivent faire l'objet d'une prise en charge spécifique. Sous la direction du Professeur Cymbalista, puis avec l'ensemble du groupe FILO-LLC (French Innovative Leukemia Organization-LLC), nous avons publié deux travaux sur la thématique de l'auto-immunité associée à la LLC. Dans un premier temps, suite à l'analyse des données clinico-biologiques des patients atteints de LLC et suivis

à l'Hôpital Avicenne, j'ai pu démontrer que l'existence d'un test direct à l'antiglobuline (ou test de Coombs direct) positif, même en l'absence d'hémolyse active, représentait un facteur pronostique péjoratif. Secondairement, grâce à la participation de l'ensemble des centres du groupe FILO-LLC, nous avons rapporté les résultats cliniques d'une immunochimiothérapie de type bendamustine et rituximab dans le contexte d'anémie hémolytique auto-immune associée à la LLC, et démontré que ce traitement était capable d'induire un contrôle durable de l'hémolyse, et donc de représenter un traitement de référence dans cette indication. Ces travaux, également présentés en annexe, sont intitulés « Old DAT and new data: positive direct antiglobulin test identifies a subgroup with poor outcome among chronic lymphocytic leukemia stage A patients » (225) et « Bendamustine and rituximab combination in the management of chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune hemolytic anemia / a multicentric retrospective study of the French CLL intergroup (GCFLLC/MW) » (226).

Enfin, j'ai participé à différents projets cliniques visant à évaluer l'efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinases dans la LLC. En collaboration avec le Professeur Peffault De Latour, nous avons analysé l'évolution du chimérisme d'un patient allogreffé après traitement par ibrutinib dans le contexte de la LLC en rechute post-allogreffe et publié une lettre intitulée « Recovery of full donor chimerism with ibrutinib therapy in relapsed CLL after allogenic stem cell transplantation » (227). La récupération d'un chimérisme 100% donneur après initiation d'un traitement par ibrutinib chez ce patient allogreffé est un autre exemple de l'immunomodulation induite par l'ibrutinib. Enfin, j'ai dirigé le travail de Sophie Godet, interne en hématologie au CHU de Reims, qui a évalué l'impact d'un « switch » d'inhibiteur de kinase (ibrutinib → idelalisib ou idelalisib → ibrutinib) chez des patients atteints de LLC, grâce à la participation de l'ensemble du groupe FILO. Nous avons pu montrer qu'un changement d'inhibiteur de kinase était une option intéressante en cas d'arrêt de traitement pour toxicité, mais qu'il semblait plus judicieux d'utiliser un médicament au mécanisme d'action différent en cas de progression sous inhibiteur de kinase. Ce travail intitulé : « Outcome of chronic lymphocytic leukemia patients who switched from either ibrutinib or idelalisib to alternate kinase inhibitor: A retrospective study of the French innovative leukemia organization (FILO) » (228) a été récemment publié.

Cross-talk between B-cell receptor signaling and WNT/ β -catenin pathway in mantle cell lymphoma.

Gregory Lazarian^{*1,2,3,4}, Chloe Friedrich^{*1,2,3}, Anne Quinquenel^{1,2,3}, Souahil Ouriemmi^{1,2,3}, Elisabetta Dondi^{1,2,3}, David Chiron⁵, Céline Bellanger⁵, Dominique Ledoux^{1,2,3}, Catherine Thieblemont⁶, Jacek Marzec⁶, John G. Gribben⁶, Florence Cymbalista^{1,2,3,4}, Nadine Varin-Blank^{1,2,3}, Laura Gardano^{# 1,2,3} & Fanny Baran-Marszak^{#1,2,3,4}.

¹ U978 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Bobigny, France

² Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité,

³ Labex Inflamex, Bobigny, France

⁴ Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Avicenne, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Bobigny, France

⁵ Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, INSERM, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Nantes, Nantes, France

⁶ Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris

⁷ Barts Cancer Institute, Queen Mary, University of London, London, UK.

*These authors contributed equally to this work.

#These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors: Fanny Baran-Marszak and Nadine Varin-Blank

UMR U978, UFR SMBH

74 rue Marcel Cachin

93000 Bobigny France

Telephone 33 (0)1 48 95 56 46

Fax 33 (0)1 48 95 56 48

Email: fanny.baran-marszak@aphp.fr

Email: nadine.varin@inserm.fr

Key words: Mantle cell lymphoma, β -catenin, NF- κ B, B-cell receptor, WNT16

Abstract

Mantle cell lymphoma (MCL) cells survival relies on the B-cell receptor (BCR) signaling pathway, that also facilitates the interactions with the microenvironment. In some MCL cases, the Wnt/ β -catenin pathway is activated and contributes to cyclin D1 and c-myc expression. As both pathways are important for cell survival as well as tumor cell adhesion, we hypothesized that a cross talk between BCR signaling and β -catenin could affect cellular homeostasis and could be targeted by specific inhibitors. We detected variable amounts in β -catenin in all leukemic MCL samples and its level increased rapidly in response to BCR stimulation. This stabilization is hampered by pretreatment with the BTK inhibitor Ibrutinib, showing the existence of a cross talk between the BCR and the β -catenin pathways. After BCR stimulation, β -catenin translocates into the nucleus where it does not induce the TCF/LEF transcriptional response but participates to the regulation of NF- κ B-regulated gene transcription, such as IL6, IL8, IL1 β . Oligo-pull down and chromatin-immunoprecipitation experiments indicate that β -catenin can be found on the same DNA sequence recognized by NF- κ B, strengthening the idea of an association between these two proteins. In parallel, MCL cells express elevated level of the ligand WNT16, an NF- κ B target gene, as compared to normal B cells. Interestingly, its expression increases upon BCR stimulation to participate to an autocrine loop of NF- κ B-dependent stabilization of β -catenin. The cooperation between NF- κ B and β -catenin is inhibited by PKF118-330 and induces primary MCL cells apoptosis. Thus, β -catenin likely represents another player through which BCR signaling impacts on cell survival. Importantly, this cross talk can be efficiently interrupted by the BTK inhibitor Ibrutinib, used in MCL treatment. Moreover, β -catenin/WNT16 positive loop could be an alternative target in the treatment of MCL.

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a relatively rare B-cell non-Hodgkin lymphoma that remains incurable despite advances in chemotherapy. The majority of MCL cells present overexpression of cyclin D1 driven by the translocation t(11;14)(q13;32) (1). However, the overexpression of cyclin D1 is not sufficient to trigger the disease and other genetic events are necessary for the development of MCL (2, 3). MCL was for a long time considered a disease of naïve B-cells, however a large study on over 800 cases reconsidered this notion (4). In fact, the presence of somatic immunoglobulin heavy chain genes (IGHV) mutations, stereotyped CDR3 sequences and a selective use of few IGHV genes indicate an implication of the antigen in the ontogenesis of some MCL cases. MCL is described as a very heterogeneous disease: some patients show accumulation of tumor B-cells in different organs, such as spleen, bone marrow and lymph nodes, whereas others show a more indolent non-nodal disease associated with a leukemic phase and mutated IGHV genes (5-7). This clinical and biological heterogeneity among MCLs suggests the involvement of additional and multiple deregulated signals in the genesis and evolution of this lymphoma.

Gene expression profiling of MCL cells compared to naïve normal B lymphocytes reveals overexpression in MCL cells of genes from the PI3K-AKT and the WNT signaling pathways (8, 9). In addition, about half of MCL tumors display an accumulation of nuclear β -catenin suggesting its transcriptional activation (10). However, β -catenin dynamics in MCL or its transcriptional role remain undetermined. The Wnt/b-catenin signaling pathway controls differentiation, migration and proliferation in many cell types and it is often altered in cancers (11). At the core of the canonical Wnt pathway, β -catenin is stabilized to translocate to the nucleus where it activates the transcription of several genes such as Axin2, c-myc,

cyclin D1 among others (12-15), (<http://web.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>). However, in absence of Wnt stimulation, β -catenin is degraded by the proteasome upon its phosphorylation by the kinase GSK-3 β that is part of a degradation complex together with Axin, APC, CK1 (16). In the current model, Wnt binding to its receptor triggers GSK-3 β inhibition, observed by the increase of its phosphorylated form that results in β -catenin stabilization. The kinase GSK-3 β can be inhibited by signals other than Wnt, such as PI3K/AKT or PKC (17-19) and regulate cell survival and proliferation.

We have previously shown that one of the major signaling pathways regulating cell survival of MCL cells in the peripheral blood is the one associated to the antigen B cell receptor (BCR) (20). Downstream effectors of the BCR signaling pathway are transcription factors e.g. NF- κ B, that control the expression of several genes that enhance cell survival, such as anti-apoptotic factors and pro-survival cytokines, i.e. IL-6 (21). BCR signal transduction activates PI3K and AKT inducing GSK3 phosphorylation and inhibition (Reviewed in Gold et al. (22)). In a mouse B cell lymphoma cell line WEHI-231, BCR stimulation was shown to initiate a PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway leading to β -catenin stabilization (19). Both BCR and PI3K pathways are constitutively activated in MCL (6, 8, 23) and contribute to GSK-3 β inhibition and β -catenin stabilization.

In this manuscript we show that, in MCL cells, β -catenin is an effector of the BCR signaling pathway because it is rapidly stabilized upon BCR stimulation. However, its transcriptional activity is not directed towards canonical Wnt regulated genes, rather towards NF- κ B effectors. We also found that PKF118-310, which is an inhibitor of β -catenin transcriptional activity, has an impact on cell survival. New therapeutic approaches approved for treating MCL target the BCR kinase BTK (Ibrutinib) and the proteasome (bortezomib) and interfere

with NF- κ B and β -catenin, although the mechanisms underlying MCLs sensitivity to these agents are not well documented. A better understanding of the signaling pathways that are specifically involved in the pathogenesis of MCL will contribute to the definition of therapeutic strategies that can effectively control this disease.

Results

BCR stimulation stabilizes β -catenin in MCL cells

It was previously shown that β -catenin accumulates in the nucleus of three MCL cell lines and in half of paraffin-embedded MCL tumors (10). However, β -catenin dynamics in MCL cells and its role in the nucleus remain unclear.

We first evaluated the expression of β -catenin in blood circulating primary MCL lymphocytes either characterized by mutated or unmutated IGHV (Figure 1A). Despite the variability of expression, β -catenin was detected in the cells of all patients tested, independently of the mutational status. The cellular level of β -catenin is the result of the activity of the degradation complex where β -catenin is phosphorylated and targeted for proteasomal degradation (24). To verify whether the destruction complex is implicated in the basal level of β -catenin, we treated MCL primary cells with XAV-939 that stabilizes Axin and favors the activity of the degradation complex. In this condition, we observed a decrease of β -catenin implying that the degradation complex participates to the regulation of the basal level of β -catenin in MCL cells (Figure 1B). In addition, the treatment with a proteasome inhibitor, bortezomib (PS-341, Velcade) induced a strong increase of β -catenin level in primary and two MCL cell lines (Figure 1B, supplementary 1A), indicating that the activity of the proteasome is also responsible for the basal amount of β -catenin in these cells.

BCR engagement was described to induce accumulation of β -catenin via PI3K/AKT/GSK-3 pathway (25). Because BCR signaling is constitutively activated and induces MCL cell survival, we hypothesized that chronic active BCR signaling and BCR engagement would increase β -catenin level in MCL. Indeed, we found that BCR stimulation increases the level of β -catenin within 5min, to reach a maximum at 60 min (Figure 1C) suggesting an inhibition of its degradation. The increase of β -catenin upon BCR stimulation was also observed in the MCL cell lines HBL2 and Granta-519 (Supplementary Figure 1B and C) in which a higher level of β -catenin persists even after 24 hours of stimulation (Supplementary figure 1D). In parallel, the phosphorylated form of GSK-3 β (p-S9 GSK-3 β) corresponding to its inhibited form also increased within 5 min of BCR stimulation (Figure 1C and supplementary figure 1E) but its level remains unchanged after this time. The increase of p-GSK-3 β suggests that an inhibition of the degradation occurs upon BCR stimulation leading to a rapid accumulation of β -catenin. The pre-treatment with Ibrutinib, an irreversible BTK inhibitor, prior to BCR stimulation hampers BCR-induced phosphorylation of GSK3 β and β -catenin stabilization (Figure 1D). This finding confirms that the increase of β -catenin is linked to the activity of the BCR signal transduction machinery.

BCR engagement induces β -catenin nuclear localization

In the Wnt signaling pathway, the stabilization of β -catenin triggers its nuclear translocation and transcriptional activity upon interaction with the TCF family of transcription factors. Thus, we inquired whether the BCR-dependent increase of β -catenin affects its cellular distribution. The MCL cell line Granta-519 was stimulated for 1 hour with anti-IgM antibody and cell fractionation was performed to assess β -catenin nuclear localization. In the basal state β -catenin was detected in the nuclear fraction, albeit at low level. BCR stimulation

triggered the increase of nuclear β -catenin (Figure 2A). We reproduced these results in primary cells (Figure 2B). As a further confirmation of these findings we used confocal microscopy to observe the localization of endogenous β catenin (Figure 2C). In untreated cells, β -catenin staining was essentially in the cytoplasm whereas upon BCR stimulation, β -catenin was also detected in the nucleus.

The nuclear localization of β -catenin prompted us to inquire its transcriptional activity. In the Wnt signaling pathway, β -catenin promotes transcription by binding to TCF/LEF transcription factor in most cell types and induces transcription of Axin2, cyclinD1, cMyc, LEF1 among others. When we stimulated MCL primary cells with anti-IgM for 4 hours we did not observe induction of any of the Wnt target genes we tested, i.e. Axin2, cyclinD1 and LEF1 with the exception of c-myc that is known to be induced by BCR stimulation (26)(Figure 2D). Overall BCR stimulation does not induce TCF dependent β -catenin transcriptional activity in MCL cells.

β -catenin cooperates with NF- κ B during BCR signaling

We previously showed that BCR signaling induces NF- κ B-dependent cytokines expression, e.g. IL6, IL8, IL10 and IL1 β (21). Thus, we sought to determine whether β -catenin cooperates with NF- κ B as described in DLBCL (27). We analyzed the mRNA expression of c-MYC, IL6, IL8 and IL1 β , known NF- κ B target genes, in MCL cells treated with XAV-939 (20 μ M) followed or not by BCR-engagement for 4 hours (figure 3A). The treatment with a β -catenin inhibitor resulted in a significant downregulation of mRNA expression for all these genes, except c-MYC. Treatment with XAV-939 prior and during BCR stimulation partially decreased the expression of NF- κ B target genes (figure 3A). To verify whether the transcriptional control of β -catenin on IL-6 gene translates into a regulation of the cell

capacity of secretion of IL-6, we analyzed the intracellular level of this cytokine by flow cytometry in presence of PMA-ionomycin-brefeldinA. Indeed, IL-6 expression, which is strongly induced by BCR stimulation, decreased significantly upon XAV-939 treatment both in the basal state and after BCR-engagement (Figure 3B, Supplementary figure 2). These results indicate participation of β -catenin to the regulation of NF- κ B-regulated genes transcription.

Taking advantage of an oligo-pulldown approach we inquired whether b-catenin and NF- κ B can bind a biotinylated NF- κ B canonical consensus DNA sequence (28) and whether the binding is modulated by BCR stimulation. In the MCL cell line Granta-519, we observed that without BCR stimulation, NF- κ B and β -catenin are detected in the precipitate with the biotinylated oligonucleotide, in agreement with a constitutive BCR activation in these cells. The signal for both proteins in the precipitate strongly increased upon BCR stimulation (Figure 3C). To verify the specificity of the interaction between the proteins and the DNA, we used a competitor oligonucleotide, a non-biotinylated version of the same NF- κ B consensus sequence. In presence of the competitor neither NF- κ B nor b-catenin were detected in the precipitate, confirming that both proteins interact specifically with the NF- κ B consensus sequence. The interaction of NF- κ B and b-catenin with the biotinylated oligonucleotide upon BCR stimulation was confirmed also in primary MCL cells, where the signals for b-catenin and NF- κ B were detected in presence of BCR stimulation only (Figure 3C).

The binding of b-catenin to the consensus sequence of NF- κ B prompted us to check whether b-catenin can also be interact with the promoter of NF- κ B target genes, such as IL-6 for which the binding region to NF- κ B is well known (29). We performed chromatin immunoprecipitation using a specific b-catenin antibody and found an enrichment of NF- κ B

binding sequence in the precipitate as compared to a sequence in the ORF region and one in the 3'-UTR of the same gene (Figure 3D).

The NF-kB target gene WNT16 is overexpressed in MCL and participates to an autocrine positive feedback loop under BCR engagement

BCR stimulation could trigger b-catenin stabilization directly, e.g. by inhibition of GSK3b or lead to the secretion of factors that stabilize b-catenin in an autocrine fashion. Since b-catenin is best known to be stabilized by Wnt ligands, we took a transcriptomic approach to assess which Wnt ligands are transcribed in MCL cells. Indeed, we observed that MCL cells synthesize several members of the Wnt family (Supplementary Table1). Transcription of WNT16 is particularly relevant because its transcription is regulated directly by NF-kB (30). Interestingly we observed a striking overexpression of WNT16B in MCL primary cells as compared to MCL cell lines and to normal CD5+ B cells purified from the umbilical cord (Figure 4A). In addition, we observed that among Wnt family members that are transcribed in MCL cells, WNT16 is the only one that is upregulated upon BCR stimulation (Supplementary Figure 3A). We confirmed the BCR dependent increase of WNT16 by western blot (Figure 4B). Since WNT16 is a secreted factor, we added Brefeldin A for the last four hours of BCR stimulation to induce the retention and accumulation of intracellular WNT16. In these conditions WNT16 is strongly increased in stimulated cells (Figure 4B). In the literature, WNT16 has been described to elicit both the canonical and non-canonical Wnt signal transduction according to the dependence or not on b-catenin, respectively (30-32). To corroborate that in MCL WNT16 is able to induce b-catenin stabilization we transfected HEK293T cells with a plasmid carrying the WNT16B gene and used the conditioned medium issued from these cells to stimulate Granta-519 cells. The treatment for 6 hours of Granta

cells with the conditioned medium enriched in WNT16B induced the increases b-catenin level (figure 4C). In addition, the transfection of 293T cells and Granta cells with the same plasmid carrying the gene WNT16B increases the level of b-catenin (figure 4D).

All these results confirmed that WNT16 is over expressed in MCL and strongly support participation in an autocrine positive loop induced by BCR stimulation that contributes to b-catenin stabilization.

Inhibition of β -catenin transcription complex induces apoptosis

The transcriptional cooperation of β -catenin and NF- κ B for the control of the expression of survival genes, such as IL-6, prompted us to verify whether the disruption of this complex could inhibit the BCR survival signal. PKF118-310 is a molecule that alters interaction between b-catenin and TCF4 and inhibits b-catenin transcriptional activity (33). Whether PKF118-310 can also impact on interaction of b-catenin with other partners has never been described. We treated Granta-519 with PKF 118-310 prior to BCR stimulation and we performed an oligo pull down with the NF- κ B DNA consensus sequence. We recovered a lower amount of b-catenin and NF- κ B when the pull down was performed in presence of both the inhibitor and BCR stimulation (Figure 5A). This lower amount in the precipitate does not reflect a decrease of these proteins in the input indicating that PKF118-310 specifically alters DNA binding of the two proteins upon BCR stimulation. This demonstrates that PKF 118-310 could disrupt the interaction of β -catenin and NF- κ B (p65) and the DNA. Next, we inquired whether the disruption of the interaction between NF- κ B and b-catenin could hinder the BCR dependent survival response. Measure of the apoptotic rate confirmed that PKF118-310 induces primary MCL cells apoptosis and abrogates the survival response induced by BCR stimulation (Figure 5B).

Discussion

Beta-catenin is involved in several human cancers (11) and in B cell malignancies (34, 35). Beta-catenin nuclear localization was previously described in half of MCL tumors (10). We focused our analysis on circulating primary MCL lymphocytes and provided evidence that b-catenin is an effector of the BCR signaling pathway. BCR stimulation results in b-catenin stabilization and nuclear translocation. The BCR dependent stabilization of b-catenin is linked, at least partially, to GSK3 β inhibition in agreement with the current model whereby BTK activates the AKT/PI3K axis (36) which phosphorylates GSK3b (19). Indeed, inhibition of BTK by Ibrutinib leads to a decrease of phosphorylated GSK3b in parallel to a decrease of b-catenin. However, nuclear translocation of b-catenin does not activate the transcription of TCF targets genes, unlike Wnt stimulation. The results were partially in accordance with Christian and al. showing the same kinetics of accumulation of BCR-induced β -catenin than in immature B cell lines but this did not lead to an increase of the WNT target gene signature associated with TCF/LEF1 transcriptional activation (19) . Moreover, a similar feature was described in primary T lymphocytes upon T cell stimulation whereby β -catenin accumulation did not induce the transcription of TCF/ β -catenin target genes as Axin2 (37). BCR signaling seems to direct b-catenin towards a different transcriptional response depending on the maturation status of the cells.

The inhibition of b-catenin hampers transcription of NF-kB target genes essential for MCL cells survival. The regulation between the Wnt/b-catenin and NF-kB signaling pathways has been described in other cell and cancer types and it can be both positive or negative according to the cell type and can be tumor specific (38, 39) . We found that b-catenin can bind the same NF-kB DNA consensus sequence and occupy the same sequence as NF-kB on the IL-6 promoter. In DLBCL, co-immunoprecipitation experiments showed that b-catenin

and NF- κ B can interact (27). Moreover, In DLBCL, characterized by a constitutive activation of NF- κ B, β -catenin stabilization did not suffice to induce WNT signature genes, but was required for induction of NF- κ B regulated genes, such as IL10 (27). All these data point to the association between NF- κ B and β -catenin for control of cell survival upon BCR stimulation. In the quest for mechanisms that can contribute to stabilization of β -catenin in a BCR dependent fashion, we observed that BCR stimulation induces the transcription and secretion of WNT16. The role of WNT16 has been recently described in the dialogue between tumor cells and the microenvironment (30, 40). Indeed, this NF- κ B target gene is transcribed by the stromal cells of the microenvironment following genotoxic stress and it promotes therapy resistance and cancer progression (30). In MCL cells WNT16 is transcribed and secreted upon BCR stimulation and it can contribute to the stabilization of β -catenin in these cells.

The comparison of gene expression profiles of MCL cells in the blood versus the lymph node underlined that there are patients whose cells have a strong NF- κ B signature in the lymph node but not in the blood whereas other patients' cells have a strong NF- κ B signature both in the lymph node and in the blood (6). Thus, in the latter group of patients the cells do not need the lymph node microenvironment for BCR and NF- κ B dependent cell survival. The cross talk between NF- κ B and β -catenin provides an alternative mechanism that could amplify BCR signaling through NF- κ B leading to an autocrine NF- κ B -induced WNT16 and IL6 and a survival signal for leukemic cells.

Given the role of β -catenin in amplifying the NF- κ B-induced autocrine survival signals, the inhibition of β -catenin would be a promising therapeutic strategy in MCL. Therapeutic agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling for disease treatment are in development. A number of small molecules and biologic agents that target the Wnt/ β -catenin signaling have

entered clinical trials (41) but none of them is available and safe enough yet, our understanding about the regulatory circuitry and complexity of this pathway remain to be fully elucidated (42). Indeed, we showed that treatment with XAV-939 an inhibitor of WNT signaling acting upstream of β -catenin degradation partially decreased β -catenin but it had no effect on MCL cells survival *in vitro*. However, the treatment with PKF118-310 targeting β -catenin transcription complex induced apoptosis only in tumor cells as compared to healthy control cells (data not shown). This was already observed in MCL-ICs (43) and confirmed that β -catenin activation in MCL is the result of different pathways. As we evidenced for the first time that WNT16 is overexpressed in MCL targeting this autocrine loop could be a specific treatment. In fact, targeting WNT pathway was shown to eliminate MCL-ICs (43). Moreover, targeting NF- κ B with bortezomib should be particularly effective in leukemic MCL even though proteasome inhibition induces β -catenin accumulation. Indeed, in myeloma cells Enzastaurin induced high β -catenin accumulation leading to ER stress response-mediated growth arrest, as well as triggering apoptosis (44).

Materials and methods

MCL samples and cell lines

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from 20 MCL leukemic patients by Ficoll-Hypaque density gradient (Stem Cell Technologies, Grenoble, France). Lymphocytosis was superior to 10.0 Giga/L (supplementary Table 2). The diagnosis of MCL was ascertained by immunophenotyping, cytogenetic and FISH analysis of t(11;14) and overexpression of cyclin D1 was detected by competitive RT-PCR according to the World Health Organization classification. All experiments were performed with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) containing at least 80% of MCL cells or with purified B cells. All patients provided

written informed consent, validated by the Ethics Committee from the Avicenne Hospital in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients usually received treatment shortly after sampling which made challenging to repeat experiments on the same patient. Granta-519, HEK293T cell lines were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany).

Cell culture and reagents

Patients' cells were cryopreserved in liquid nitrogen in the presence of 10% dimethyl sulfoxide and 20% heat-inactivated FCS at Avicenne Hospital. MCL leukemic cells (3×10^6 cells/ml) and Granta-519 cells (1×10^6 cells/ml) were cultured in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin (Gibco BRL, ThermoFischer Scientific, Villebon sur Yvette, 91963 – Courtaboeuf, France), 1 mM sodium pyruvate (Gibco BRL), MEM vitamins 100 x (Gibco BRL) and 5 mg/mL plasmocin (Cayla InvivoGen, Toulouse, France). For BCR stimulationsoluble F(ab')₂ fragment donkey anti-human IgM antibody (10 µg/mL; Jackson ImmunoResearch, Interchim, Monluçon, France). Cells were also treated with either Bortezomib (10nM) (Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France), Ibrutinib (PCI-32765)(5µM)(Selleck Chemicals Euromedex, Souffelweyersheim, France), XAV 939 (20µM) (Selleck Chemicals) or PKF 118-310 (5µM)(Sigma Aldrich Chimie, Lyon, France).

Determination of IGHV mutational status.

Following amplification with consensus 5' FR1c and 3' JH primers, PCR fragments were sequenced and analyzed for the mutational status using the IMGT database. Amplification

and sequence analysis of IGH rearrangements were performed on either DNA or cDNA as previously described (45) .

Apoptosis assay

Cell apoptosis was evaluated using flow cytometry (FACSCanto™ II Becton Dickinson) on leukemic MCL PBMC after gating on CD19+ cells using Annexin V-FITC and propidium iodide staining (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Percentage of apoptotic cells corresponded to % of annexin V-positive, including PI-negative and PI-positive cells. All measurements were done in duplicate.

Quantification of intracellular IL6 by flow cytometry

One million peripheral blood mononuclear cells were cultured for 16 hours in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin in 24 well plates in the presence or not of soluble donkey F(ab')₂ anti μ antibody (10 μ g/ml) and XAV 939 (20 μ M). After 16 hours, cells were labeled in 1X phosphate-buffered saline (PBS) buffer containing fixable viability stain 510 (BD Biosciences) for 10 minutes according to the manufacturer's protocol, then washed and labeled for extracellular staining with saturating concentration of anti-CD5/APCVio770 and anti CD19/PEVio770 (Miltenyi biotech, Paris, France) for 15 minutes. The cells were then subjected to intracellular labeling. Cells were fixed and permeabilized with cytofix/cytoperm buffer (BD Biosciences) following the manufacturer's protocol and then stained with anti-IL6/PE antibody or relevant isotype control (BD biosciences) for 2 hours. Dead lymphocytes, identified by positive fixable viability stain 510 were excluded from further analysis. Data were acquired with a BD FACSCanto II analyzer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo X software.

Quantification of IL1 β , MYC, IL8, IL6 mRNA by qRT-PCR

Total RNA was extracted with Trizol followed by RNeasy Mini kit (Qiagen) by a Qiacub extractor (Qiagen, Les Ulis, France). At least 500 ng of total RNA were retro-transcribed with iSCRIPT (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions. The expression of IL1 β , MYC, IL8, WNT16 and IL6 mRNAs was analyzed in unstimulated and anti-IgM stimulated cells for 3 hours pretreated or not with XAV 939 (20 μ M) using TaqMan Gene Expression Assays probes (ThermoFischer Scientific Villebon sur Yvette, 91963 – Courtaboeuf, France) (IL6 Hs 00985639_m1, IL8 Hs 00174103_m1, IL1 β Hs 01555410_m1, MYC Hs00153408_m1 and WNT16 Hs00365138_m1) on a 7500 Real-time PCR system (Life Technologies Saint Aubin, France). Target gene expression was normalized to the mean Ct values of the housekeeping gene ABL1 (Hs01104728_m1), RPL37A (Hs01102345_m1) or HPRT1 (HPRT1 Hs 99999909_m1), then normalized to unstimulated control cells to determine the fold change. Relative fold change expression was calculated by the $\Delta\Delta$ Ct method and the values are expressed as $2^{-\Delta\Delta$ Ct. All points were performed in duplicate.

Western blotting.

Whole protein extracts were obtained as follows: 3×10^6 cells were resuspended in lysis buffer (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, sodium dodecyl sulfate 2%, glycerol 2%). After sonication, protein concentration in the extracts was measured by colorimetric method (kit Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) and separated on 10% polyacrylamide denaturing gel then transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-C Extra, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). For cell fractionation experiments nuclear and cytoplasmic extracts were obtained with the Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Scientific) and then separated on 10% polyacrylamide denaturing gel and transferred to a membrane. The

membrane was blocked in 5% non-fat milk (Régilait, Saint-Martin Belle Roche, France) and tris-buffered saline Tween 20 (TBST Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) and incubated overnight with one of the following antibodies: rabbit polyclonal anti- GSK3 β , anti-p GSK3 α/β (S21/S9), anti-pSYK (γ 525/526), anti-BTK, anti-NF-kappaB p65 and anti-WNT16 antibodies (Cell Signaling Technology Ozyme Saint Quentin en Yveline, France) at 1/500 or mouse monoclonal anti-SYK, anti β -catenin (BD biosciences) or anti-WNT16 (Santa Cruz) loading control anti-actin, anti-lamin A/C, and anti α -tubulin antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Cell Signaling and Invitrogen respectively) at 1/1000. Membranes were then washed with TBST and incubate with the appropriate (anti-mouse or anti-rabbit) HRP-conjugated secondary antibody for 1 hour at room temperature. Detection was performed using ECL Prime Western Blotting Detection reagent (Amersham GE Healthcare) and a Chemidoc Imager (Bio-Rad).

Cellular localization of β -catenin by confocal microscopy

Cellular localization of β -catenin was analyzed on cells cytopspined on glass slides. Cells were washed twice in PBS, fixed in 3.7% formaldehyde in PBS for 15 min, permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 15 min and blocked with 5% FCS, 0.1% Tween in PBS for 1 hour. Cells were incubated with the primary antibody anti- β -catenin Alexa Fluor 488-labeled 1/100 for 1 hour. After counterstaining with DAPI, coverslips were mounted onto glass slides in Vectashield (Vectorlabs, Clinisciences, Montrouge, France). Fluorescent images were digitally acquired using a BD pathway bioimaging system (Biosciences).

Oligo pull-down

The biotin-labeled oligonucleotide, which corresponds to NF- κ B p65 consensus sequence, was synthesized as follow : 50 μ g of forward (5'- GGG-AAA-TTC-CCG-GAA-ATT-CCC-GGA-AAT-TCC-CGG-AAA-TTC-C-3') and reverse (5'- GAA-ATT-TCC-GGG-AAT-TTC-CGG-GAA-TTT-CCG-GGA-ATT-TCC-C-3') sequences were mixed and annealed (10mM Tri-HCl pH 7.5-8, 50mM NaCl, 1mM EDTA) to have double-stranded oligonucleotides. For competition assay, 10X excess of non-biotinylated oligonucleotides was used. The oligonucleotides were then immobilised on streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen, ThermoFischer Scientific) (5 μ g DNA/10 μ L solution beads/reaction).

40M cells were used per condition. First, cells were lysed with 400 μ L of hypotonic buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, DTT 0.5 mM, protease inhibitors). For nuclear lysis, cell pellet was resuspended in 400 μ L of NP40 buffer (150mM NaCl, 1% NP40, 50 mM Tris pH 8.0), supplemented with a cocktail of protease inhibitors (10 mM Orthovanadate 3, 10 μ M NaF, 10 μ g Aprotinin, 5 μ g leupeptin, 1 μ g pepstatin / ml and PMSF 0.1 M). 10% of the nuclear extract was used as input. Oligonucleotide conjugated beads were mixed with the nuclear extracts, incubated for 1h at 4°C on a rotating wheel and precipitated using a magnetic rack. Beads were washed three times with the nuclear lysis in presence of 0.1% NP40. After washes, the bound proteins were eluted with 20 μ L of nuclear lysis buffer and 5 μ L of Laemmli buffer for SDS-PAGE and Western blot analysis. For the loading control of nuclear extract anti-hnRNP-A1(Sigma Life Science) was used.

HEK293T transfection

HEK293T cells were seeded at 3*10⁵ cells/2ml in 6-well plates and incubated 24h at 37°C to a confluence of 70%. 3 μ g of plasmid encoding WNT16 or 3 μ g of empty plasmid as negative

control were diluted in 200µL of Jet Prime Buffer and 6 µL of Jet Prime reagent was added (Polyplus transfection Illkirch-Graffenstaden, France) following the manufacturer's protocol. pcDNA-Wnt16 was a gift from Marian Waterman (Addgene #35923) (46).

GRANTA transfection

5*10⁶ Granta-159 cells were transfected using Amaxa Human B cell Nucleofactor Kit (Lonza, Levallois-Perret, France) with the Nucleofactor program W-010 following the manufacturer's protocol.

Chromatin immunoprecipitation

ChIP experiments were performed using the Ideal-ChIP for transcription factor kit, following the manufacturer's protocol (Diagenode Liège, Belgium). A total of 5*10⁶ Granta cells were first cross-linked with the ChIP cross-link gold reagent (Diagenode Liège, Belgium) and then fixed by 1% formaldehyde and lysed. Chromatin samples (300uL) were sheared 20 min at 4°C (10 cycles 30s ON and 30s OFF twice) in a Bioruptor sonicator (Diagenode). After fragmentation, the sheared chromatin was precipitated with 1ug of anti-β-catenin antibody (Diagenode) or IgG rabbit polyclonal antibody. Chromatin–antibody complexes were then precipitated with protein A magnetic beads. After washing, complexes protein/DNA were eluted and reverse cross-linked at 65°C for 4 hours. Immunoprecipitated DNA and input were purified using the Ipure beads kit and subsequently assayed by real time PCR using the SYBR Green Mastermix (Appliedbiosystems,) on a StepOne plus (ThermoFischer Scientific). The following primers were used for amplification of the IL6 promoter according to Raskatov et al. (29) fw: CCTCACCTCCAACAAAGATT and reverse: CCTCAGACATCTCCAGTCCTA corresponding to the region 1208-1309 of the IL-6 promoter. For negative controls we used

primers to amplify a sequence in the 3'UTR (forward: GTTGTTAATGGGCATTCTTCTT and reverse AATAGTGTCTAACGCTCATACTT) and a region in the ORF (forward: ATGAACTCC-TTCTCCACAA and reverse: CTCACACAGGGCTCGAC) The data were expressed as fold enrichment over the 2- Δ Ct of the rabbit IgG CHIP, whereby Δ Ct was calculated as $C_{tinput} - C_{t\text{sample}}$.

Statistical analyses

Differences between groups were determined using the unpaired Student *t* test or the Wilcoxon-signed rank test as appropriate. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (San Diego, CA). *P* values below 0.05 were considered statistically significant.

References

1. Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1994 Oct 15;84(8):2726-2732.
2. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012 Oct;122(10):3416-3423.
3. Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2011 Jan 06;117(1):26-38.
4. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue MH, Pedersen LB, Lopez AN, Dagklis A, Rombout P, Beldjord K, Kolstad A, Dreyling MH, Anagnostopoulos A, Tsiftaris A, Mavragani-Tsipidou P, Rosenwald A, Ponzoni M, Groenen P, Ghia P, Sander B, Papadaki T, Campo E, Geisler C, Rosenquist R, Davi F, Pott C, Stamatopoulos K. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3088-3095.

5. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):2067-2078.
6. Saba NS, Liu D, Herman SE, Underbayev C, Tian X, Behrend D, Weniger MA, Skarzynski M, Gyamfi J, Fontan L, Melnick A, Grant C, Roschewski M, Navarro A, Bea S, Pittaluga S, Dunleavy K, Wilson WH, Wiestner A. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF-kappaB activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016 Jul 07;128(1):82-92.
7. Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, Catovsky D, Thomas PW, Avet-Loiseau H, Oscier D. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4975-4981.
8. Rizzatti EG, Falcao RP, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Anselmo-Lima WT, Okamoto OK, Zago MA. Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways. *Br J Haematol*. 2005 Aug;130(4):516-526.
9. Kimura Y, Arakawa F, Kiyasu J, Miyoshi H, Yoshida M, Ichikawa A, Niino D, Sugita Y, Okamura T, Doi A, Yasuda K, Tashiro K, Kuhara S, Ohshima K. The Wnt signaling pathway and mitotic regulators in the initiation and evolution of mantle cell lymphoma: Gene expression analysis. *Int J Oncol*. 2013 Aug;43(2):457-468.
10. Gelebart P, Anand M, Armanious H, Peters AC, Dien Bard J, Amin HM, Lai R. Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):5171-5179.
11. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 2012 Jun 08;149(6):1192-1205.
12. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999 Apr 01;398(6726):422-426.
13. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998 Sep 04;281(5382):1509-1512.

14. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2002 Feb;22(4):1172-1183.
15. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002 May;14(5):381-395.
16. Stamos JL, Weis WI. The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jan 01;5(1):a007898.
17. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):785-789.
18. Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J Biol Chem*. 1992 Aug 25;267(24):16878-16882.
19. Christian SL, Sims PV, Gold MR. The B cell antigen receptor regulates the transcriptional activator beta-catenin via protein kinase C-mediated inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Immunol*. 2002 Jul 15;169(2):758-769.
20. Baran-Marszak F, Boukhar M, Harel S, Laguillier C, Roger C, Gressin R, Martin A, Fagard R, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F, Ledoux D. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2010 Nov;95(11):1865-1872.
21. Bernard S, Danglade D, Gardano L, Laguillier C, Lazarian G, Roger C, Thieblemont C, Marzec J, Gribben J, Cymbalista F, Varin-Blank N, Ledoux D, Baran-Marszak F. Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2014 Jun 15;136(12):2761-2774.
22. Gold MR, Ingham RJ, McLeod SJ, Christian SL, Scheid MP, Duronio V, Santos L, Matsuuchi L. Targets of B-cell antigen receptor signaling: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway and the Rap1 GTPase. *Immunol Rev*. 2000 Aug;176:47-68.
23. Dal Col J, Dolcetti R. GSK-3beta inhibition: at the crossroad between Akt and mTOR constitutive activation to enhance cyclin D1 protein stability in mantle cell lymphoma. *Cell Cycle*. 2008 Sep 15;7(18):2813-2816.

24. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997 Dec 15;11(24):3286-3305.
25. Gold MR, Scheid MP, Santos L, Dang-Lawson M, Roth RA, Matsuuchi L, Duronio V, Krebs DL. The B cell antigen receptor activates the Akt (protein kinase B)/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol.* 1999 Aug 15;163(4):1894-1905.
26. Boukhiar MA, Roger C, Tran J, Gressin R, Martin A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Varin-Blank N, Ledoux D, Baran-Marszak F. Targeting early B-cell receptor signaling induces apoptosis in leukemic mantle cell lymphoma. *Exp Hematol Oncol.* 2013 Feb 19;2(1):4.
27. Bogнар MK, Vincendeau M, Erdmann T, Seeholzer T, Grau M, Linnemann JR, Ruland J, Scheel CH, Lenz P, Ott G, Lenz G, Hauck SM, Krappmann D. Oncogenic CARMA1 couples NF-kappaB and beta-catenin signaling in diffuse large B-cell lymphomas. *Oncogene.* 2016 Aug 11;35(32):4269-4281.
28. Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature.* 1998 Jan 22;391(6665):410-413.
29. Raskatov JA, Meier JL, Puckett JW, Yang F, Ramakrishnan P, Dervan PB. Modulation of NF-kappaB-dependent gene transcription using programmable DNA minor groove binders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 24;109(4):1023-1028.
30. Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, Coleman I, True L, Nelson PS. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med.* 2012 Sep;18(9):1359-1368.
31. Clements WK, Kim AD, Ong KG, Moore JC, Lawson ND, Traver D. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature.* 2011 Jun 8;474(7350):220-224.
32. Shen J, Chen X, Jia H, Meyers CA, Shrestha S, Asatrian G, Ding C, Tsuei R, Zhang X, Peault B, Ting K, Soo C, James AW. Effects of WNT3A and WNT16 on the Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Perivascular Stem/Stromal Cells. *Tissue Eng Part A.* 2017
33. Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW, Shivdasani RA. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell.* 2004 Jan;5(1):91-102.

34. Khan NI, Bradstock KF, Bendall LJ. Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007 Aug;138(3):338-348.
35. Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Kreuzer KA. Wnt/beta-catenin/LEF-1 signaling in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a target for current and potential therapeutic options. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010 Nov;10(7):716-727.
36. Lindvall J, Islam TC. Interaction of Btk and Akt in B cell signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 May 24;293(5):1319-1326.
37. Lovatt M, Bijlmakers MJ. Stabilisation of beta-catenin downstream of T cell receptor signalling. *PLoS One.* 2010 Sep 16;5(9).
38. Koopmans T, Eilers R, Menzen M, Halayko A, Gosens R. beta-Catenin Directs Nuclear Factor-kappaB p65 Output via CREB-Binding Protein/p300 in Human Airway Smooth Muscle. *Front Immunol.* 2017;8:1086.
39. Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/beta-Catenin and NF-kappaB Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol.* 2016;7:378.
40. Sun Y, Zhu D, Chen F, Qian M, Wei H, Chen W, Xu J. SFRP2 augments WNT16B signaling to promote therapeutic resistance in the damaged tumor microenvironment. *Oncogene.* 2016 Aug 18;35(33):4321-4334.
41. Zhang X, Hao J. Development of anticancer agents targeting the Wnt/beta-catenin signaling. *Am J Cancer Res.* 2015;5(8):2344-2360.
42. Yang K, Wang X, Zhang H, Wang Z, Nan G, Li Y, Zhang F, Mohammed MK, Haydon RC, Luu HH, Bi Y, He TC. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Lab Invest.* 2016 Feb;96(2):116-136.
43. Mathur R, Sehgal L, Braun FK, Berkova Z, Romaguera J, Wang M, Rodriguez MA, Fayad L, Neelapu SS, Samaniego F. Targeting Wnt pathway in mantle cell lymphoma-initiating cells. *J Hematol Oncol.* 2015 Jun 06;8:63.
44. Raab MS, Breitkreutz I, Tonon G, Zhang J, Hayden PJ, Nguyen T, Fruehauf JH, Lin BK, Chauhan D, Hideshima T, Munshi NC, Anderson KC, Podar K. Targeting PKC: a novel role for beta-catenin in ER stress and apoptotic signaling. *Blood.* 2009 Feb 12;113(7):1513-1521.

45. Belessi CJ, Davi FB, Stamatopoulos KE, Degano M, Andreou TM, Moreno C, Merle-Beral H, Crespo M, Laoutaris NP, Montserrat E, Caligaris-Cappio F, Anagnostopoulos AZ, Ghia P. IGHV gene insertions and deletions in chronic lymphocytic leukemia: "CLL-biased" deletions in a subset of cases with stereotyped receptors. *Eur J Immunol.* 2006 Jul;36(7):1963-1974.

46. Najdi R, Proffitt K, Sprowl S, Kaur S, Yu J, Covey TM, Virshup DM, Waterman ML. A uniform human Wnt expression library reveals a shared secretory pathway and unique signaling activities. *Differentiation.* 2012 Sep;84(2):203-213.

Figures legends

Figure 1. Stabilization of β -catenin in primary MCL cells. (A) Western blot to visualize β -catenin expression. Total protein extracts of PBMC from 8 MCL patients (4 with mutated and 4 unmutated IGHV) were analysed by western-blot with mouse anti- β -catenin antibody. Actin was used as loading control. (B) XAV-939 and Bortezomib treatments. To study the mechanism of β -catenin stabilization, PBMC from MCL4 were treated or not with 20 μ M of XAV939 for 4 hours or Bortezomib (10nM) for 2 hours and total lysates were analyzed by western blot to detect β -catenin and actin for loading control. The image is representative of two independent experiments. (C) Analysis of β -catenin dynamics in MCL primary cells upon BCR stimulation. PBMC from MCL patients were stimulated with 10 μ g/ml anti-IgM antibody for the indicated times. Total protein extracts were analyzed by western-blot with anti- β -catenin mouse antibody, anti-phospho S9 GSK-3 β rabbit antibody, anti phospho-syk rabbit antibody as a control for BCR stimulation (Left panel). After stripping the membrane was reprobed with anti-GSK-3 β (total), anti-Syk (total) and anti-actin antibodies. β -catenin level was quantified by densitometry on 6 different MCL patients cell extracts. The relative amount of β -catenin was calculated as ratio of β -catenin signal and that of actin (Right

panel). For each time point the mean \pm SEM is shown. Significance was determined by Student's *t* test: *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$. (D) PBMC from MCL9 were pretreated with the inhibitor of BTK ibrutinib (7 μ M) for 90 min and BCR was stimulated or not with 10 μ g/ml anti-IgM antibody for 90 min. Total protein extracts were analyzed by western-blot with anti- β -catenin antibody, anti-phospho S9 GSK-3 β antibody and the membrane was reprobated with anti-GSK-3 β and anti-actin antibodies. One representative of three independent experiments is shown (Left panel). Densitometric quantification of the signals of β -catenin from the western blots (Right panel). The relative amount of β -catenin was calculated as ratio of β -catenin signal and that of actin. Significance was determined by Student's *t* test: *, $p < 0.05$.

Figure 2. BCR engagement induces β -catenin stabilization and nuclear relocalisation. (A)

Cell fractionation. Granta-519 cells were stimulated or not with 10 μ g/mL of soluble anti-IgM for 1 hour. Cytosolic and nuclear fractions were analyzed separately to detect β -catenin. Tubulin and lamin A/C were used to verify the purity of the cytosolic and nuclear fraction respectively. (B) Primary PBMC (MCL4) were treated with anti-IgM antibody for 1 hour and cytoplasmic and nuclear fractions were analyzed for β -catenin levels by immunoblotting with anti- β -catenin antibody. The membrane was reprobated with antibodies to the cytosolic β -tubulin and the nuclear lamin A proteins to assess the purity of the cytoplasmic and nuclear fractions respectively. The image is representative of two independent fractionation experiments. (C) Primary PBMC (MCL9) cells were treated or not for 1 hour with anti-IgM antibody (10 μ g/ml). Confocal microscopy revealed the different localizations of Alexa-488 stained β -catenin according to the treatment. Dapi was used to label the nuclei. A minimum of 20 cells was analyzed. (D) PBMC from MCL patients were treated or not with anti-IgM

(10µg/ml) (n=7) for 4 hours. Total RNA were extracted and real-time PCR quantification (qRT-PCR) of β-catenin target genes Axin2, MYC, cyclin D1 and LEF1 were analyzed. Data represent mean ± SEM of 2^{-ddCT} (n=4), normalized to the mRNA of the housekeeping genes HPRT1 or ABL. Significance was determined by Student's *t* test: *,*p*<0.05, **,*p*<0.005.

Figure 3. β-catenin acts as a transcriptional co-activator of NF-κB-dependent transcription.

(A) RT-qPCR. PBMC from MCL patients were pretreated or not with XAV939 (20µM) for 90min and BCR was stimulated or not with anti-IgM (10µg/ml) for 4 hours. Total RNA was extracted and qRT-PCR of NF-κB target genes MYC, IL6, IL8 and IL1 β was analyzed. Data represent mean ± SEM of 2^{-ddCT} , normalized to the mRNA of the housekeeping genes HPRT1 or ABL. Significance was determined by Student's *t* test or by Wilcoxon-signed rank test: **p*<0.05 (n=4). (B) Intracellular IL-6 detection. PBMC from 6 MCL patients were pretreated or not with XAV939 (20µM) for 90min and BCR was stimulated or not with anti-IgM (10µg/ml) for 15 hours. PMA, ionomycin and brefeldin A were added for the last 4 hours of stimulation. Intra cellular IL-6 was detected with specific PE labelled antibodies. The bars indicate the mean± SD. The gating strategy is illustrated in supplementary figure 3. Significance was determined by the Wilcoxon-signed rank test, **p*<0.05(C) Oligo pull-down assay in Granta-519 cell line (Left panel) and primary cells (Right panel). B-catenin and NF-κB(p65) were detected by specific mouse and rabbit antibodies respectively in the precipitate with NF-κB consensus DNA sequence. For the negative control (competitor) the same non-biotinylated sequence was added during the pull down. hnRNP-A1 was used as loading control. The image is representative of at least three independent pull-downs. (D) Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). Anti-IgM stimulated Granta cells were used to immunoprecipitate b-catenin by specific rabbit antibody (Diagenode) and primers specific for

the NF- κ B binding site on the IL-6 promoter were used to amplify the DNA in the precipitate. Primers to amplify a region around IL-6 ORF and 3'-UTR were used as negative controls. The fold enrichment was calculated as ratio of $2^{-\text{dCT}}$. The histogram represents the mean \pm SEM of 2 independent CHIP assays.

Figure 4. WNT16 is overexpressed in MCL and is involved in an autocrine positive feedback loop

(A) WNT16 RT-qPCR. Total RNA from 10 MCL patients, 4 normal B cells and 5 MCL cell lines (Rec, NTS3, Maver, Mino, Z138, Jeko) were extracted and qRT-PCR of WNT16 was performed. Data represent mean \pm SEM of 2 $-\text{ddCT}$, normalized to the mRNA of the housekeeping genes RPL37A. Significance was determined by Student's t test * $p < 0.05$. (B) Western blot for detection of Wnt16. Granta-519 cells were stimulated or not with anti-IgM (10 μ g/ml) for 15 hours and treated with BFA for the last 4 hours. Total protein extracts were analyzed by western-blotting with mouse anti-WNT16. Tubulin was used as loading control. The image is representative of 3 independent experiments. (C) Western blot of cell lysates of Granta-519 cells incubated for 6 hours with conditioned medium issued from 293T cells transfected with either an empty plasmid or a Wnt16B gene plasmid (Addgene). B-catenin and Wnt16 were detected with mouse and rabbit specific antibodies respectively. Tubulin was used as loading control. The image is representative of at least 3 independent transfections. (D) HEK293T and Granta-519 cells were transfected with a plasmid either empty or carrying the Wnt16B gene. After 24 hours, the level of β -catenin and Wnt16 was verified by western blot with specific antibodies in total cell extracts. The image is representative of three independent transfections.

Figure 5. Blocking interaction of β -catenin to NF- κ B consensus DNA sequence leads to apoptosis

(A) Pull-down assay with a biotinylated NF- κ B DNA consensus sequence in presence of PKF310-118. Cells were pre-treated or not with PKF310-118 prior to BCR stimulation and the lysate was subjected to oligo pull-down as previously described (Figure 3). The image and its quantification are representative of three independent pull-downs. (B) Apoptosis analysis of cells treated with PKF118-310. Spontaneous apoptosis (% of Annexin V and PI positive cells) was measured by flow cytometry on PBMC of the 7 leukemic MCL patients pre-treated or not with PKF 118-310 prior BCR stimulation with anti-IgM as previously described for 24 hours. Significance was determined by Student's t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Figure 1

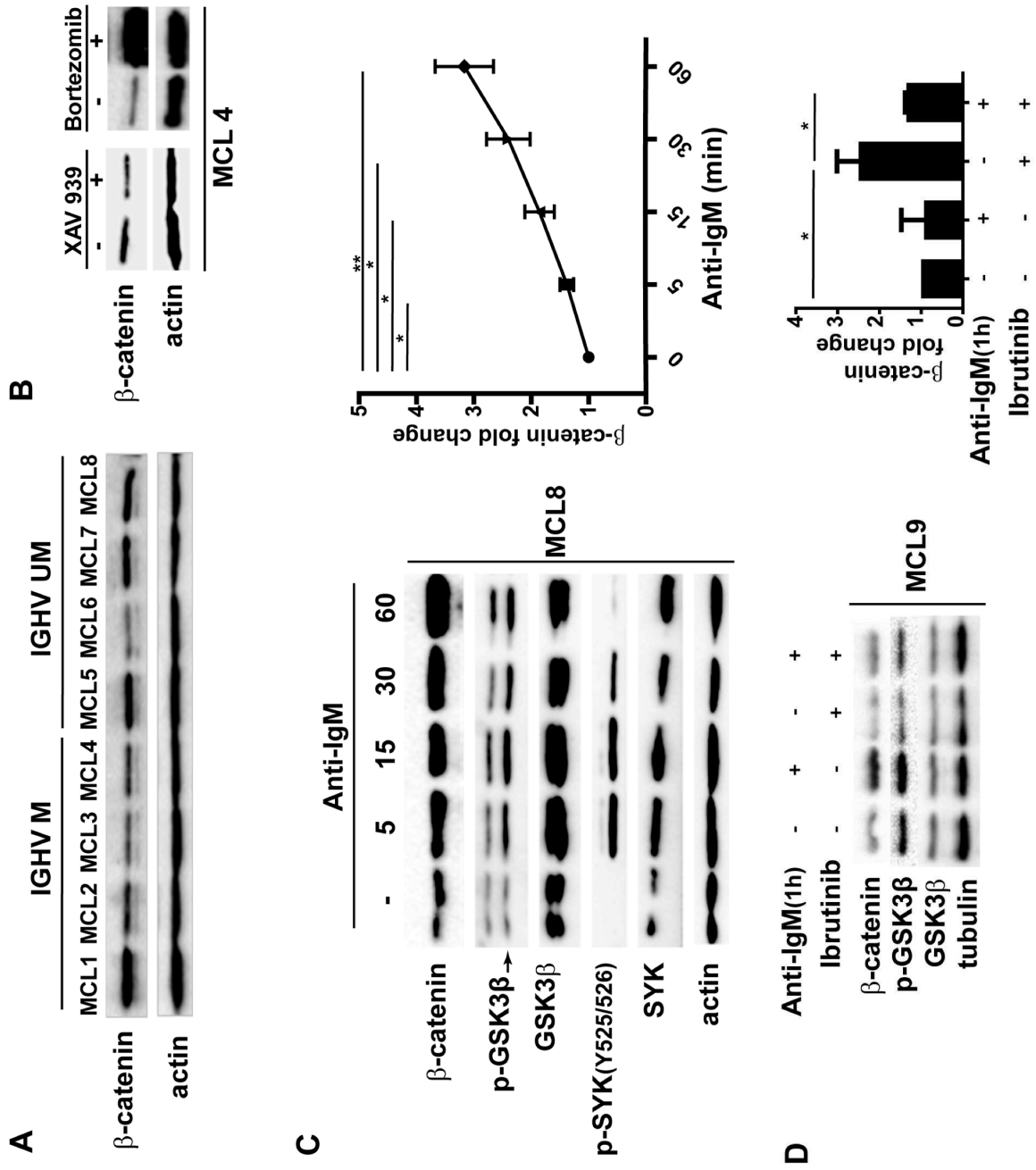


Figure 2

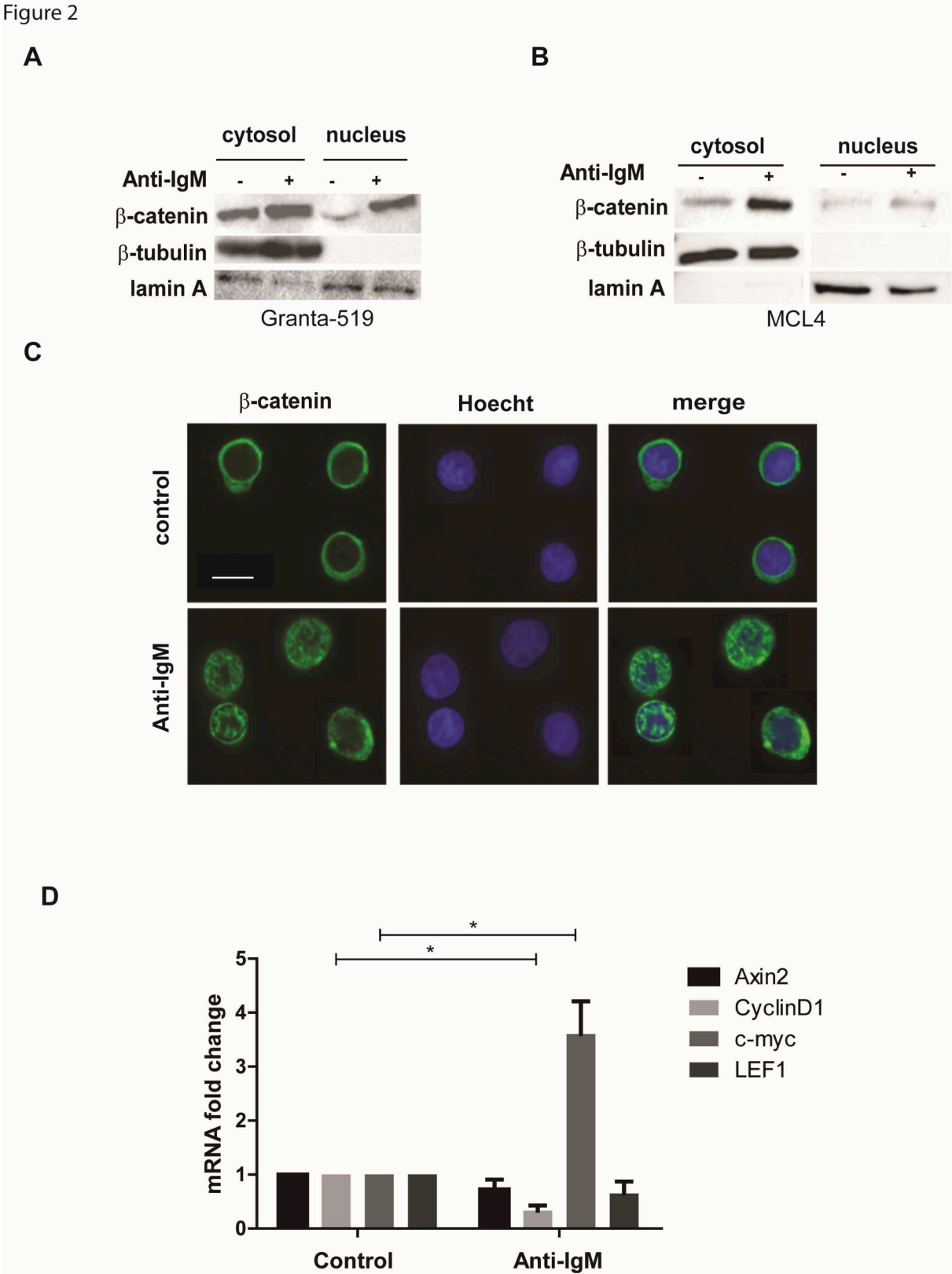


Figure 3

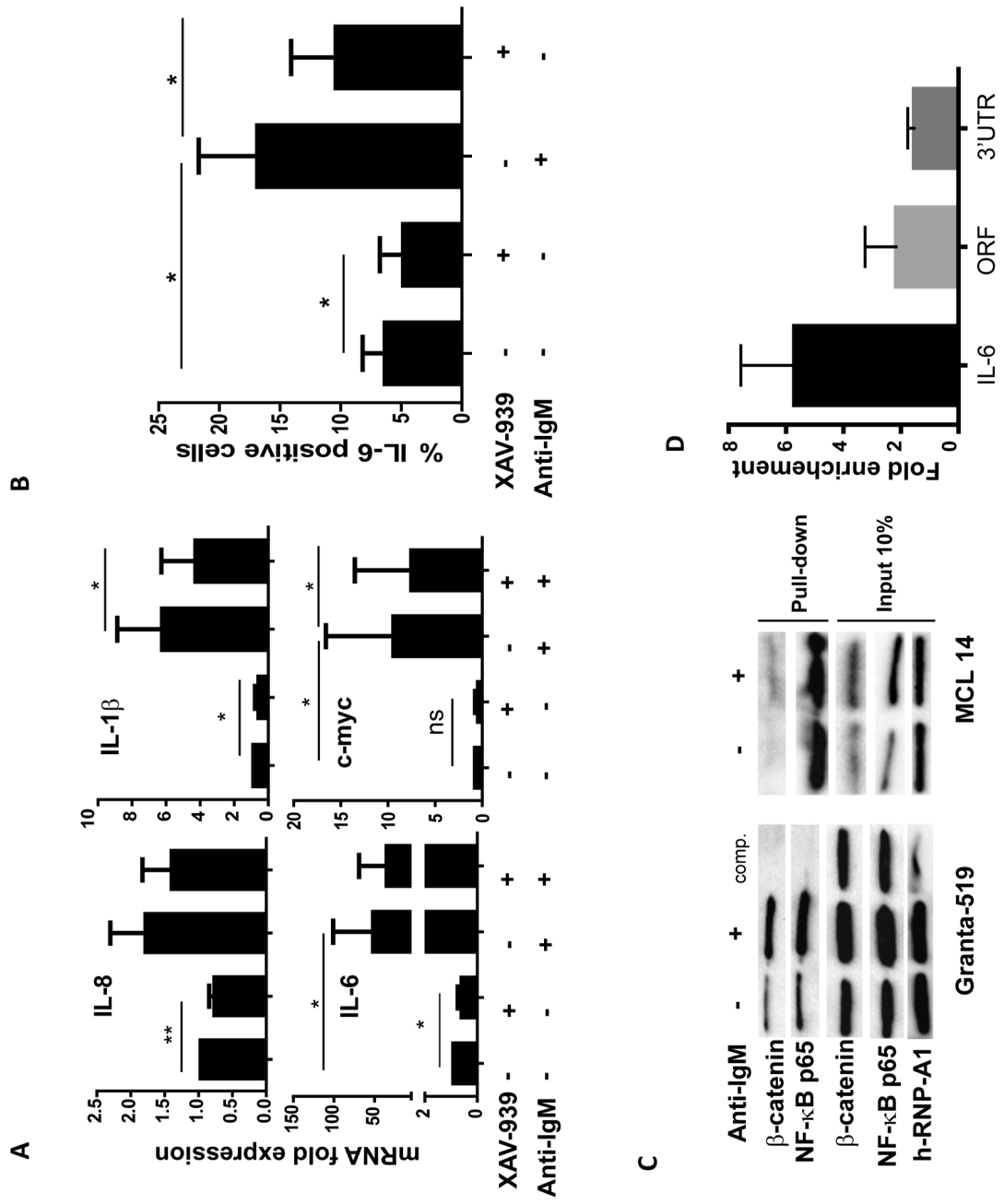


Figure 4

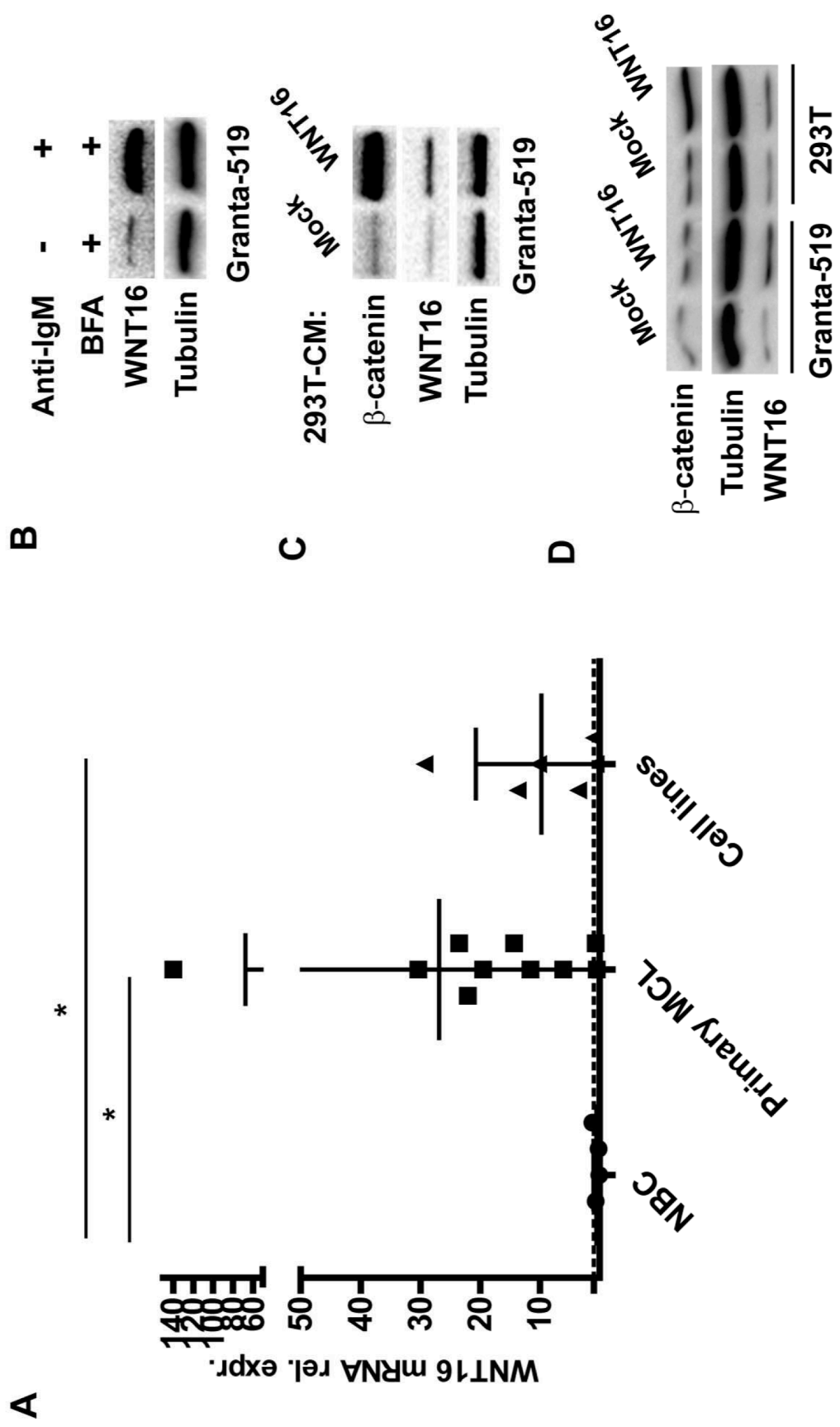
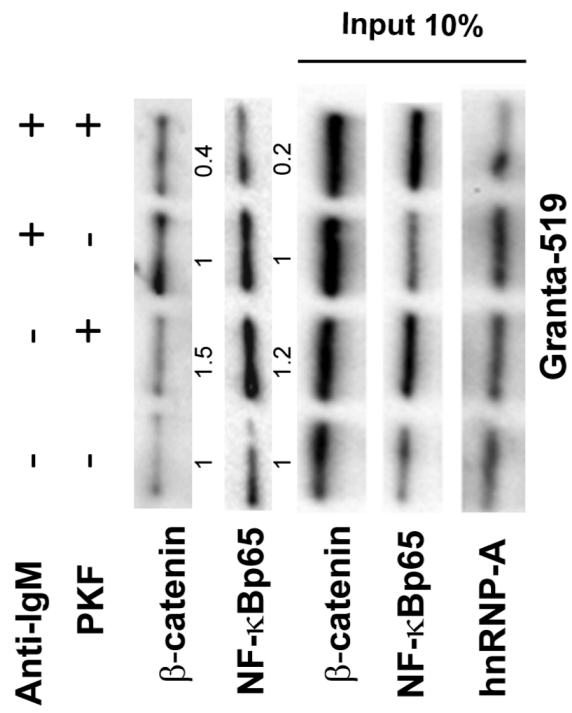
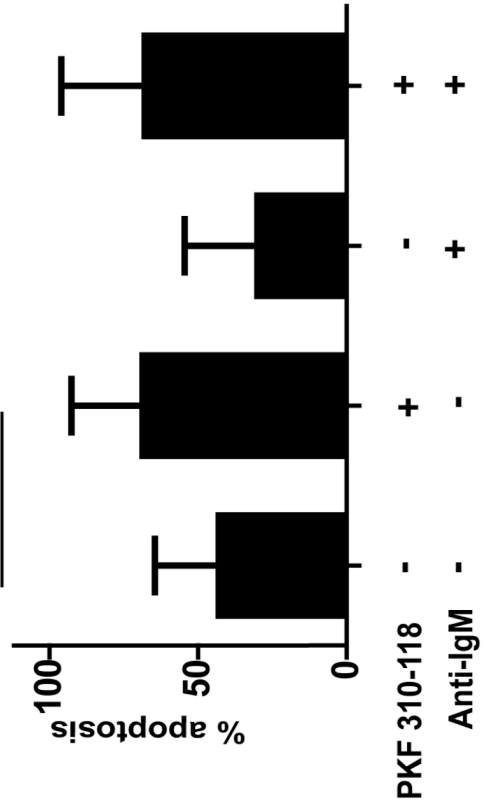


Figure 5

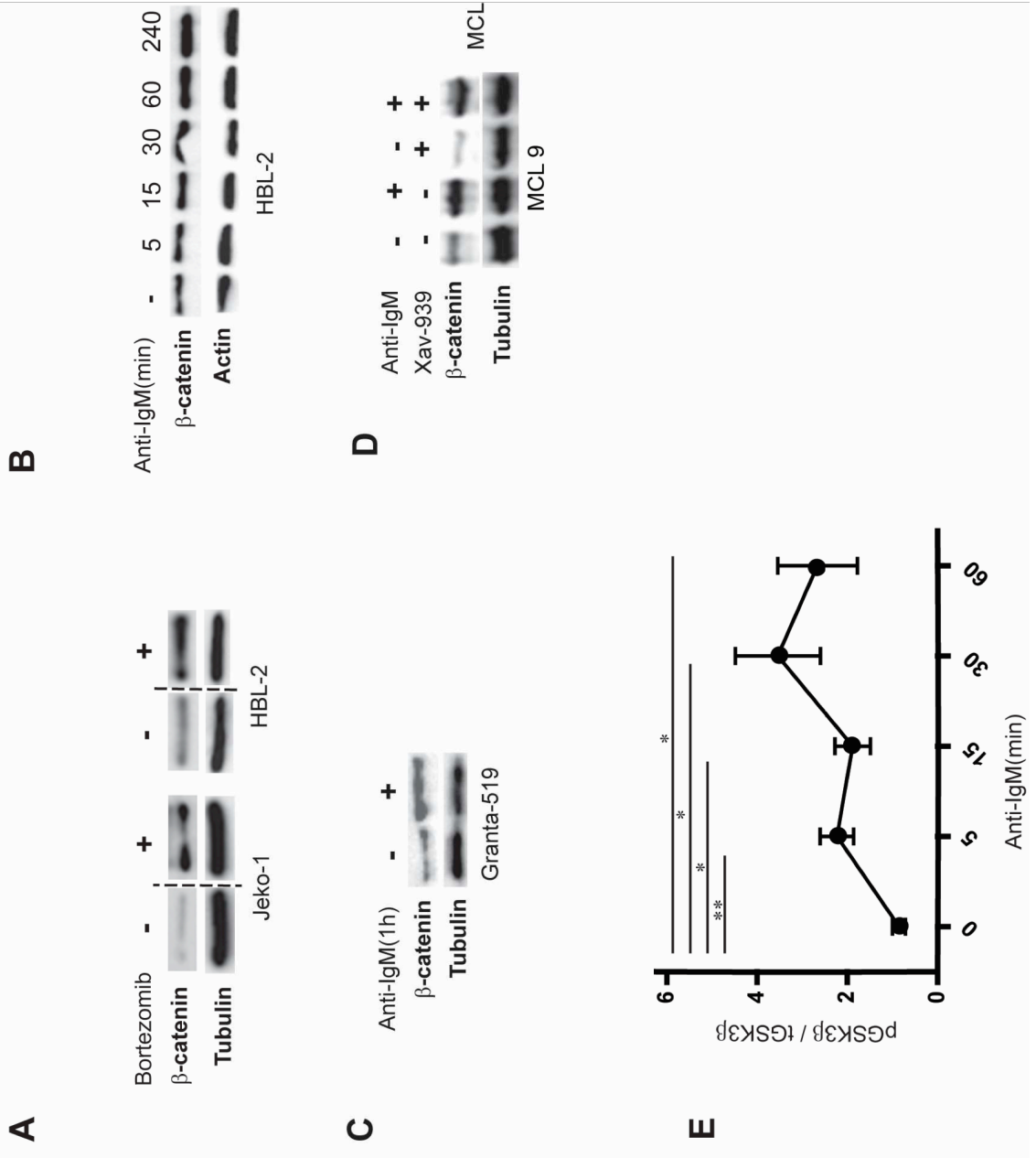
A



B

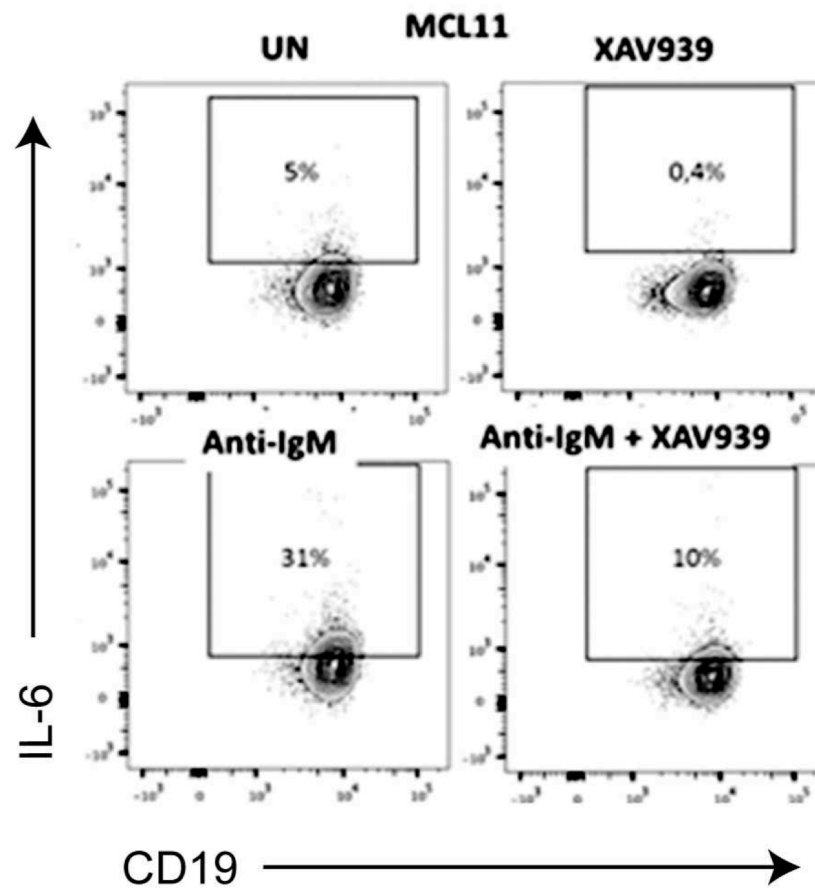


Supplementary Figure 1

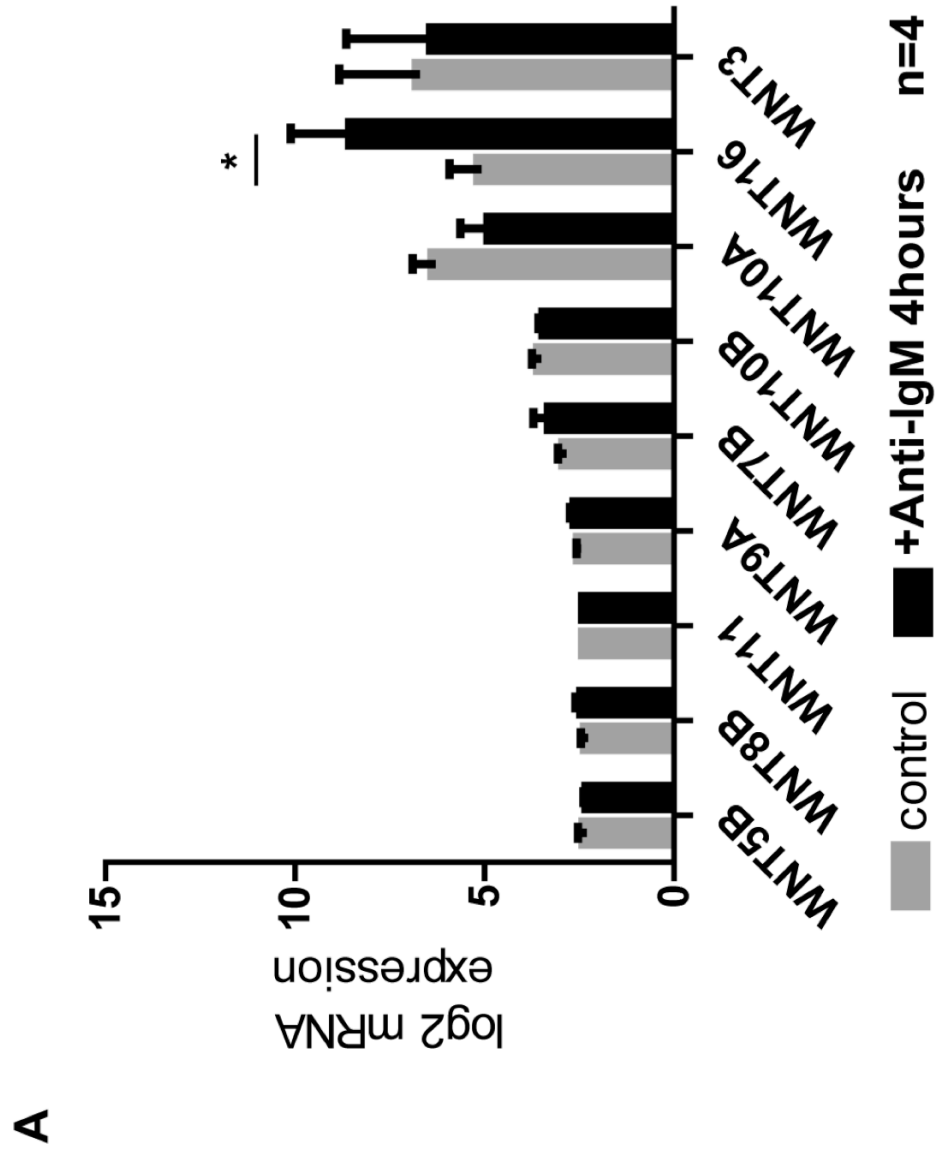


Supplementary Figure 2

A



Supplementary figure 3



Supplementary table 1

Expression of genes involved in the WNT canonical pathway in 4 MCL

Symbol	UN MCL18	UN MCL16	UN MCL 17	UN MCL 3	mean	SD
WNT1	/	/	/	/	/	
WNT2	/	/	/	/	/	
WNT4	/	/	/	/	/	
WNT5A	/	/	/	/	/	
WNT6	/	/	/	/	/	
FZD10	/	/	/	/	/	
FZD9	/	/	/	/	/	
WNT7A	/	/	/	/	/	
FZD4	/	/	/	/	/	
WNT9B	/	/	/	/	/	
WNT8A	/	2,3	/	/	/	
WNT2B	/	/	2,5	/	2,5	
WNT8B	2,3	2,7	2,3	2,3	2,4	0,2
WNT5B	2,3	2,8	2,3	2,4	2,4	0,2
WNT11	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	0
WNT9A	2,5	2,6	2,6	2,6	2,6	0
FZD2	2,8	2,3	/	2,3	2,4	0,3
FZD6	4,1	/	/	/	4,1	
FZD3	2,6	2,6	2,4	3,8	2,9	0,6
WNT7B	2,8	2,8	3,3	2,8	3	0,2
FZD7	5,1	/	2,8	2,3	3,4	1,5
WNT10B	3,4	4	3,4	3,7	3,6	0,3
FZD8	5,5	2,3	2,6	3	3,3	1,4
FZD1	4,3	4,8	4,3	4,3	4,4	0,2
WNT16	3	5,5	6,4	5,9	5,2	1,5
FZD5	6	4,3	2,8	5	4,5	1,3
WNT10A	7,9	6,2	5,7	5,9	6,4	1
WNT3	12,2	2,6	5,4	7,1	6,8	4
CCND1	12,5	8,1	8,4	9,3	9,6	2

Supplementary Table 2

Characteristics of MCL patients

UPN	Sex	Age	Lymphocytosis giga/L	%CD19+CD 5+	VH	DH	JH	Monotypic Kappa/Lambda	IGHV homology %	IGHV mutational status
1	F	63	10	67	VH4-34	DH2	JH5	lambda	94	M
2	M	77	660	96	VH3-33	DH6	JH4	kappa	95,1	M
3	M	69	70	80	VH3-9	DH1	JH4	kappa	95,5	M
4	M	69	31	90	VH1-18	DH3	JH4	kappa	93,5	M
5	M	85	17	73	VH5-51	DH3	JH4	kappa	98,9	UM
6	F	54	70	80	VH3-21	DH3	JH6	lambda	100	UM
7	F	63	28	94	VH1-18	DH3	JH4	lambda	99,2	UM
8	M	37	39	89	VH1-69	DH2	JH5	kappa	100	UM
9	M	74	51	90	VH3-64	DH6	JH6	lambda	100	UM
10	M	69	42	81	VH3-30	DH5	JH4	lambda	100	UM
11	M	63	15	91	VH3-23	DH2	JH6	kappa	99,6	UM
12	F	74	5	50	VH3-23	DH1	JH4	kappa	100	UM
13	F	77	172	99	VH3-74	DH5	JH4	kappa	96,6	M
14	M	59	21	87	VH3-11	DH5	JH6	kappa	100	UM
15	M	96	56	94	VH3-21	DH6	JH6	lambda	99,2	UM
16	M	56	50	90	VH4-4	DH2	JH6	kappa	94	M
17	M	77	37	88	VH1-8	DH6	JH5	kappa	98,9	UM
18	M	65	3		VH4-34	DH3	JH6	kappa	98,1	UM
19	M	58	9	87	VH4-34	DH6	JH5	lambda	99,6	UM
20	M	52	6	60	VH3-21	DH6	JH6	lambda	100	UM

Old DAT and new data: Positive direct antiglobulin test identifies a subgroup with poor outcome among chronic lymphocytic leukemia stage A patients

Anne Quinquenel,^{1,2,3} Chadi Al Nawakil,⁴ Fanny Baran-Marszak,^{2,3,5} Virginie Eclache,^{2,3,5} Remi Letestu,^{2,3,5} Mohammed Khalloufi,⁶ Marouane Boubaya,⁴ Christine Le Roy,^{2,3} Nadine Varin-Blank,^{2,3} Alain Delmer,¹ Vincent Levy,⁴ and Florence Ajchenbaum-Cymbalista^{2,3,5*}



Only a minority of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients harboring a positive direct antiglobulin test (DAT) will develop autoimmune hemolytic anemia (AIHA). In a single institution cohort of 378 CLL patients, 56 patients (14.8%) had at least one positive DAT during the course of the disease, either at diagnosis or later. We found no relationship between the time of the first positive DAT and overall survival (OS). However, patients with a positive DAT who did not develop AIHA had the same adverse outcome as patients who developed AIHA. Of the patients who were in Binet stage A at diagnosis, those with a positive DAT had a significantly shorter OS, regardless of their IGHV mutational status, however, there was a strong association with VH1-69. By multivariate analysis, a positive DAT was found to be an independent adverse prognostic factor for OS. Thus, DAT represents a strong adverse prognostic factor and its determination should be repeated during follow-up.

Am. J. Hematol. 90:E5–E8, 2015. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Introduction

Autoimmune cytopenia represent a well-known complication of chronic lymphocytic leukemia (CLL). The most frequent one is autoimmune hemolytic anemia (AIHA), occurring in about 5–15% of the patients during the course of the disease. An association between AIHA and adverse prognostic factors such as high B2-microglobulin, CD38 expression, 11q deletion, and unmutated IGHV status is clear, but the prognosis of CLL patients who develop AIHA has never been fully established through overall survival (OS) analyses [1–8]. Moreover, patients with AIHA are systematically excluded from clinical trials. Even if only a minority of patients who harbor a positive direct antiglobulin test (DAT) will develop clinically significant AIHA, prevalence and prognosis of positive DAT have not been thoroughly investigated. In a multicentric retrospective study, a positive DAT was found in 5.7% of the patients at diagnosis [9]. In the CLL4 trial from the British CLL study group, 14% of the patients presented with positive DAT at the time of first-line therapy initiation. In this prospective trial, in a selected population, a positive DAT at the time of first treatment was associated with poor outcome [10]. More recently, a retrospective study on a limited number of patients suggested that in previously untreated patients, a positive DAT could result in a shorter time to first treatment, even if no significant impact was found on OS [11]. The aim of this large, single institution study in a cohort of nonselected patients was to explore the clinical and biological characteristics and the outcomes of CLL patients who had a positive DAT at any time during the course of their disease (at diagnosis or later). We focused on patients who were in Binet stage A at diagnosis, who represent the large majority of the patients. We performed multivariate analyses with the other typical prognostic factors to determine if a positive DAT could represent a strong predictor for OS.

Methods

Patients. From January 2007 to July 2013, 378 CLL patients were followed at our institution. All cases were CD5+ CD23+ and harbored a RMH (Matutes) score ≥ 4 . Prognostic factors such as CD38 expression, Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis, and IGHV mutational status were available for all patients and were assessed as previously described [12]. All the patients with at least one positive DAT, either at diagnosis or later during the course of the disease were included in the study.

Direct antiglobulin test. A DAT was performed in all cases at diagnosis and regularly during follow-up, about once a year. A card method was used, with monospecific reagents for IgG and C3d. For patients with a C3d positive DAT, samples were systematically incubated at 37°C and tested again.

End points and statistical analysis. The treatment free survival (TFS) was defined by the interval from the diagnosis to the initiation of the first-line specific treatment or death. The OS was defined by the interval from the diagnosis to death. The observation time was set at the last follow-up date if no events occurred. Follow-up occurred until

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

¹CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Service d'Hématologie Clinique, Reims, France; ²INSERM U978, Bobigny, France; ³Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, "Adaptateurs de Signalisation en Hématologie," Labex "Inflamex," Unité de Formation et de Recherche Santé-Médecine-Biologie Humaine, Bobigny, France; ⁴Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Unité de Recherche Clinique, BOBIGNY, France; ⁵Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Service d'Hématologie Biologique, Bobigny, France; ⁶Etablissement Français du sang, Bobigny, France.

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interest.

***Correspondence to:** Pr Florence Ajchenbaum-Cymbalista; Hématologie Biologique, Hôpital Avicenne, 125 rue de Stalingrad, 93009 Bobigny Cedex, France.

E-mail: florence.cymbalista@avc.aphp.fr

Received for publication: 8 August 2014; **Revised:** 21 September 2014; **Accepted:** 24 September 2014

Am. J. Hematol. 90:E5–E8, 2015.

Published online: 27 September 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/ajh.23861

December 2013, when the survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method. The comparisons were based on the two-sided log-rank test. Significant predictive factors in the univariate analysis were analyzed by multivariate analysis using Cox modeling.

■ Results

Characteristics of the cohort

Among the 378 patients, 56 had at least one positive DAT during the observation period representing 14.8% of our cohort. DAT specificity was IgG in 37 cases (66%), IgG + C3d in 11 cases (20%), and C3d only in 8 cases (14%). No cold agglutinin disease was observed. In this DAT positive (DAT+) cohort, the median age at diagnosis was 66.4 years, with a sex ratio of 1.9. According to the Binet classification, 36 patients, representing 64% of the DAT+ cases were in stage A at diagnosis. A study of the usual prognostic parameters showed that in this DAT+ cohort, 76% of cases harbored unmutated IGHV, and CD38 was expressed in 64% of cases. Unfavorable cytogenetic alterations, that is, 11q deletion, trisomy 12, and 17p deletion were found in 15, 19, and 14% cases, respectively. The details of the patients' characteristics are summarized in Supporting Information Table 1.

Follow-up of the DAT+ patients

With a median follow-up of 91 months, the median OS of the DAT+ cohort is 85 months. During this period, 44 patients, representing 79% of the DAT+ cohort required specific treatment. The first line of treatment was initiated for CLL progression in 35 cases, for concomitant symptomatic AIHA in five cases, and for symptomatic AIHA without CLL progression in four patients. Only 20 of the 56 patients, representing 36% of the entire DAT+ cohort developed symptomatic AIHA. AIHA was concomitant to CLL diagnostic in four cases. In the other cases, AIHA occurred later during CLL

disease progression. No significant predictive factor of AIHA occurrence was found.

Characteristics of stage A patients

We then focused on the 36 DAT+ patients who were in Binet stage A at diagnosis and compared them with the 257 stage A patients with persistently negative DAT who were followed during the same period. No difference was found in terms of age at diagnosis and sex ratio. The following biological features were also assessed: lymphocyte count, CD38 expression, cytogenetic alterations by FISH; CD38 expression and IGHV mutational status. DAT positivity significantly correlated only with IGHV unmutated status ($p < 0.001$). When considering VH use, we found a high prevalence of VH 1–69 (30% vs. 8%, $p < 10^{-4}$), and a high percentage that belonged to a stereotyped subset (34%). These results are summarized in Table I.

Onset of positive DAT and AIHA occurrence in stage A patients

Among the 36 DAT+ stage A cases, DAT was positive from the time of diagnosis in 13 cases, while in 23 patients, it became positive later during the course of the disease. Twenty-two patients had a positive DAT before the initiation of any treatment, meaning that in nine cases, DAT was negative at diagnosis and became positive during CLL progression before the first treatment. Interestingly, there was no relationship between the time of the first positive DAT (at diagnosis or later) and OS (Fig. 1A). Only 11 patients representing 31% of the entire stage A DAT+ cohort developed symptomatic AIHA. Patients who did not develop AIHA had the same outcome as patients who developed AIHA (Fig. 1B).

Impact of DAT positivity on time to first treatment and OS in stage A patients

Among 36 stage A DAT+ patients, DAT was positive before treatment in 22 cases. For these 22 cases, TFS was significantly shorter than that of the DAT negative stage A patients (48 months vs. not reached, $p < 10^{-3}$, Fig. 2). Moreover, in our stage A patients cohort, positive DAT predicted significantly shorter OS (91 months vs. not reached, $p < 10^{-4}$, Fig. 3A). By univariate analysis, most classical biological factors were significant for OS as well: CD38 expression [HR = 3.8; CI 95% (1.9–7.5); $p = 10^{-4}$], β 2-microglobulin [HR 6.7; CI 95% (2.2–19.9); $p < 10^{-3}$], sTK level [HR 6.5; CI 95% (3.2–13.3); $p < 10^{-4}$], IGHV mutational status [HR 12.1; CI 95% (5–29.8); $p < 10^{-4}$], Zap 70 expression [HR 5.6; CI 95% (2.4–13.3); $p < 10^{-4}$], and 11q deletion by FISH [HR 6.43; CI 95% (2.9–14.4); $p < 10^{-4}$]. All these significant parameters by univariate analysis were subjected to multivariate analysis. Notably, only three factors were found to be independent predictors of OS by multivariate analysis: sTK > 10 [HR = 3.8; CI 95% (1.7–8.3); $p = 10^{-3}$], unmutated IGHV genes

TABLE I. Binet Stage A Patients' Characteristics

	DAT– stage A patients N = 257	DAT+ stage A patients N = 36	P
Age	66.4 (42–89)	66.4 (49–87)	0.69
Sex ratio	1.8 (35 M–19 F)	1.4 (21 M–15 F)	
Lymphocytes ($10^9/L$)	13.5 (3.3–194.7)	19.1 (5.5–177.6)	
CD38 expression	64/148 (42%)	18/36 (50%)	0.59
FISH			
Del11q	14/199 (7%)	4/28 (14%)	0.25
Tri12	35/192 (18%)	4/26 (15%)	1
Del17p	8/202 (4%)	3/29 (10%)	0.14
IGHV			
Unmutated	74/234 (32%)	26/34 (77%)	<0.001
VH1–69	19/245 (8%)	10/33 (30%)	<0.001

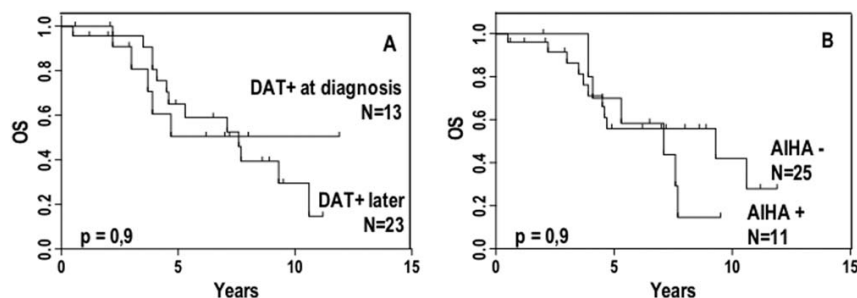


Figure 1. Impact of onset of DAT positivity and AIHA on OS in DAT+ stage A patients. A. Comparison of OS between stage A patients who had a positive DAT either at diagnosis or later. B. Comparison of OS between stage A patients who developed AIHA or not.

[HR = 5.5; CI 95% (1.9–15.6); $p = 10^{-3}$], and positive DAT [HR = 3.2; CI 95% (1.5–6.6); $p = 2.10^{-3}$] (Supporting Information Table 2).

Impact of DAT on OS in stage A patients with unmutated IGHV

As we found a significantly high prevalence of unmutated IGHV genes ($p < 10^{-4}$) among the DAT+ stage A cases, we wished to evaluate if this high prevalence was responsible for the adverse outcome of DAT+ stage A cases. Therefore, we assessed the impact of a positive DAT among stage A patients with unmutated IGHV genes. We compared DAT+ ($N = 26$) and DAT- ($N = 74$) stage A cases harboring unmutated IGHV genes. The OS remained significantly shorter in the DAT+ group (56.4 months vs. not reached, $p = 0.03$, Fig. 3B). In this stage A population that had an unfavorable prognosis, by multivariate analysis, only $sTK > 10$ [HR = 3.8; CI 95% (1.5–9.5); $p = 0.005$] and positive DAT [HR = 3.3; CI 95% (1.5–7.4); $p = 0.003$] were independent predictors of OS (Supporting Information Table 3).

Discussion

A correlation between CLL and AIHA is clear, but this autoimmune complication still raises several questions. The prognosis of CLL-associated AIHA is not clearly established, and therapeutic strategies in this particular context have been poorly studied. This is in part due to the systematic exclusion of patients presenting AIHA

from clinical trials, and the lack of clinical trials for this particular complication. In CLL patients, occurrence of autoimmune cytopenia has been associated with several adverse prognostic factors such as Zap70 expression and unmutated IGHV status [5,7,13], but AIHA has never been described as an independent prognostic factor in terms of OS. In a large retrospective study of 960 patients published by Moreno et al., no difference was found in terms of OS between the 70 patients who presented autoimmune cytopenia and those who did not [2]. Some authors also proposed to distinguish “autoimmune” stage C from “infiltrative” stage C, arguing that stage C CLL patients because of autoimmune cytopenia would have a better prognosis than patients considered as stage C because of bone marrow infiltration [2,3,14–16]. The present study demonstrates that even in the absence of cytopenia, autoimmunity confers a poor prognosis to CLL. Moreover, there is no clear consensus on the best therapeutic strategy for CLL-associated AIHA. For some authors, FCR (fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab) represents the standard of care of patients with AIHA and active CLL [17]. Two retrospective studies showed very good control of AIHA with a combination of rituximab, cyclophosphamide, and dexamethasone [18,19] but this regimen is not likely to provide long-term CLL control.

No consistent data are available on the prognosis of positive DAT by itself in CLL patients, especially in a nonselected CLL population. In our monocentric cohort of 378 patients, median age and sex ratio at diagnosis were similar to those expected in a standard population, and a large majority of patients were in Binet stage A. The prevalence of positive DAT (at diagnosis or later) and AIHA were 14 and 5%, respectively. In previous studies, the proportion of patients presenting with positive DAT ranged from 5.7 to 27.6% [9,10,20], and about 5% of the CLL cases developed active AIHA [1–3,6]. Our results are, therefore, concordant with these data. In a Chinese retrospective study on 124 CLL patients at diagnosis, DAT positivity was associated with advanced stage, elevated B2-microglobulin, trisomy 12, and unmutated IGHV. A positive DAT also correlated with shorter OS [20]. In another cohort of 146 untreated patients, a high level of B2-microglobulin emerged as significantly related to DAT positivity [11]. DAT positivity was associated with shorter time to first treatment, although no significant difference was found in OS. Our study also associates DAT positivity with adverse prognostic factors such as CD38 expression, 17p deletion, and IGHV; and DAT positivity occurring at diagnosis or later during the course of the disease is significantly associated with shorter OS.

The primary objective of this study was to focus on Binet stage A patients at diagnosis, who represent a vast majority of cases in daily practice and the population in need for predictive factors of disease progression, whereas, predictive factors of response to first-line therapy seem more appropriate for stage B and C patients. To our

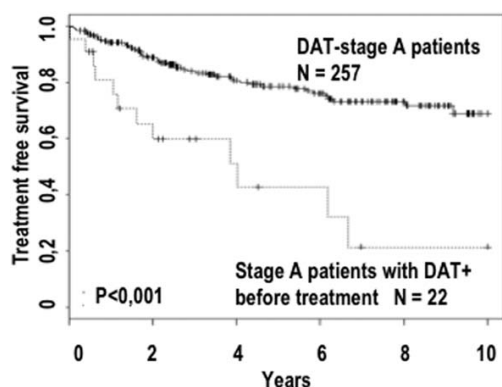


Figure 2. TFS of stage A patients with positive DAT before any treatment. Comparison of TFS between stage A patients with DAT+ before any treatment and DAT stage A patients.

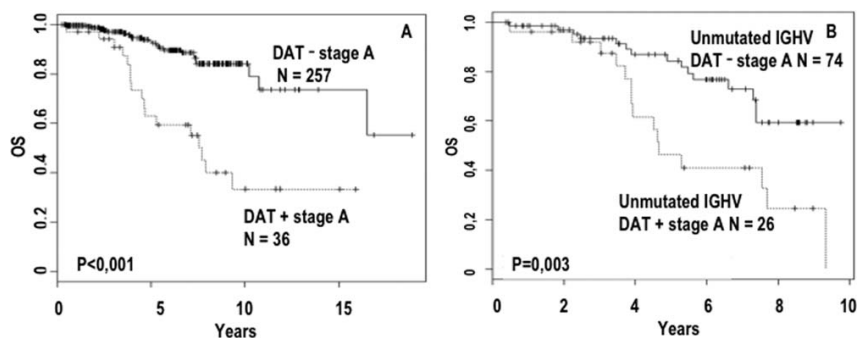


Figure 3. Impact of DAT positivity on overall in stage A patients. A. Comparison of OS between DAT+ and DAT- stage A patients. B. Comparison of OS between DAT+ and DAT- stage A patients with unmutated IGHV.

knowledge, our study is the first one to focus on stage A patients at diagnosis. In this population, DAT positivity clearly represents a poor prognostic factor, which seems independent from IGHV mutational status. In this population, the onset of first DAT positivity (at diagnostic or later) does not impact on OS, indicating that DAT needs to be repeated regularly during the follow-up. Occurrence of a positive DAT in patients with previously negative results should alert physicians.

Moreover, in our DAT+ stage A patients, patients who did not develop AIHA had the same adverse outcome as patients who did. This suggests that unfavorable prognosis may not be linked to therapeutic difficulties in this particular population but to intrinsic adverse characteristics of CLL. The mechanisms leading to autoimmune cytopenia in CLL are complex and involve the characteristics of both CLL clone and microenvironment. In most cases of CLL-associated AIHA, autoantibodies are produced by normal B-cells after stimulation by autoreactive T-cells [21]. Nevertheless, CLL cells play a major role by presenting erythroid antigens and inducing regulatory T-cell dysfunction [22–24]. In a recent study on 585 CLL patients, AIHA was associated with unmutated IGHV genes and unfavorable cytogenetic alterations (del 11q and del 17p). The authors also noted a high prevalence of stereotyped B-cell receptor (BCR) (29.6%), even if biased CDR3 did not seem to represent an independent predictive factor for

AIHA. IGHV1-69 was the most represented gene among AIHA patients (13.7%) [25]. In our cohort, we also found a high prevalence of unmutated IGHV, IGHV1-69, and stereotyped BCR. The increased incidence of DAT positivity in unmutated IGHV CLL patients might be related to the ability of the highly polyreactive BCR to recognize erythroid antigens and to present them to autoreactive normal T cells. The high prevalence of IGHV1-69 and the high proportion of biased CDR3 raise the question of the involvement of a specific antigen in the pathogenesis of CLL associated with autoimmunity.

In conclusion, our results clearly demonstrate that a positive DAT in stage A CLL patients is a strong independent adverse predictive factor, whether patients develop AIHA or not. The strong adverse prognostic impact on OS in stage A patients justifies the determination of DAT at the time of CLL diagnosis and during follow-up on a regular basis.

■ Author Contributions

A.Q. collected data and wrote the manuscript, C.A.N. collected data, F.B.M., V.E., R.L., and C.L.R. performed research, M.B. and V.L. performed statistical analysis, N.V., A.D., and F.C. designed research and wrote the manuscript.

■ References

- Mauro FR, Foa R, Cerretti R, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: Clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000;95:2786–2792.
- Moreno C, Hodgson K, Ferrer G, et al. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: Prevalence, clinical associations, and prognostic significance. *Blood* 2010;116:4771–4776.
- Zent CS, Ding W, Schwager SM, et al. The prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:615–621.
- Visco C, Novella E, Peotta E, et al. Autoimmune hemolytic anemia in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with IgVH status. *Haematologica* 2010;95:1230–1232.
- Zanotti R, Frattini F, Ghia P, et al. ZAP-70 expression is associated with increased risk of autoimmune cytopenias in CLL patients. *Am J Hematol* 2010;85:494–498.
- Barcellini W, Capalbo S, Agostinelli RM, et al. Relationship between autoimmune phenomena and disease stage and therapy in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006;91:1689–1692.
- Vanura K, Le T, Esterbauer H, et al. Autoimmune conditions and chronic infections in chronic lymphocytic leukemia patients at diagnosis are associated with unmutated IgVH genes. *Haematologica* 2008;93:1912–1916.
- Visco C, Barcellini W, Maura F, et al. Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, in press.
- Duek A, Shvidel L, Braester A, et al. Clinical and immunologic aspects of B chronic lymphocytic leukemia associated with autoimmune disorders. *Isr Med Assoc J* 2006;8:828–831.
- Dearnden C, Wade R, Else M, et al. The prognostic significance of a positive direct antiglobulin test in chronic lymphocytic leukemia: A beneficial effect of the combination of fludarabine and cyclophosphamide on the incidence of hemolytic anemia. *Blood* 2008;111:1820–1826.
- Ricci F, Tedeschi A, Vismara E, et al. Should a positive direct antiglobulin test be considered a prognostic predictor in chronic lymphocytic leukemia? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13:441–446.
- Letestu R, Levy V, Eclache V, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: The strength of routine parameters. *Blood* 2010;116:4588–4590.
- Visco C, Giaretta I, Ruggeri M, et al. Unmutated IgVH in chronic lymphocytic leukemia is associated with a higher risk of immune thrombocytopenia. *Leukemia* 2007;21:1092–1093.
- Manoharan A, Phadke KP, Pitney WR. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1980;1:592.
- Dearnden C. Stage C or not stage C...? *Blood* 2010;116:4735–4736.
- Visco C, Cortelezzi A, Moretta F, et al. Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia at disease presentation in the modern treatment era: Is stage C always stage C? *Leuk Lymphoma* 2014;55:1261–1265.
- Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood* 2010;115:187–197.
- Kaufman M, Limaye SA, Driscoll N, et al. A combination of rituximab, cyclophosphamide and dexamethasone effectively treats immune cytopenias of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2009;50:892–899.
- Rossignol J, Michallet AS, Oberic L, et al. Rituximab-cyclophosphamide-dexamethasone combination in the management of autoimmune cytopenias associated with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011;25:473–478.
- Xu W, Li JY, Miao KR, et al. The negative prognostic significance of positive direct antiglobulin test in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2009;50:1482–1487.
- Hamblin TJ. Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:230–239.
- Galletti J, Canones C, Morande P, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells bind and present the erythrocyte protein band 3: Possible role as initiators of autoimmune hemolytic anemia. *J Immunol* 2008;181:3674–3683.
- Hall AM, Vickers MA, McLeod E, et al. Rh autoantigen presentation to helper T cells in chronic lymphocytic leukemia by malignant B cells. *Blood* 2005;105:2007–2015.
- Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, et al. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: A systematic review. *Haematologica* 2011;96:752–761.
- Maura F, Visco C, Falisi E, et al. B-cell receptor configuration and adverse cytogenetics are associated with autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2013;88:32–36.



Bendamustine and rituximab combination in the management of chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune hemolytic anemia: A multicentric retrospective study of the French CLL intergroup (GCFLLC/MW and GOELAMS)



Anne Quinquenel,^{1,2} Christophe Willekens,³ Jehan Dupuis,⁴ Bruno Royer,⁵ Loïc Ysebaert,⁶ S. De Guibert,⁷ Anne-Sophie Michallet,⁸ Pierre Feugier,⁹ Romain Guieze,¹⁰ Vincent Levy,¹¹ and Alain Delmer^{1,2*}

We report our experience on bendamustine and rituximab (BR) combination in 26 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) complicated by autoimmune hemolytic anemia (AIHA). At the time of BR initiation, 88% of the patients had already been treated for AIHA and CLL was progressive regardless of AIHA in all patients but one. Overall response rates were 81% for AIHA and 77% for CLL. Median time to next treatment was 28.3 months and 26.2 months for AIHA and CLL, respectively. BR therapy may represent a good and safe therapeutic option in this setting where adequate control of CLL seems important for long-term AIHA response.

Am. J. Hematol. 90:204–207, 2015. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Introduction

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is a well-known complication of chronic lymphocytic leukemia (CLL), occurring in about 5–15% of the patients during the course of the disease [1,2]. There is no evidence-based strategy for the treatment of AIHA associated to CLL, especially in relapsed or resistant AIHA or when AIHA is associated with progressive CLL, because these patients are generally excluded from clinical trials. In most cases of CLL-associated AIHA, autoantibodies are produced by normal B-cells after stimulation by autoreactive T-cells. Nevertheless, CLL cells play a major role by presenting erythroid antigens and inducing regulatory T-cell dysfunction [3–5]. Therefore, it is hypothesized that an optimal control of CLL should lead to a longer response of AIHA. Safety and efficiency of fludarabine-containing regimens have been poorly studied in this setting. For some authors, fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR) represents the standard of care of patients with AIHA and active CLL [6]. Two retrospective studies also showed interesting results with a combination of rituximab, cyclophosphamide, and dexamethasone (RCD) [7,8] although this regimen is not likely to provide long-term CLL control. The combination of bendamustine and rituximab (BR) has demonstrated high response rates and is associated with a low toxicity profile in patients with progressive CLL, either in the relapse setting or in front line treatment [9,10]. The aim of this study was to retrospectively analyze the outcome of CLL patients suffering from AIHA and treated with BR combination.

Methods

Patients' selection. Between 2010 and 2013, 26 patients, from 9 French centers of the CLL Intergroup network, received a combination of BR for CLL-associated AIHA and were included in this retrospective study. All the patients met the IWCLL diagnostic criteria for CLL [11] and exhibited a positive direct antiglobulin test (DAT) with marked hemolysis signs. Six cycles of BR were planned at 4 week-intervals.

Response criteria. For AIHA, complete response (CR) was defined as proposed by Rossignol et al. [8] by the recovery of a hemoglobin level ≥ 120 g/L without transfusion requirement along with the disappearance of hemolysis signs (reticulocyte count $< 100 \times 10^9/L$ and normal lactate dehydrogenase (LDH)); partial response by hemoglobin level ≤ 120 g/L with a gain of at least 20 g/L as compared to baseline, with or without persistent hemolysis signs. DAT negativity was not required for the definition of CR. Patients

¹CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Service d'Hématologie Clinique, Rue du général Koenig, Reims F-51092, France; ²Université Reims Champagne Ardenne, UFR Médecine, 51 rue Cognac Jay, Reims F-51095, France; ³CHRU Lille, Hôpital Claude Huriez, Service d'Hématologie Clinique, rue Michel Polonovski, Lille F-59037, France; ⁴Hôpital Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Service d'Hématologie Clinique, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, CRETEIL F-94010, France; ⁵CHU Amiens, Hôpital Sud, Service d'Hématologie Clinique, Avenue René Laennec, AMIENS, F-80054, France; ⁶Département d'Hématologie, IUCT-Oncopole, 1 avenue Irène Joliot-Curie, Toulouse F-31059, France; ⁷CHU Rennes, Service d'Hématologie Clinique, 2 rue Henri Le Guilloux, Rennes F-35000, France; ⁸Centre Hospitalier Lyon Sud, Service d'Hématologie Clinique, 165 chemin du grand Revoyet, Pierre Benite, F-64095, France; ⁹CHU Nancy, Hôpital Brabois, rue du Morvan, Vandoeuvre les Nancy F-54511, France; ¹⁰CHU Estaing, Place Lucie et Raymond Aubrac, Clermont Ferrand, F-63100, France; ¹¹Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Unité de Recherche Clinique, 125 rue de Stalingrad, Bobigny F-93009, France

Conflict of interest disclosure: The authors declare no competing interest.

Contributions: A.Q. collected data and wrote the manuscript, C.W., B.R., J.D., L.Y., S.D.G., A.S.M., R.G., P.F. collected data, V.L. performed statistical analysis, A.D. designed research and wrote the manuscript.

***Correspondence to:** Pr. Alain Delmer; CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Service d'Hématologie Clinique, Rue du général Koenig, Reims F-51092, France. E-mail: adelmer@chu-reims.fr

Received for publication: 27 October 2014; **Revised:** 22 November 2014; **Accepted:** 24 November 2014

Am. J. Hematol. 90:204–207, 2015.

Published online: 26 November 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/ajh.23909

TABLE I. Characteristics of the Patients at the Time of BR Initiation

	N (%) or Median (min-max)
Age at BR initiation	71 (58–85)
Time from CLL diagnosis to BR (months)	90 (12–290)
Major prognostic factors	
CD38 expression	9/16 (56%)
11q deletion (FISH)	7/17 (41%)
17p deletion	1/18 (6%)
Unmutated IGHV	10/11 (91%)
Median pretreatment characteristics	
Hemoglobin (g/L)	88 (38–115)
Lymphocytes ($\times 10^9/L$)	52 (1–390)
Elevated LDH level	19/21 (90%)
Decreased haptoglobin level	14/20 (70%)
Elevated bilirubin level	22/26 (85%)
Positive DAT	26/26 (100%)
IgG /IgG + C3d/C3d (N = 25)	5/18/2
Progressive CLL	25/26 (96%)
Median previous therapeutic lines	3 (0–8)
Patients treated for CLL before onset of AIHA	14/26
Median previous lines for CLL	1 (0–5)
Fludarabine-based regimens	10
Patients already treated for AIHA before BR	21/26
Median previous lines for AIHA	1 (0–7)
Prolonged corticosteroids	15
RCD	14

were considered as partial responders for AIHA when some data were missing even though they had reached the required hemoglobin level for CR. Response to treatment for CLL by itself was assessed according to IWCLL criteria. Bone marrow biopsy was not routinely performed in patients meeting clinical and blood complete response criteria, thus these patients were stated as clinical complete responders.

End points and statistical analysis. The overall survival (OS) was defined by the interval from BR initiation to death. Treatment free survival was defined by the interval between the initiation of BR and the next line of therapy, either for AIHA or CLL, or death. Time point was October 2014, when the survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method.

Results

Patients' characteristics

Median age at the time of BR treatment was 71 years (range 58–85) and the M/F sex ratio was 2. When available, study of common prognostic factors revealed unmutated immunoglobulin heavy chain variable (IGHV) genes in 10/11 patients (91%) and 11q deletion by FISH in 7/17 patients (41%). Only one patient out of 18 tested (6%) had a 17p deletion by fluorescent in situ hybridization (FISH).

The median time from CLL diagnosis to BR initiation was 90 months (range 12–290). At the time of BR initiation, median hemoglobin level was 85 g/L (range 38–115) and median lymphocytosis was $52.10^9/L$ (range 1–390). Three of the 26 patients had signs of active hemolysis without marked anemia. Nearly all the patients (25/26, 96%) presented with active CLL disease requiring treatment by itself, regardless of AIHA. BR was the first treatment in only one patient, while all the others had already been treated either for CLL progression, autoimmune cytopenia or both. The median number of preceding lines was 3 (range 0–8). Ten patients, representing 38% of the cohort had previously received a fludarabine-based regimen, which had been initiated in all cases for CLL progression without active hemolysis, but never for active AIHA. Considering AIHA, BR was the first line of treatment of this immune complication in only three cases. All other patients (23/26, 88%) had already been treated for autoimmune cytopenia, that is, AIHA, autoimmune thrombocytopenia or both. Among these 23 patients, previous lines consisted of prolonged corticosteroid therapy in 15 cases (58%) and/or RCD in 14 cases (54%). The main characteristics of the patients are shown in Table I.

TABLE II. BR Therapy and Response Rates

	N (%) or Median (min-max)
Median number of BR cycles	6 (1–6)
Patients having received less than four cycles	9 (35%)
Bendamustine schedule	
70 mg/m ² D1 and D2	64%
>70 mg/m ² D1 and D2	36%
Prolonged corticosteroids association (>1 mg/kg/d for more than 4 weeks)	7 (27%)
AIHA response rates	
Overall response (CR + PR)	21 (81%)
Complete response (CR)	8 (31%)
CLL response rates	
Overall response (clinical CR + PR)	20 (77%)
Clinical complete response (clinical CR)	15 (58%)
Grade III-IV infections	5 (19%)

BR therapy

Bendamustine dose was 70 mg/m² at day one and two of each cycle in 64% of the cases, and 90 or 100 mg/m² at day one and two in the remaining patients. The dose of rituximab was 375 mg/m² at day one of the first cycle for all patients and it was subsequently raised to 500 mg/m² for the next cycles in 75% of them. All the patients received *pneumocystis jiroveci* and *varicella zoster virus/herpes virus* prophylaxes. Ten out of the 26 patients received primary G-CSF prophylaxis. High dose prednisone, that is, ≥ 1 mg/kg/day, was given during at least 4 weeks for initial control of hemolysis in seven patients (27%). Fifty-eight percent of patients received the six planned cycles of BR. Nine patients (35%) received less than four cycles because of treatment failure ($n = 4$), prolonged cytopenia ($n = 3$) and early death from uncontrolled hemolysis ($n = 1$) and from unknown cause ($n = 1$). A grade III or IV infection occurred in 19% of the patients during the whole treatment period. These data are summarized in Table II.

Responses and survivals

Overall response rates on AIHA and CLL were 81 and 77%, respectively. Considering AIHA, 8 patients, representing 31% of the cohort achieved CR. Among these eight patients, four had received prolonged corticosteroid therapy. In terms of CLL control, BR also led to clinical complete response in 58% of the cases. The median follow-up was 30.7 months with all patients having been followed for at least 1 year. Nine patients died during the follow up. The estimated median overall survival is 42.7 months (Fig. 1) and 80% of patients were alive at 12 months. Relapse of AIHA or onset of another autoimmune cytopenia occurred in 10 cases, and 4 patients needed a subsequent treatment for CLL progression without autoimmune cytopenia. The estimated treatment free survival was 28.3 months for AIHA and 26.2 months for CLL (Fig. 2). At 1 year, treatment free survivals for AIHA and for CLL were 72 and 64%, respectively. Among the 14 patients who had previously received RCD for CLL-associated AIHA, 12 have reached a sufficient length of follow-up to compare the respective outcomes after RCD and BR. In 8 of these 12 patients (75%), the duration of treatment free interval (for AIHA, CLL, or both) was longer after BR than it had been after RCD.

Discussion

The treatment approach of CLL patients with AIHA is still challenging. Very few data on CLL-associated AIHA are available, especially in relapsed AIHA [12]. We report herein the results of the combination of BR in a rather large series of 26 patients presenting

with AIHA associated to CLL. This combination appeared to be safe and allowed to achieve sustained control of both hemolysis and CLL. Nearly all of our patients had already received several lines of treatment either for progressive CLL, autoimmune cytopenia or both. As previously reported in CLL patients developing AIHA [13,14], they exhibited in most cases adverse prognostic factors, namely unmutated IGHV and 11q deletion.

BR therapy led to a prolonged control of AIHA in 80% of cases, although the complete response rate for AIHA was rather low. This might be explained by both the choice of stringent response criteria and the lack of complete data to properly evaluate CR for some patients in this retrospective study. Nevertheless 72% of the patients had not required subsequent therapy for AIHA at 1 year and the median time to next treatment was 28.3 months. Concerning CLL control, the results of BR in our cohort were similar to those previously reported in relapsed CLL with this combination at the same doses, that is, bendamustine 70 mg/m² on days 1 and 2 of each cycle [10]. No unexpected toxicity was observed.

To our knowledge, there are no consistent data on the efficiency of BR in CLL-associated AIHA. Only four patients with active hemolysis were included in the two published phase two studies evaluating BR

regimen in CLL, either in relapse or in front-line therapy. In all the cases, BR therapy allowed hemolysis control [9,10].

As with other drugs in CLL, such as fludarabine but also chlorambucil, there is some concern about the risk of bendamustine-induced immune hemolysis [15–17]. However, there were only two so-called “anecdotal transient hemolysis” among 162 patients treated with bendamustine alone [18] and none in the German experience of BR in 195 patients with untreated or relapsed CLL [9,10]. The forthcoming results of the CLL10 trial of the German CLL study group having compared FCR to BR in previously untreated CLL patients will provide further information on the risk of bendamustine-induced AIHA in a larger cohort [19].

In our cohort, the vast majority of AIHA relapses occurred along with CLL progression, indicating that suboptimal therapy for CLL could not be sufficient to keep AIHA in remission. Some authors have proposed the RCD regimen as a valuable treatment option for AIHA associated with progressive CLL [7,8]. Overall, our results with BR did not appear clearly superior to those published with this regimen. Nevertheless, it should be mentioned that our patients presented with more advanced disease and half of them had already received RCD. For patients having relapsed after RCD regimen, the duration of response for AIHA was longer after BR than it was after RCD in 75% of the evaluable cases. The use of fludarabine-containing modern immunochemotherapy regimens such as FCR has been poorly evaluated in the particular context of CLL-associated AIHA. FCR has been proposed as the standard treatment option in this setting at least for treatment-naïve patients as this combination is likely to provide the best long-term control of CLL [6]. However, there are only very few specific data on its safety and efficiency in CLL-associated AIHA [20]. Preliminary results from the CLL10 trial of the German CLL study group have shown that BR might challenge FCR in previously untreated patients, especially in older patients, emphasizing that BR combination is also able to induce long-term CLL control [19]. In the era of the new B-cell Receptor (BCR) inhibitors, the only available information so far is that ibrutinib does not appear to trigger AIHA [21] but the role of these agents in the management of CLL-associated AIHA remains to be evaluated.

Therefore, BR combination proved in our study to be efficient for the control of relapsed CLL-associated AIHA, even in patients previously treated with fludarabine-based regimens or RCD. It could certainly be considered as front line treatment for patients presenting with AIHA along with active CLL.

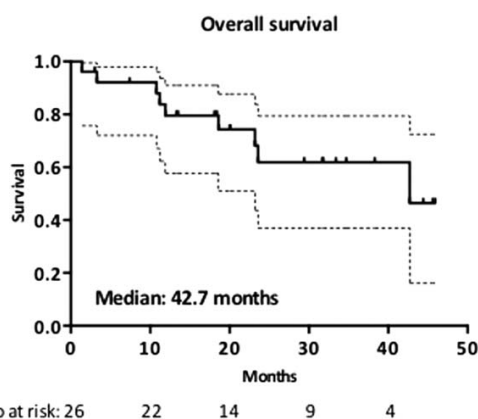


Figure 1. Overall survival from the time of BR initiation. The dotted lines represent the 95% confidence interval.

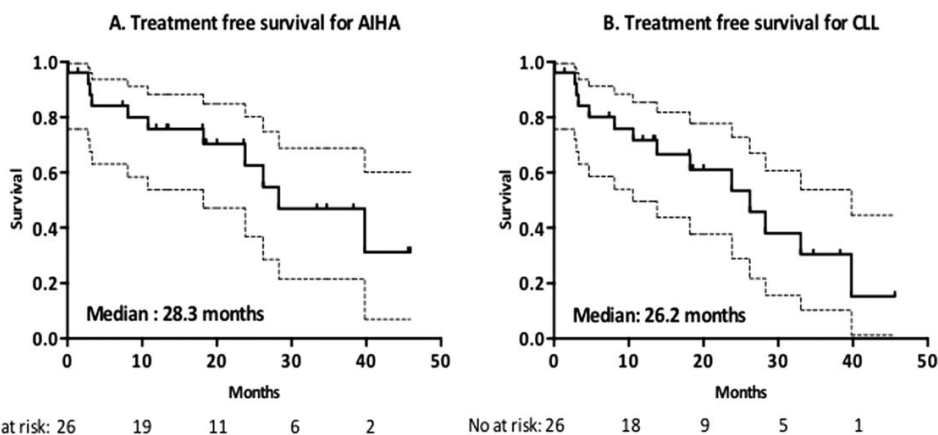


Figure 2. Represents the interval between BR initiation and the next line of therapy or death. (A) TFS for AIHA. (B) TFS for CLL. The dotted lines represent the 95% confidence interval.

References

1. Moreno C, Hodgson K, Ferrer G, et al. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: Prevalence, clinical associations, and prognostic significance. *Blood* 2010;116:4771–4776.
2. Zent CS, Ding W, Schwager SM, et al. The prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:615–621.
3. Galletti J, Canones C, Morande P, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells bind and present the erythrocyte protein band 3: Possible role as initiators of autoimmune hemolytic anemia. *J Immunol* 2008;181:3674–3683.
4. Hall AM, Vickers MA, McLeod E, et al. Rh autoantigen presentation to helper T cells in chronic lymphocytic leukemia by malignant B cells. *Blood* 2005;105:2007–2015.
5. Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, et al. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: A systematic review. *Haematologica* 2011;96:752–761.
6. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood* 2010;115:187–197.
7. Kaufman M, Limaye SA, Driscoll N, et al. A combination of rituximab, cyclophosphamide and dexamethasone effectively treats immune cytopenias of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2009;50:892–899.
8. Rossignol J, Michallet AS, Oberic L, et al. Rituximab-cyclophosphamide-dexamethasone combination in the management of autoimmune cytopenias associated with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011;25:473–478.
9. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2012;30:3209–3216.
10. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2011;29:3559–3566.
11. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446–5456.
12. Visco C, Barcellini W, Maura F, et al. Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2014;89:1055–1062.
13. Vanura K, Le T, Esterbauer H, et al. Autoimmune conditions and chronic infections in chronic lymphocytic leukemia patients at diagnosis are associated with unmutated IgVH genes. *Haematologica* 2008;93:1912–1916.
14. Visco C, Giaretta I, Ruggeri M, et al. Unmutated IgVH in chronic lymphocytic leukemia is associated with a higher risk of immune thrombocytopenia. *Leukemia* 2007;21:1092–1093.
15. Glance LE, Cumpston A, Kanate A, et al. Bendamustine-associated hemolytic anemia. *Ann Pharmacother* 2009;43:1903–1906.
16. Goldschmidt N, Gural A, Ben-Yehuda D, et al. Short communication: bendamustine-related hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;72:709–713.
17. Haddad H, Mohammad F, Dai Q. Bendamustine-induced immune hemolytic anemia in a chronic lymphocytic leukemia patient: A case report and review of the literature. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, in press.
18. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009;27:4378–4384.
19. Eichhorst B, Fink A-M, Busch R, et al. Chemotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) versus bendamustine and rituximab (BR) in previously untreated and physically fit patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL): Results of a planned interim analysis of the CLL10 trial, an International, Randomized Study Of The German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood* 2013;122:526.
20. Borthakur G, O'Brien S, Wierda WG, et al. Immune anaemias in patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab—Incidence and predictors. *Br J Haematol* 2007;136:800–805.
21. Rogers K, Woyach J, Andritsos L, et al. Incidence of autoimmune cytopenias (AIC) in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) patients (pts) treated with ibrutinib. *Blood*, Abstract 1997, ASH, December 2014.



¹Division of Hematology, Mayo Clinic, and ²Special Coagulation Laboratory, Division of Hematopathology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

E-mail: patnaik.mrinal@mayo.edu

Keywords: von Willebrand disease, von Willebrand factor, factor VIII, bleeding, genetics of thrombosis and haemostasis

First published online 11 March 2016

doi: 10.1111/bjh.14028

References

- Bowen, D.J., Standen, G.R., Mazurier, C., Gaucher, C., Cumming, A., Keeney, S. & Bidwell, J. (1998) Type 2N von Willebrand disease: rapid genetic diagnosis of G2811A (R854Q), C2696T (R816W), T2701A (H817Q) and G2823T (C858F) – detection of a novel candidate type 2N mutation: C2810T (R854W). *Thrombosis and Haemostasis*, **80**, 32–36.
- Casonato, A., Gaucher, C., Pontara, E., Zucchetto, A., Zerbinati, P., Mazurier, C. & Girolami, A. (1998) Type 2N von Willebrand disease due to Arg91Gln substitution and a cytosine deletion in exon 18 of the von Willebrand factor gene. *British Journal of Haematology*, **103**, 39–41.
- Favaloro, E.J. (2011) Interaction of factor VIII and von Willebrand factor and the identification of type 2N von Willebrand disease. *Thrombosis Research*, **127**, 2–3.
- Favaloro, E.J., Mohammed, S. & Koutts, J. (2009) Identification and prevalence of von Willebrand disease type 2N (Normandy) in Australia. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, **20**, 706–714.
- James, P.D. & Lillicrap, D. (2013) The molecular characterization of von Willebrand disease: good in parts. *British Journal of Haematology*, **161**, 166–176.
- Mazurier, C., Goudemand, J., Hilbert, L., Caron, C., Fressinaud, E. & Meyer, D. (2001) Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, **14**, 337–347.
- Nichols, W.L., Hultin, M.B., James, A.H., Manco-Johnson, M.J., Montgomery, R.R., Ortel, T.L., Rick, M.E., Sadler, J.E., Weinstein, M. & Yawn, B.P. (2008) von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, **14**, 171–232.
- Sadler, J.E. (2003) Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood*, **101**, 2089–2093.
- Schneppenheim, R., Budde, U., Krey, S., Drewke, E., Bergmann, F., Lechler, E., Oldenburg, J. & Schwaab, R. (1996) Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thrombosis and Haemostasis*, **76**, 598–602.
- Siguret, V., Lavergne, J.M., Cherel, G., Boyer-Neumann, C., Ribba, A.S., Bahnak, B.R., Meyer, D. & Pietu, G. (1994) A novel case of compound heterozygosity with “Normandy”/type I von Willebrand disease (vWD). Direct demonstration of the segregation of one allele with a defective expression at the mRNA level causing type I vWD. *Human Genetics*, **93**, 95–102.

Recovery of full donor chimerism with ibrutinib therapy in relapsed CLL after allogeneic stem cell transplantation

The prognosis of patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is highly variable, from a normal life span without any treatment to short survival after several lines of therapy. For eligible patients with high risk or refractory CLL, allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been considered as a standard option until recently. This paradigm is being challenged by the introduction of novel classes of drugs, such as the B-cell receptor (BCR) signalling inhibitors ibrutinib and idelalisib. These new drugs have shown impressive results in high risk or refractory CLL patients, even if the proportion of complete response and negative minimal residual disease are low (Byrd *et al*, 2014; Furman *et al*, 2014) and survival short after drug withdrawal (Maddocks *et al*, 2015). Thus, HSCT may remain an option in high-risk CLL, although new guidelines for high-risk CLL patients are needed (Dreger *et al*, 2014). Another concern is the outcome of patients after transplantation. Non-relapse mortality has significantly decreased over the last years, but disease relapse after transplantation, occurring in about 30%

of the patients at 5 years post-transplantation, remains a major problem. Mixed chimerism has been associated with treatment failure, and donor lymphocyte infusions (DLI) have been proposed to recover full donor chimerism (Richardson *et al*, 2013). More recently, a study demonstrated that most CLL patients relapsing after HSCT remained sensitive to salvage therapies (Rozovski *et al*, 2015), and novel agents seem of particular interest in this setting (Coutre *et al*, 2014).

We report herein the case of a CLL patient who relapsed after HSCT and was subsequently treated with ibrutinib for more than 1 year. Not only did ibrutinib induce a complete response but it also allowed the recovery of full donor chimerism, which had been lost at the time of relapse.

A 44-year-old man was diagnosed in 2000 with asymptomatic Binet stage A CLL. At the time of diagnosis, his white blood cell (WBC) count was $18 \times 10^9/l$ with 80% CD19/CD5 positive kappa-restricted lymphocytes, Royal Marsden Hospital score 5. Haemoglobin and platelet count were normal.

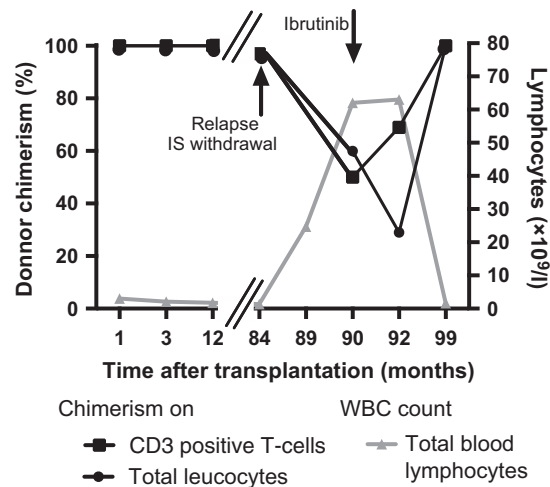


Fig 1. Evolution of chimerism. Evaluation of chimerism was assessed by quantitative polymerase chain reaction amplification of microsatellites on total leucocytes and CD3 positive T-cells. Relapse was diagnosed at 84 months after transplantation, and immunosuppression (IS) was withdrawn. Ibrutinib was started at 90 months after transplantation. Recurrence of chronic graft-versus-host disease along with the recovery of full donor chimerism occurred at 99 months after transplantation.

There was no lymphadenopathy and no treatment was initiated. The disease progressed in 2005 with peripheral lymphadenopathies, bulky retroperitoneal mass and marked splenomegaly. WBC count was $120 \times 10^9/L$ with 92% lymphocytes, while haemoglobin level and platelet count remained normal. Immunoglobulin heavy chain variable (*IGHV*) genes were unmutated and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis revealed a 17p deletion in 94% of interphase nuclei. He received two courses of FCCam (fludarabine, cyclophosphamide, alemtuzumab) and was subsequently switched to high-dose methylprednisolone because of insufficient response and immune thrombocytopenia. A partial response was reached. Allogeneic HSCT from a sibling donor was performed in January 2007, after a reduced intensity conditioning with rituximab, fludarabine and 2 Gy total body irradiation. Quantitative analysis of chimerism by polymerase chain reaction amplification of microsatellites was regularly assessed on blood total leucocytes and CD3 positive T-cells. Shortly after transplantation, the patient was in complete response and had achieved a full donor chimerism. He developed a limited chronic oral graft-versus-host disease (GvHD), which was controlled by prolonged immunosuppressive therapy with both mycophenolic acid and low-dose corticosteroids. In January 2014, seven years after transplantation, the patient complained of fatigue and abdominal pain. Computerized tomography (CT) scan showed massive mesenteric and retroperitoneal lymphadenopathies (13 cm \times 6 cm). There was no sign of chronic GvHD and immunosuppressive agents were withdrawn. At this time, lymphocyte count was normal and lym-

phocytosis recurred a few weeks later. Evaluation of chimerism showed a loss of full donor chimerism. Richter transformation was ruled out on the basis of clinical, biological and scintigraphic features. Treatment with ibrutinib was delayed until July 2014 due to the occurrence of pneumocystosis. A CT scan, performed in July 2014 prior to starting ibrutinib, showed an increase of the abdominal nodal mass (17 \times 10 cm). At the same time, the lymphocyte count increased to $62 \times 10^9/l$ with a lymphocyte doubling time of 1 month. Cytogenetics revealed a complex karyotype with add(3), del(3), -5, del(5), add(17p) and add(19). *TP53* deletion was still present by FISH. Abdominal pain resolved rapidly and the lymphocyte count transiently increased before it decreased. Treatment was well tolerated. After 9 months of therapy, a partial response was achieved with normal blood counts (lymphocytes $1.6 \times 10^9/l$) and a 60% reduction of lymph nodes size. Limited labial chronic GvHD reappeared, requiring topical corticosteroids. At the same time, we observed a recovery of full donor chimerism, on both total leucocytes and CD3 positive T-cells (Fig 1). After 15 months of follow-up, the patient is still on ibrutinib therapy and has now reached complete response but with detectable minimal residual disease in the blood. Chronic GvHD is still limited to oral mucosa.

Our observation suggests that ibrutinib is not only highly effective on CLL cells but might also have the ability to enhance the activity of donor T cells in the context of relapse after HSCT. Of note, the patient remained off therapy for 6 months when he developed infectious complications between terminating immunosuppressive treatment and starting ibrutinib, suggesting that stopping immunosuppression by itself was not helpful to control the disease. Ibrutinib was thus able to restore a full donor chimerism concomitantly with the appearance of moderate GvHD, directly related with the graft-versus-leukaemia effect. Previous studies demonstrated that ibrutinib also inhibited Interleukin-2 inducible T cell kinase (ITK), another member of the TEC family of kinases, and was able to target Th2 CD4 T-cells and drive a Th1 selective pressure on T-cell lymphocytes (Dubovsky *et al*, 2013, 2014). Complete responses are not frequent during ibrutinib therapy, particularly for patients with complex karyotype (Thompson *et al*, 2015). This emphasizes the importance of the recovery of an efficient donor-mediated anti-tumoural immunity. These data provide a rationale for further studies of ibrutinib in the particular setting of CLL patients relapsing after allogeneic HSCT, not only for its anti-tumoural effect, but also to stimulate donor T cells which, to the best of our knowledge, has never been yet reported. Further studies are needed to better understand the underlying biological mechanisms of these observations.

Authorship contributions

Conception and design: AQ, GS, AD, RPL. Provision of study material and patient: AQ, ED, GS, AD, RPL. Data collection and assembly: AQ, FS, GS, AD, RPL. Data analysis

and interpretation: AQ, MP, GS, AD, RPL. Manuscript: AQ, GS, AD, RPL. Final approval of manuscript: AQ, FS, ED, MP, DM, GS, AD, RPL.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no competing conflicts of interest.

Anne Quinquenel^{1,2,3}

Flore Sicre de Fontbrune⁴

Eric Durot^{1,5}

Mélanie Pannetier⁶

David Michonneau⁴

Gérard Socié^{4,7,8}

Alain Delmer^{1,5}

Régis Peffault De Latour^{4,7,8}

¹Hôpital Robert Debré, Service d'Hématologie Clinique, CHU Reims, Reims, ²INSERM U978, Bobigny, ³Sorbonne Paris Cité, "Adaptateurs de Signalisation en Hématologie," Labex "Inflamex," UFR SMBH, Université Paris 13, Bobigny, ⁴Service d'Hématologie Greffe, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Louis, Paris, ⁵Université Reims Champagne Ardenne, ⁶Hôpital Robert Debré, Laboratoire d'Hématologie, CHU Reims, Reims, ⁷Université Paris Diderot, and ⁸INSERM U1160, Paris, France.
E-mail: aquinquenel@chu-reims.fr

Keywords: CLL, allogeneic stem cell transplantation, chimerism, ibrutinib

First published online 15 March 2016

doi: 10.1111/bjh.14029

References

- Byrd, J.C., Brown, J.R., O'Brien, S., Barrientos, J.C., Kay, N.E., Reddy, N.M., Coutre, S., Tam, C.S., Mulligan, S.P., Jaeger, U., Devereux, S., Barr, P.M., Furman, R.R., Kipps, T.J., Cymbalista, F., Pocock, C., Thornton, P., Caligaris-Cappio, F., Robak, T., Delgado, J., Schuster, S.J., Montillo, M., Schuh, A., de Vos, S., Gill, D., Bloor, A., Dearden, C., Moreno, C., Jones, J.J., Chu, A.D., Fardis, M., McGreiv, J., Clow, F., James, D.F. & Hillmen, P. (2014) Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **371**, 213–223.
- Coutre, S., Brien, S., Byrd, J.C., Hillmen, P., Brown, J.R., Dyer, M.J.S., Mato, A.R., Miklos, D.B., Keating, M., Zhou, C., Fardis, M., Styles, L. & Jaglowski, S. (2014) Safety and efficacy of ibrutinib in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma who have undergone prior allogeneic stem cell transplant. *Blood*, **124**, 4697–4697.
- Dreger, P., Schetelig, J., Andersen, N., Corradini, P., van Gelder, M., Gribben, J., Kimby, E., Michallet, M., Moreno, C., Stilgenbauer, S. & Montserrat, E. (2014) Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood*, **124**, 3841–3849.
- Dubovsky, J.A., Beckwith, K.A., Natarajan, G., Woyach, J.A., Jaglowski, S., Zhong, Y., Hessler, J.D., Liu, T.M., Chang, B.Y., Larkin, K.M., Stefanovski, M.R., Chappell, D.L., Frizzera, F.W., Smith, L.L., Smucker, K.A., Flynn, J.M., Jones, J.A., Andritsos, L.A., Maddocks, K., Lehman, A.M., Furman, R., Sharman, J., Mishra, A., Caligiuri, M.A., Satoskar, A.R., Buggy, J.J., Muthusamy, N., Johnson, A.J. & Byrd, J.C. (2013) Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. *Blood*, **122**, 2539–2549.
- Dubovsky, J.A., Flynn, R., Du, J., Harrington, B.K., Zhong, Y., Kaffenberger, B., Yang, C., Towns, W.H., Lehman, A., Johnson, A.J., Muthusamy, N., Devine, S.M., Jaglowski, S., Serody, J.S., Murphy, W.J., Munn, D.H., Luznik, L., Hill, G.R., Wong, H.K., MacDonald, K.K., Maillard, I., Koreth, J., Elias, L., Cutler, C., Soiffer, R.J., Antin, J.H., Ritz, J., Panoskaltis-Mortari, A., Byrd, J.C. & Blazar, B.R. (2014) Ibrutinib treatment ameliorates murine chronic graft-versus-host disease. *The Journal of Clinical Investigation*, **124**, 4867–4876.
- Furman, R.R., Sharman, J.P., Coutre, S.E., Cheson, B.D., Pagel, J.M., Hillmen, P., Barrientos, J.C., Zelenetz, A.D., Kipps, T.J., Flinn, I., Ghia, P., Eradat, H., Ervin, T., Lamanna, N., Coiffier, B., Pettitt, A.R., Ma, S., Stilgenbauer, S., Cramer, P., Aiello, M., Johnson, D.M., Miller, L.L., Li, D., Jahn, T.M., Dansey, R.D., Hallek, M. & O'Brien, S.M. (2014) Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **370**, 997–1007.
- Maddocks, K.J., Ruppert, A.S., Lozanski, G., Heerema, N.A., Zhao, W., Abruzzo, L., Lozanski, A., Davis, M., Gordon, A., Smith, L.L., Mantel, R., Jones, J.A., Flynn, J.M., Jaglowski, S.M., Andritsos, L.A., Awan, F., Blum, K.A., Grever, M.R., Johnson, A.J., Byrd, J.C. & Woyach, J.A. (2015) Etiology of ibrutinib therapy discontinuation and outcomes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *JAMA Oncology*, **1**, 80–87.
- Richardson, S.E., Khan, I., Rawstron, A., Sudak, J., Edwards, N., Verfuert, S., Fielding, A.K., Goldstone, A., Kottaridis, P., Morris, E., Benjamin, R., Peggs, K.S., Thomson, K.J., Vandenberghe, E., Mackinnon, S. & Chakraverty, R. (2013) Risk-stratified adoptive cellular therapy following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for advanced chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, **160**, 640–648.
- Rozovski, U., Benjamini, O., Jain, P., Thompson, P.A., Wierda, W.G., O'Brien, S., Burger, J.A., Ferrajoli, A., Faderl, S., Shpall, E., Hosing, C., Khouri, I.F., Champlin, R., Keating, M.J. & Estrov, Z. (2015) Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia and Richter's transformation after transplantation failure. *The Journal of Clinical Oncology*, **33**, 1557–1563.
- Thompson, P.A., O'Brien, S.M., Wierda, W.G., Ferrajoli, A., Stingo, F., Smith, S.C., Burger, J.A., Estrov, Z., Jain, N., Kantarjian, H.M. & Keating, M.J. (2015) Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*, **121**, 3612–3621.

- patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30(21):2670–2677.
- [5] Dombret H, Seymour JF, Butrym A, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. 2015;126(3):291–299.
- [6] Walter RB, Appelbaum FR, Tallman MS, et al. Shortcomings in the clinical evaluation of new drugs: acute myeloid leukemia as paradigm. *Blood*. 2010;116(14):2420–2428.
- [7] Mandrekar SJ, Dahlberg SE, Simon R. Improving clinical trial efficiency: thinking outside the box. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015;35:e141–e147.
- [8] Berry DA. Emerging innovations in clinical trial design. *Clin Pharmacol Ther*. 2016;99(1):82–91.
- [9] Ventz S, Alexander BM, Parmigiani G, et al. Designing clinical trials that accept new arms: an example in metastatic breast cancer. *JCO*. 2017;35:3160–3168.
- [10] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–2405.
- [11] Burnett AK, Russell NH, Hunter AE, et al. Clofarabine doubles the response rate in older patients with acute myeloid leukemia but does not improve survival. *Blood*. 2013;122(8):1384–1394.
- [12] Burnett AK, Hills RK, Hunter AE, et al. The addition of gemtuzumab ozogamicin to low-dose Ara-C improves remission rate but does not significantly prolong survival in older patients with acute myeloid leukaemia: results from the LRF AML14 and NCRI AML16 pick-a-winner comparison. *Leukemia*. 2013;27(1):75–81.
- [13] Schlenk RF, Döhner H, Döhner K, et al. Event-free survival is a surrogate for overall survival in patients treated for acute myeloid leukemia [abstract]. *Blood*. 2015;126:3744.
- [14] Othus M, van Putten W, Löwenberg B, et al. Relationship between event-free survival and overall survival in acute myeloid leukemia: a report from SWOG, HOVON/SAKK, and MRC/NCRI. *Haematologica*. 2016;101(7):e284–e286.

Received: 14 November 2017 | Accepted: 16 November 2017

DOI 10.1002/ajh.24981

Outcome of chronic lymphocytic leukemia patients who switched from either ibrutinib or idelalisib to alternate kinase inhibitor: A retrospective study of the French innovative leukemia organization (FILO)

To the Editor:

Novel drugs targeting B cell receptor (BCR) signaling, such as ibrutinib and idelalisib, have dramatically changed the outcome of patients with

chronic lymphocytic leukemia (CLL), especially those with high-risk features. However, data from both clinical trials and “real life” studies show that a large proportion of patients has to withdraw therapy. In the phase 3 Resonate trial comparing ibrutinib to ofatumumab in patients with relapsed or refractory CLL, 26% of patients had discontinued ibrutinib after a median follow-up of 19 months.¹ In the updated results of a phase 3 comparing idelalisib in combination with ofatumumab to ofatumumab as a single agent, only 29% of patients were still on therapy with a median follow-up of 16.1 months.² For patients having discontinued a first kinase inhibitor (KI), subsequent therapy with the alternative KI may represent a valuable option. Only few data are currently available on the efficacy and safety of a second KI in this setting.^{3,4} The aim of our multicentric retrospective study was to evaluate whether an alternative KI would represent a valuable option after first KI discontinuation, and if the reason for first KI discontinuation should impact the choice of subsequent treatment. Between June 2015 and February 2017, we collected the data of 48 CLL patients followed in 16 FILO centers who were successively treated with ibrutinib and idelalisib. The procedure was conducted in accordance with the declaration of Helsinki.

The first KI was ibrutinib for 29 patients and idelalisib for 19 patients. Median age was 71 years. Most patients had previously been heavily treated. Study of common prognostic factors revealed unmutated immunoglobulin heavy chain variable (IGHV) genes in 24/27 patients (89%), 17p deletion as assessed by FISH in 19/46 patients (41%) and complex karyotype in 7/46 (15%) (Supporting Information Table S1).

The overall response rate (ORR) to ibrutinib as the first KI was 80% and it was similar for idelalisib (89%, Figure 1A). Median time to treatment discontinuation of the first KI was 6 months (range 0.4–22.1) and was not significantly different for ibrutinib and idelalisib. Toxicity was the main reason of first KI discontinuation for both ibrutinib and idelalisib-treated patients (62% and 79% respectively). The adverse events observed in our patients were similar to those reported in prior studies, *i.e.* bleeding, atrial fibrillation, infection, neutropenia for ibrutinib and diarrhea, neutropenia, transaminitis and toxidermia for idelalisib (Supporting Information Table S2). CLL progression was the second reason of KI discontinuation and occurred in 11 patients (38%) in the ibrutinib group and in 4 patients (21%) in the idelalisib group. The median time to treatment discontinuation was significantly longer for patients who discontinued the first KI due to CLL progression than for those who stopped KI because of AEs (10.9 months, range 4.4 to 15.1 versus 4.8 months, range 0.4 to 22, $P < .005$). The short median duration of first KI treatment might explain the relatively low number of KI discontinuation for progression, as progression on KI usually occurs later with an incidence increasing with time.⁵

The ORR to idelalisib as the second KI was 72% while ORR to ibrutinib was 95%. At the time of last follow-up, 39 patients (81%) had discontinued the second KI. Significantly more patients treated with idelalisib as the second KI discontinued therapy by comparison with the patients having received ibrutinib after idelalisib withdrawal (93% versus 63%, $P = .02$) (Figure 1A). The median time to second KI discontinuation was 7.5 months (range 0.5 to NR) for patients treated with idelalisib and 17.4 months (range 1 to NR) for patients treated with ibrutinib. Toxicity was again the main reason of treatment discontinuation for both

A

	Ibrutinib → Idelalisib (n=29) % (n) or Median (min-max)		Idelalisib → Ibrutinib (n=19) % (n) or Median (min-max)	
	First KI : Ibrutinib	Second KI : Idelalisib	First KI : idelalisib	Second KI : ibrutinib
BEST OVERALL RESPONSE				
Overall response	80% (23)	72% (21)	89% (17)	95% (18)
Complete response	7% (2)	17% (5)	0	5% (1)
Partial response/with hyperlymphocytosis	42%/31% (12/9)	41%/14% (12/4)	47%/42% (9/8)	53%/37% (10/7)
Stable disease	10% (3)	17% (5)	0	0
Progressive disease	0	7% (2)	0	0
Not evaluable	10% (3)	4% (1)	11% (2)	5% (1)
MEDIAN TIME TO DISCONTINUATION (mo)	5.8 (0.4-21.3)	7.5 (0.5-NR)	6.0 (1.1-22.1)	17.4 (1-NR)
REASONS FOR DISCONTINUATION				
Patients who discontinued KI	100% (29)	93% (27)	100% (17)	63% (12)
Adverse Event ¹	62% (18)	48% (13/27)	79% (15)	58% (7/12)
CLL progression	38% (11)	37% (10/27)	21% (4)	17% (2/12)
Including Richter transformation	-	4% (1/27)	-	8% (1/12)
Allogeneic stem cell transplantation	-	4% (1/27)	-	17% (2/12)
Other ²	-	11% (3/27)	-	8% (1/12)

¹ Some patients experienced several adverse events that led to the discontinuation of KI-therapy

² included progressive multifocal leukoencephalopathy possibly associated with ibrutinib (first KI), uterine sarcoma, epidermotropic T lymphoma, death of unknown cause

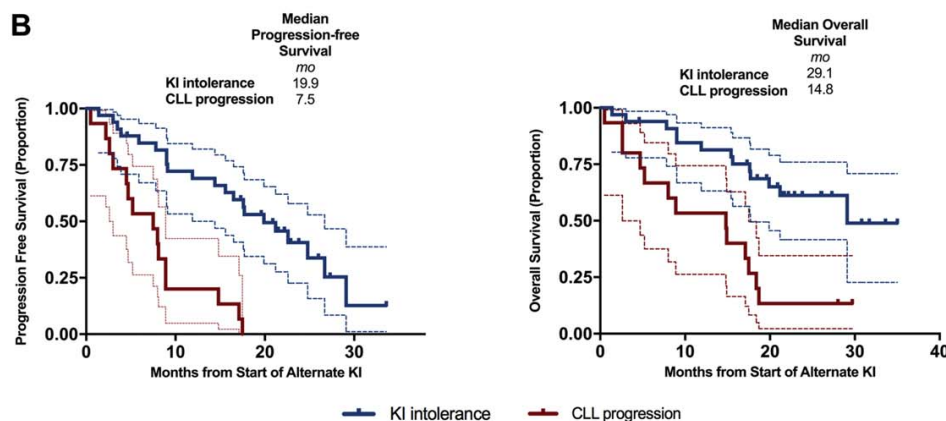


FIGURE 1 (A) First and second KI treatment: response rates, time to and reasons for discontinuation. (B) PFS et OS according to the cause of discontinuation of first KI

ibrutinib and idelalisib-treated patients. The most common AEs leading to second KI withdrawal were the same as those causing their discontinuation when given as first KI (Supporting Information Table S2). CLL progression occurred in 10 patients (37%) receiving idelalisib as second KI and in 2 patients (17%) secondarily treated with ibrutinib. Two patients developed Richter's transformation, one in each group (Figure 1A). Notably, three intolerant patients remained untreated for more than one year after the second KI discontinuation (28, 15 and 14 months), all of them having received idelalisib as the second KI. Treating patients with idelalisib for a definite period could therefore represent an interesting option in some instances, although it is not supported by clinical trials.

The median follow-up of the entire cohort from the time of second KI initiation was 17.6 months (range 0.5 to 35). Twenty-five patients

died during the follow-up, 19 patients (65%) in the ibrutinib-first group and 6 patients (32%) in the idelalisib-first group ($P = .04$). Thirty-seven percent of deaths are related to adverse events, mainly infections, and 24% to CLL progression. For the whole cohort, median PFS and OS from the time of initiation of alternate KI were 14.8 months and 19.9 months respectively (Supporting Information Figure S1). The reason for first KI discontinuation is of great interest. PFS was significantly longer for patients who discontinued first KI for intolerance (19.9 months) compared to patients who discontinued first KI for CLL progression (7.5 months) ($P < .0001$). These findings concerning PFS are consistent with the data previously reported by Mato et al.³ Moreover, in our study, the reason for first KI discontinuation also impacted overall survival, with a median OS of 29.1 months in first KI-intolerant patients

versus 14.8 months in patients whose disease progressed on the first KI ($P < .005$) (Figure 1B).

The BCL-2 inhibitor venetoclax may represent another therapeutic option after KI withdrawal, especially in case of CLL progression. Preliminary data of a phase 2 study showed an estimated 12-month PFS of 80% for patients previously treated with either ibrutinib or idelalisib, with 45% of patients achieving MRD negativity in the peripheral blood, and one patient achieving bone marrow negative MRD.⁶

As a conclusion, our data suggest that the use of an alternative KI after first KI discontinuation because of adverse events may be a reasonable option for CLL patients. The outcome is significantly worse for patients progressing while treated by kinase inhibitor, and venetoclax represents a better alternative treatment in this particular setting.



ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the additional members of the FILO group who contributed to the study by reporting cases: Eric Durot (Reims), Pierre Feugier (Nancy), Stéphane Leprêtre (Rouen), Béatrice Mahé (Nantes), Anne-Sophie Michallet (Lyon), Philippe Rodon (Périgeux), Eric Van Den Neste (Bruxelles).

ORCID

Loïc Ysebaert  <http://orcid.org/0000-0001-8478-5623>

Anne Quinquenel  <http://orcid.org/0000-0002-3666-3442>

Sophie Godet¹, Caroline Protin², Jehan Dupuis³, Caroline Dartigeas⁴, Jean-Noël Bastie⁵, Charles Herbaux⁶, Véronique Leblond⁷, Sophie de Guibert⁸, David Ghez⁹, Annie Brion¹⁰, Loïc Ysebaert² , Alain Delmer^{1,11}, Anne Quinquenel^{1,11} 

¹CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Service d'Hématologie Clinique, Reims, France

²IUC Toulouse-Oncopole, Toulouse, France

³Hôpital Henri Mondor, Créteil, France

⁴Hôpital Bretonneau, Tours, France

⁵CHU Dijon, Dijon, France

⁶CHRU Lille, Hôpital Claude Hurriez, Lille, France

⁷Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris, France

⁸CHU Rennes, Rennes, France

⁹Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

¹⁰CHU Besançon, Besançon, France

¹¹Université Reims Champagne Ardenne, UFR Médecine, Reims, France

Correspondence

Anne Quinquenel, Service d'Hématologie Clinique, CHU Reims, Rue du Général Koenig, 51092 Reims, France.
Email: aquinquenel@chu-reims.fr

REFERENCES

- [1] Brown JR, Hillmen P, O'Brien S, et al. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia*. 2017; doi: 10.1038/leu.2017.175 [Epub ahead of print].
- [2] Jones JA, Robak T, Brown JR, et al. Efficacy and safety of idelalisib in combination with ofatumumab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2017;4(3):e114–e126. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30019-4](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30019-4).
- [3] Mato AR, Nabhan C, Barr PM, et al. Outcomes of CLL patients treated with sequential kinase inhibitor therapy: a real world experience. *Blood*. 2016;128(18):2199–2205. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-716977>.
- [4] Mato AR, Hill BT, Lamanna N, et al. Optimal sequencing of ibrutinib, idelalisib, and venetoclax in chronic lymphocytic leukemia: results from a multicenter study of 683 patients. *Ann Oncol off J Eur Soc Med Oncol*. 2017;28(5):1050–1056. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx031>.
- [5] Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, et al. Etiology of ibrutinib therapy discontinuation and outcomes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *JAMA Oncol*. 2015;1(1):80–87. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2014.218>.
- [6] Jones J, Choi MY, Mato AR, et al. Venetoclax (VEN) monotherapy for patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) who relapsed after or were refractory to ibrutinib or idelalisib. *Blood*. 2016;128(22):637–637.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

Received: 15 November 2017 | Accepted: 16 November 2017

DOI 10.1002/ajh.24977

Secondary acute myeloid leukaemia in elderly patients: Patient's fitness criteria and ELN prognostic stratification can be applied to guide treatment decisions. An analysis of 280 patients by the network rete ematologica lombarda (REL)

To the Editor:

Secondary acute myeloid leukaemia (s-AML) includes AML deriving from antecedent haematologic disorders (AHD-AML), like myelodysplastic syndrome (MDS) or myeloproliferative neoplasm (MPN) and AML therapy-related (t-AML).¹ Patients with s-AML have higher median age, frequent unfavorable cytogenetics and their outcome has been considered invariably poorer compared to "de novo" AML.^{2,3} Allogeneic stem cell transplantation (SCT) remains the only curative option.

Bibliographie

1. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signaling and fate decision. *Annual review of immunology*. 2010;28:21-55.
2. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annual review of immunology*. 2006;24:287-320.
3. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends in immunology*. 2013;34(12):592-601.
4. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(4):251-63.
5. Martensson IL, Almqvist N, Grimsholm O, Bernardi AI. The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS letters*. 2010;584(12):2572-9.
6. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(10):728-40.
7. Niuro H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(12):945-56.
8. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(1):15-27.
9. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(3):213-9.
10. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):118-32.

11. Harwood NE, Batista FD. Early events in B cell activation. *Annual review of immunology*. 2010;28:185-210.
12. Gonzalez SF, Degn SE, Pitcher LA, Woodruff M, Heesters BA, Carroll MC. Trafficking of B cell antigen in lymph nodes. *Annual review of immunology*. 2011;29:215-33.
13. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature immunology*. 2004;5(9):943-52.
14. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annual review of immunology*. 2012;30:429-57.
15. Chaudhuri J, Alt FW. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(7):541-52.
16. Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(8):573-83.
17. Girard JP, Moussion C, Forster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):762-73.
18. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(11):867-78.
19. Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(5):360-70.
20. Turley SJ, Fletcher AL, Elpek KG. The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(12):813-25.
21. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular immunology*. 2004;41(6-7):599-613.

22. Hashimoto A, Okada H, Jiang A, Kurosaki M, Greenberg S, Clark EA, et al. Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(7):1287-95.
23. Pierce SK, Liu W. The tipping points in the initiation of B cell signalling: how small changes make big differences. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(11):767-77.
24. Katz SI, Parker D, Turk JL. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature*. 1974;251(5475):550-1.
25. Gorczynski RM. Immunity to murine sarcoma virus-induced tumors. II. Suppression of T cell-mediated immunity by cells from progressor animals. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1974;112(5):1826-38.
26. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117(2):530-41.
27. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(3):772-9.
28. Candando KM, Lykken JM, Tedder TF. B10 cell regulation of health and disease. *Immunological reviews*. 2014;259(1):259-72.
29. Mills KH. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European journal of immunology*. 2008;38(10):2636-49.
30. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-40.

31. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2016;44(3):683-97.
32. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity*. 2012;36(3):477-90.
33. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, Demarais PM, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro. *Journal of leukocyte biology*. 2013;93(5):811-8.
34. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer research*. 2013;73(8):2468-79.
35. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Sollner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(4):1204-12.
36. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 2014;41(6):1040-51.
37. Saze Z, Schuler PJ, Hong CS, Cheng D, Jackson EK, Whiteside TL. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*. 2013;122(1):9-18.
38. Nouel A, Pochard P, Simon Q, Segalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *Journal of autoimmunity*. 2015;59:53-60.

39. Liu J, Zhan W, Kim CJ, Clayton K, Zhao H, Lee E, et al. IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *PloS one*. 2014;9(2):e89236.
40. Achour A, Simon Q, Mohr A, Seite JF, Youinou P, Bendaoud B, et al. Human regulatory B cells control the TFH cell response. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;140(1):215-22.
41. Shen P, Fillatreau S. Suppressive functions of B cells in infectious diseases. *International immunology*. 2015;27(10):513-9.
42. Das A, Ellis G, Pallant C, Lopes AR, Khanna P, Peppas D, et al. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;189(8):3925-35.
43. Siewe B, Wallace J, Rygielski S, Stapleton JT, Martin J, Deeks SG, et al. Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after in vitro reactivation of HIV latent reservoirs. *PloS one*. 2014;9(4):e92934.
44. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, Kaul B, Smith H, Daga S, et al. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2015;15(5):1384-91.
45. de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, et al. CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(11):1830-9.
46. Amrouche K, Jamin C. Influence of drug molecules on regulatory B cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2017;184:1-10.
47. Rickert RC. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(8):578-91.

48. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *2016;127(20):2375-90.*
49. Le Guyader-Peyrou S, Belot A, Maynadie M, Binder-Foucard F, Remontet L, Troussard X, et al. Cancer incidence in France over the 1980-2012 period: Hematological malignancies. *Revue d'epidemiologie et de sante publique. 2016;64(2):103-12.*
50. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E, Bluhm EC, et al. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *British journal of haematology. 2007;139(5):809-19.*
51. Hamblin TJ. Just exactly how common is CLL? *Leukemia research. 2009;33(11):1452-3.*
52. Goldin LR, Slager SL. Familial CLL: genes and environment. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program. 2007:339-45.*
53. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood. 2008;111(12):5446-56.*
54. Morabito F, Mosca L, Cutrona G, Agnelli L, Tuana G, Ferracin M, et al. Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2013;19(21):5890-900.*
55. Vardi A, Dagklis A, Scarfo L, Jelinek D, Newton D, Bennett F, et al. Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood. 2013;121(22):4521-8.*

56. Rawstron AC, Shanafelt T, Lanasa MC, Landgren O, Hanson C, Orfao A, et al. Different biology and clinical outcome according to the absolute numbers of clonal B-cells in monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2010;78 Suppl 1:S19-23.
57. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8(10):1640-5.
58. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997;108(4):378-82.
59. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell*. 2011;20(2):246-59.
60. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer discovery*. 2014;4(9):1088-101.
61. Damle RN, Calissano C, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukaemia: a disease of activated monoclonal B cells. *Best practice & research Clinical haematology*. 2010;23(1):33-45.
62. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(11):1625-38.
63. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(11):1639-47.

64. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(3):145-62.
65. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(3):401-13.
66. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer research*. 2006;66(14):7158-66.
67. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(2):356-65.
68. Duhren-von Minden M, Ubelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012;489(7415):309-12.
69. Iacovelli S, Hug E, Bennardo S, Duhren-von Minden M, Gobessi S, Rinaldi A, et al. Two types of BCR interactions are positively selected during leukemia development in the Emu-TCL1 transgenic mouse model of CLL. *Blood*. 2015;125(10):1578-88.
70. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998;91(7):2387-96.
71. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(3):755-64.
72. Vandewoestyne ML, Pede VC, Lambein KY, Dhaenens MF, Offner FC, Praet MM, et al. Laser microdissection for the assessment of the clonal relationship between chronic

lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma and proliferating B cells within lymph node pseudofollicles. *Leukemia*. 2011;25(5):883-8.

73. Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan XJ, Yancopoulos S, Hayes G, et al. Intracloal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2011;17(11-12):1374-82.

74. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563-74.

75. Lafouresse F, Bellard E, Laurent C, Moussion C, Fournie JJ, Ysebaert L, et al. L-selectin controls trafficking of chronic lymphocytic leukemia cells in lymph node high endothelial venules in vivo. *Blood*. 2015;126(11):1336-45.

76. Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. 2002;99(8):2977-84.

77. Pasikowska M, Walsby E, Apollonio B, Cuthill K, Phillips E, Coulter E, et al. Phenotype and immune function of lymph node and peripheral blood CLL cells are linked to transendothelial migration. 2016;128(4):563-73.

78. Saint Georges S, Quettier M, Bouyaba M, Le Coquil S, Lauriente V, Guittat L, et al. Protein kinase D-dependent CXCR4 down-regulation upon BCR triggering is linked to lymphadenopathy in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget*. 2016.

79. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, Baran-Marszak F, et al. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer research*. 2009;69(16):6387-95.

80. Till KJ, Pettitt AR, Slupsky JR. Expression of functional sphingosine-1 phosphate receptor-1 is reduced by B cell receptor signaling and increased by inhibition of PI3 kinase delta but not SYK or BTK in chronic lymphocytic leukemia cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2015;194(5):2439-46.
81. Heinig K, Gatjen M, Grau M, Stache V, Anagnostopoulos I, Gerlach K, et al. Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer discovery*. 2014;4(12):1448-65.
82. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(3):1030-7.
83. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96(8):2655-63.
84. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, et al. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer research*. 2009;69(9):4001-9.
85. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Burkle A, Wierda WG, Keating MJ, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*. 2009;113(13):3050-8.
86. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*. 2005;106(3):1012-20.
87. Crompton E, Van Damme M, Pieters K, Vermeersch M, Perez-Morga D, Mineur P, et al. Extracellular vesicles of bone marrow stromal cells rescue chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis, enhance their migration and induce gene expression modifications. *Haematologica*. 2017;102(9):1594-604.

88. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Frontiers in immunology*. 2014;5:614.
89. Hanna BS, McClanahan F, Yazdanparast H, Zaborsky N, Kalter V, Rossner PM, et al. Depletion of CLL-associated patrolling monocytes and macrophages controls disease development and repairs immune dysfunction in vivo. *Leukemia*. 2016;30(3):570-9.
90. Galletti G, Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MT. B cells and macrophages pursue a common path toward the development and progression of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2016;30(12):2293-301.
91. Paggetti J, Haderk F, Seiffert M, Janji B, Distler U, Ammerlaan W, et al. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood*. 2015;126(9):1106-17.
92. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 1999;106(4):995-1004.
93. Scielzo C, Apollonio B, Scarfo L, Janus A, Muzio M, Ten Hacken E, et al. The functional in vitro response to CD40 ligation reflects a different clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2011;25(11):1760-7.
94. Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *European journal of immunology*. 2002;32(5):1403-13.
95. D'Arena G, Laurenti L, Minervini MM, Deaglio S, Bonello L, De Martino L, et al. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leukemia research*. 2011;35(3):363-8.

96. McClanahan F, Hanna B, Miller S, Clear AJ, Lichter P, Gribben JG, et al. PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(2):203-11.
97. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 2013;121(9):1612-21.
98. 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. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(7):1797-805.
99. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, 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):1412-21.
100. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgun G, Le Dieu R, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(7):2427-37.
101. Mohr A, Renaudineau Y, Bagacean C, Pers JO, Jamin C, Bordron A. Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*. 2016;5(5):e1132977.
102. Drennan S, D'Avola A, Gao Y, Weigel C, Chrysostomou E, Steele AJ, et al. IL-10 production by CLL cells is enhanced in the anergic IGHV mutated subset and associates with reduced DNA methylation of the IL10 locus. 2017;31(8):1686-94.
103. DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia*. 2013;27(1):170-82.

104. Saulep-Easton D, Vincent FB, Quah PS, Wei A, Ting SB, Croce CM, et al. The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. *Leukemia*. 2016;30(1):163-72.
105. ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacology & therapeutics*. 2014;144(3):338-48.
106. Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood*. 2015;126(5):573-81.
107. Parikh SA, Leis JF, Chaffee KG, Call TG, Hanson CA, Ding W, et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: Natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer*. 2015;121(17):2883-91.
108. Tian X, Lee YS, Gunti S, Lipsky A, Herman SE, Salem D, et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia is a predictor of early death. *Blood*. 2016;57(7):1592-9.
109. Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review. *Haematologica*. 2011;96(5):752-61.
110. Visco C, Maura F, Tuana G, Agnelli L, Lionetti M, Fabris S, et al. Immune thrombocytopenia in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with stereotyped B-cell receptors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(7):1870-8.
111. Maura F, Visco C, Falisi E, Reda G, Fabris S, Agnelli L, et al. B-cell receptor configuration and adverse cytogenetics are associated with autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology*. 2013;88(1):32-6.

112. Visco C, Barcellini W, Maura F, Neri A, Cortelezzi A, Rodeghiero F. Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology*. 2014;89(11):1055-62.
113. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34.
114. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206.
115. Letestu R, Levy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*. 2010;116(22):4588-90.
116. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*. 2016;43(2):233-40.
117. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2000;343(26):1910-6.
118. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714-26.
119. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997;89(7):2516-22.
120. Brown JR, Hillmen P, O'Brien S, Barrientos JC, Reddy NM, Coutre SE, et al. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. 2017.

121. Le Bris Y, Struski S, Guieze R, Rouvellat C, Prade N, Troussard X, et al. Major prognostic value of complex karyotype in addition to TP53 and IGHV mutational status in first-line chronic lymphocytic leukemia. *Hematological oncology*. 2016.
122. Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, Ortega M, Ruiz-Xiville N, Rivas-Delgado A, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget*. 2017;8(33):54297-303.
123. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, Ferrajoli A, Stingo F, Smith SC, et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*. 2015;121(20):3612-21.
124. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.
125. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-7.
126. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2003;348(18):1764-75.
127. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nuckel H, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(9):897-904.
128. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Habe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(29):4473-9.

129. Lazarian G, Guieze R, Wu CJ. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(9):984-93.
130. Benedetti D, Tissino E, Pozzo F, Bittolo T, Caldana C, Perini C, et al. NOTCH1 mutations are associated with high CD49d expression in chronic lymphocytic leukemia: link between the NOTCH1 and the NF-kappaB pathways. *Leukemia*. 2017.
131. Zhang Z, Chen S, Chen S, Chen G, Zhang R, Li J, et al. SF3B1 mutation is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(41):69916-23.
132. Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1403-12.
133. Knittel G, Rehkemper T, Korovkina D, Liedgens P, Fritz C, Torgovnick A, et al. Two mouse models reveal an actionable PARP1 dependence in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Nature communications*. 2017;8(1):153.
134. Jerkeman M, Hallek M, Dreyling M, Thieblemont C, Kimby E, Staudt L. Targeting of B-cell receptor signalling in B-cell malignancies. *Journal of internal medicine*. 2017;282(5):415-28.
135. Seiler T, Dreyling M. Bruton's tyrosine kinase inhibitors in B-cell lymphoma: current experience and future perspectives. *Expert opinion on investigational drugs*. 2017;26(8):909-15.
136. Egle A. Milestones in Chronic Lymphocytic Leukemia: An exciting decade of progress-10th anniversary of memo. *Memo*. 2017;10(1):8-12.
137. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic

leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* (London, England). 2010;376(9747):1164-74.

138. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016;127(2):208-15.

139. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2014;371(3):213-23.

140. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2014;370(11):997-1007.

141. Ysebaert L, Aurran-Schleinitz T, Dartigeas C, Dilhuydy MS, Feugier P, Michallet AS, et al. Real-world results of ibrutinib in relapsed/refractory CLL in France: Early results on a large series of 428 patients. 2017;92(8):E166-e8.

142. Levade M, David E, Garcia C, Laurent PA, Cadot S, Michallet AS, et al. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood*. 2014;124(26):3991-5.

143. Thompson PA, Levy V, Tam CS, Al Nawakil C, Goudot FX, Quinquenel A, et al. Atrial fibrillation in CLL patients treated with ibrutinib. An international retrospective study. *British journal of haematology*. 2016;175(3):462-6.

144. Lampson BL, Kasar SN, Matos TR, Morgan EA, Rassenti L, Davids MS, et al. Idelalisib given front-line for treatment of chronic lymphocytic leukemia causes frequent immune-mediated hepatotoxicity. (1528-0020 (Electronic)).

145. Lampson BL, Brown JR. PI3Kdelta-selective and PI3Kalpha/delta-combinatorial inhibitors in clinical development for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Expert opinion on investigational drugs*. 2017;26(11):1267-79.
146. Sharman J, Hawkins M, Kolibaba K, Boxer M, Klein L, Wu M, et al. An open-label phase 2 trial of entospletinib (GS-9973), a selective spleen tyrosine kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;125(15):2336-43.
147. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, et al. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine*. 2016;374(4):323-32.
148. Guo A, Lu P, Coffey G, Conley P, Pandey A, Wang YL. Dual SYK/JAK inhibition overcomes ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia: Cerdulatinib, but not ibrutinib, induces apoptosis of tumor cells protected by the microenvironment. *Oncotarget*. 2017;8(8):12953-67.
149. Secchiero P, Voltan R, Rimondi E, Melloni E, Athanasakis E, Tisato V, et al. The gamma-secretase inhibitors enhance the anti-leukemic activity of ibrutinib in B-CLL cells. *Oncotarget*. 2017;8(35):59235-45.
150. Slinger E, Thijssen R, Kater AP, Eldering E. Targeting antigen-independent proliferation in chronic lymphocytic leukemia through differential kinase inhibition. *Leukemia*. 2017.
151. Jain P, Thompson PA, Keating M, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, et al. Long-term outcomes for patients with chronic lymphocytic leukemia who discontinue ibrutinib. 2017;123(12):2268-73.
152. Wolf C, Garding A, Filarsky K, Bahlo J, Robrecht S, Becker N, et al. NFATC1 activation by DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia correlates with clinical staging and can be inhibited by ibrutinib. *International journal of cancer*. 2017.

153. Saba NS, Wong DH, Tanios G, Iyer JR, Lobelle-Rich P, Dadashian EL, et al. MALT1 inhibition is efficacious in both naive and ibrutinib-resistant chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research*. 2017.
154. Kashyap MK, Amaya-Chanaga CI, Kumar D, Simmons B, Huser N, Gu Y, et al. Targeting the CXCR4 pathway using a novel anti-CXCR4 IgG1 antibody (PF-06747143) in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1):112.
155. Yu J, Chen L, Cui B, Wu C, Choi MY, Chen Y, et al. Cirmtuzumab inhibits Wnt5a-induced Rac1 activation in chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. *Leukemia*. 2017;31(6):1333-9.
156. Matas-Cespedes A, Vidal-Crespo A, Rodriguez V, Villamor N, Delgado J, Gine E, et al. The Human CD38 Monoclonal Antibody Daratumumab Shows Antitumor Activity and Hampers Leukemia-Microenvironment Interactions in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(6):1493-505.
157. Robak T, Hellmann A, Kloczko J, Loscertales J, Lech-Maranda E, Pagel JM, et al. Randomized phase 2 study of otlertuzumab and bendamustine versus bendamustine in patients with relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2017;176(4):618-28.
158. Seymour JF, Ma S, Brander DM, Choi MY, Barrientos J, Davids MS, et al. Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. (1474-5488 (Electronic)).
159. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. appendix 6: Chronic lymphocytic leukaemia: eUpdate published online September 2016 (<http://www.esmo.org/Guidelines/Haematological-Malignancies>). 2016(1569-8041 (Electronic)).

160. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*. 1993;361(6409):226-33.
161. Park H, Wahl MI, Afar DE, Turck CW, Rawlings DJ, Tam C, et al. Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity*. 1996;4(5):515-25.
162. Rawlings DJ, Scharenberg AM, Park H, Wahl MI, Lin S, Kato RM, et al. Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science (New York, NY)*. 1996;271(5250):822-5.
163. Wang Q, Vogan EM, Nocka LM, Rosen CE, Zorn JA, Harrison SC, et al. Autoinhibition of Bruton's tyrosine kinase (Btk) and activation by soluble inositol hexakisphosphate. *eLife*. 2015;4.
164. Joseph RE, Wales TE, Fulton DB, Engen JR, Andreotti AH. Achieving a Graded Immune Response: BTK Adopts a Range of Active/Inactive Conformations Dictated by Multiple Interdomain Contacts. *Structure (London, England : 1993)*. 2017;25(10):1481-94.e4.
165. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(4):219-32.
166. Lowry WE, Huang XY. G Protein beta gamma subunits act on the catalytic domain to stimulate Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(2):1488-92.
167. Jiang Y, Ma W, Wan Y, Kozasa T, Hattori S, Huang XY. The G protein G alpha12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature*. 1998;395(6704):808-13.

168. Tsukada S, Simon MI, Witte ON, Katz A. Binding of beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(23):11256-60.
169. de Gorter DJ, Beuling EA, Kersseboom R, Middendorp S, van Gils JM, Hendriks RW, et al. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity*. 2007;26(1):93-104.
170. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Lounsbury D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(29):13075-80.
171. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *The New England journal of medicine*. 2014;370(24):2286-94.
172. Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, Lehman A, Blachly JS, Lozanski A, et al. BTKC481S-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(13):1437-43.
173. Cheng S, Guo A, Lu P, Ma J, Coleman M, Wang YL. Functional characterization of BTK(C481S) mutation that confers ibrutinib resistance: exploration of alternative kinase inhibitors. *Leukemia*. 2015;29(4):895-900.
174. Ahn IE, Underbayev C, Albitar A, Herman SE, Tian X, Maric I, et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017;129(11):1469-79.
175. Albitar A, Ma W, DeDios I, Estella J, Ahn I, Farooqui M, et al. Using high-sensitivity sequencing for the detection of mutations in BTK and PLCgamma2 genes in cellular and cell-free DNA and correlation with progression in patients treated with BTK inhibitors. *Oncotarget*. 2017;8(11):17936-44.

176. Jones D, Woyach JA, Zhao W, Caruthers S, Tu H, Coleman J, et al. PLCG2 C2 domain mutations co-occur with BTK and PLCG2 resistance mutations in chronic lymphocytic leukemia undergoing ibrutinib treatment. *Leukemia*. 2017;31(7):1645-7.
177. Landau DA, Sun C, Rosebrock D, Herman SEM, Fein J, Sivina M, et al. The evolutionary landscape of chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib targeted therapy. 2017;8(1):2185.
178. Wodarz D, Garg N, Komarova NL, Benjamini O, Keating MJ, Wierda WG, et al. Kinetics of CLL cells in tissues and blood during therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *Blood*. 2014;123(26):4132-5.
179. Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*. 2014;28(3):649-57.
180. Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, Pittaluga S, Chang S, Chang B, et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF-kappaB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood*. 2014;123(21):3286-95.
181. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011;117(23):6287-96.
182. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*. 2012;119(5):1182-9.
183. Chen SS, Chang BY, Chang S, Tong T, Ham S, Sherry B, et al. BTK inhibition results in impaired CXCR4 chemokine receptor surface expression, signaling and function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2016;30(4):833-43.

184. Herman SE, Mustafa RZ, Jones J, Wong DH, Farooqui M, Wiestner A. Treatment with Ibrutinib Inhibits BTK- and VLA-4-Dependent Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In Vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(20):4642-51.
185. de Rooij MF, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, Buggy JJ, et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(11):2590-4.
186. Patrussi L, Capitani N, Martini V, Pizzi M, Trimarco V, Frezzato F, et al. Enhanced Chemokine Receptor Recycling and Impaired S1P1 Expression Promote Leukemic Cell Infiltration of Lymph Nodes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer research*. 2015;75(19):4153-63.
187. Tissino E, Benedetti D, Herman SEM, Ten Hacken E, Ahn IE, Chaffee KG, et al. Functional and clinical relevance of VLA-4 (CD49d/CD29) in ibrutinib-treated chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2018.
188. Ansell SM. Two targets for the price of one. *Blood*. 2013;122(15):2529-31.
189. Dubovsky JA, Beckwith KA, Natarajan G, Woyach JA, Jaglowski S, Zhong Y, et al. Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. *Blood*. 2013;122(15):2539-49.
190. Niemann CU, Herman SE, Maric I, Gomez-Rodriguez J, Biancotto A, Chang BY, et al. Disruption of in vivo Chronic Lymphocytic Leukemia Tumor-Microenvironment Interactions by Ibrutinib--Findings from an Investigator-Initiated Phase II Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(7):1572-82.
191. Yin Q, Sivina M, Robins H, Yusko E, Vignali M, O'Brien S, et al. Ibrutinib Therapy Increases T Cell Repertoire Diversity in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. 2017;198(4):1740-7.

192. Podhorecka M, Goracy A, Szymczyk A, Kowal M, Ibanez B, Jankowska-Lecka O, et al. Changes in T-cell subpopulations and cytokine network during early period of ibrutinib therapy in chronic lymphocytic leukemia patients: the significant decrease in T regulatory cells number. *Oncotarget*. 2017;8(21):34661-9.
193. Long M, Beckwith K, Do P, Mundy BL, Gordon A, Lehman AM, et al. Ibrutinib treatment improves T cell number and function in CLL patients. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(8):3052-64.
194. Kondo K, Shaim H, Thompson PA, Burger JA, Keating M, Estrov Z, et al. Ibrutinib modulates the immunosuppressive CLL microenvironment through STAT3-mediated suppression of regulatory B-cell function and inhibition of the PD-1/PD-L1 pathway. *Leukemia*. 2017.
195. Boissard F, Fournie JJ, Quillet-Mary A, Ysebaert L, Poupot M. Nurse-like cells mediate ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood cancer journal*. 2015;5:e355.
196. Fiorcari S, Maffei R, Audrito V, Martinelli S, Ten Hacken E, Zucchini P, et al. Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(40):65968-81.
197. Ahn IE, Jerussi T, Farooqui M, Tian X, Wiestner A, Gea-Banacloche J. Atypical *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in previously untreated patients with CLL on single-agent ibrutinib. *Blood*. 2016;128(15):1940-3.
198. Williams AM, Baran AM, Meacham PJ, Feldman MM, Valencia HE, Newsom-Stewart C, et al. Analysis of the risk of infection in patients with chronic lymphocytic leukemia in the era of novel therapies. *Leukemia & lymphoma*. 2017:1-8.
199. Riches JC, Gribben JG. Immunomodulation and immune reconstitution in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in hematology*. 2014;51(3):228-34.

200. Lykken JM, Candando KM, Tedder TF. Regulatory B10 cell development and function. *International immunology*. 2015;27(10):471-7.
201. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *International immunology*. 2015;27(10):479-86.
202. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature immunology*. 2002;3(10):944-50.
203. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(4):2240-52.
204. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28(5):639-50.
205. Jin G, Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Le Huu D, Ishiura N, et al. B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(6):1674-82.
206. Maseda D, Candando KM, Smith SH, Kalampokis I, Weaver CT, Plevy SE, et al. Peritoneal cavity regulatory B cells (B10 cells) modulate IFN-gamma+CD4+ T cell numbers during colitis development in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013;191(5):2780-95.
207. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(12):7459-72.

208. Vadasz Z, Toubi E. FoxP3 Expression in Macrophages, Cancer, and B Cells-Is It Real? *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2017;52(3):364-72.
209. de Andres C, Tejera-Alhambra M, Alonso B, Valor L, Teijeiro R, Ramos-Medina R, et al. New regulatory CD19(+)CD25(+) B-cell subset in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis relapse. Changes after glucocorticoids. *Journal of neuroimmunology*. 2014;270(1-2):37-44.
210. Guo Y, Zhang X, Qin M, Wang X. Changes in peripheral CD19(+)Foxp3(+) and CD19(+)TGFbeta(+) regulatory B cell populations in rheumatoid arthritis patients with interstitial lung disease. *Journal of thoracic disease*. 2015;7(3):471-7.
211. Vadasz Z, Peri R, Eiza N, Slobodin G, Balbir-Gurman A, Toubi E. The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *Journal of immunology research*. 2015;2015:254245.
212. Noh J, Choi WS, Noh G, Lee JH. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune network*. 2010;10(6):247-9.
213. Simon Q, Pers JO, Cornec D, Le Pottier L, Mageed RA, Hillion S. In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;137(5):1577-84.e10.
214. Herndon TM, Chen SS, Saba NS, Valdez J, Emson C, Gatmaitan M, et al. Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia*. 2017;31(6):1340-7.
215. van Attekum MHA, van Bruggen JAC, Slinger E, Lebre MC, Reinen E, Kersting S, et al. CD40 signaling instructs chronic lymphocytic leukemia cells to attract monocytes via the CCR2 axis. *Haematologica*. 2017;102(12):2069-76.

216. Pasikowska M, Walsby E, Apollonio B, Cuthill K, Phillips E, Coulter E, et al. Phenotype and immune function of lymph node and peripheral blood CLL cells are linked to transendothelial migration. *Blood*. 2016;128(4):563-73.
217. Yousefi M, Movassaghpour AA, Shamsasenjan K, Ghalamfarsa G, Sadreddini S, Jadidi-Niaragh F, et al. The skewed balance between Tregs and Th17 in chronic lymphocytic leukemia. *Future oncology (London, England)*. 2015;11(10):1567-82.
218. Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J, Wasik E. T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia--the three-color flow cytometry analysis. *Leukemia research*. 2002;26(7):657-60.
219. Smallwood DT, Apollonio B, Willimott S, Lezina L, Alharthi A, Ambrose AR, et al. Extracellular vesicles released by CD40/IL-4-stimulated CLL cells confer altered functional properties to CD4+ T cells. *Blood*. 2016;128(4):542-52.
220. Chen SS, Chang BY, Chang S, Tong T, Ham S, Sherry B, et al. BTK inhibition results in impaired CXCR4 chemokine receptor surface expression, signaling and function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015.
221. Miklos D, Cutler CS, Arora M, Waller EK, Jagasia M, Pusic I, et al. Ibrutinib for chronic graft-versus-host disease after failure of prior therapy. *Blood*. 2017;130(21):2243-50.
222. Ruella M, Kenderian SS, Shestova O, Fraietta JA, Qayyum S, Zhang Q, et al. The Addition of the BTK Inhibitor Ibrutinib to Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART19) Improves Responses against Mantle Cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(11):2684.
223. Turtle CJ, Hay KA, Hanafi L-A, Li D, Cherian S, Chen X, et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(26):3010-20.

224. Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M, Zheng Z, Barrett DM, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood*. 2016;127(9):1117.
225. Quinquenel A, Al Nawakil C, Baran-Marszak F, Eclache V, Letestu R, Khalloufi M, et al. Old DAT and new data: positive direct antiglobulin test identifies a subgroup with poor outcome among chronic lymphocytic leukemia stage A patients. *American journal of hematology*. 2015;90(1):E5-8.
226. Quinquenel A, Willekens C, Dupuis J, Royer B, Ysebaert L, De Guibert S, et al. Bendamustine and rituximab combination in the management of chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune hemolytic anemia: a multicentric retrospective study of the French CLL intergroup (GCFLLC/MW and GOELAMS). *American journal of hematology*. 2015;90(3):204-7.
227. Quinquenel A, Sicre de Fontbrune F, Durot E, Pannetier M, Michonneau D, Socie G, et al. Recovery of full donor chimerism with ibrutinib therapy in relapsed CLL after allogeneic stem cell transplantation. *British journal of haematology*. 2017;176(6):997-9.
228. Godet S, Protin C, Dupuis J, Dartigeas C, Bastie J-N, Herbaux C, et al. Outcome of chronic lymphocytic leukemia patients who switched from either ibrutinib or idelalisib to alternate kinase inhibitor: A retrospective study of the French innovative leukemia organization (FILO). *American journal of hematology*. 2018;93(2):E52-E4.

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie B qui se caractérise par une évolution clinique hétérogène et un dysfonctionnement du système immunitaire. Des travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence l'existence de sous-populations lymphocytaires B CD5⁺/CD19⁺ qui sécrètent des facteurs solubles immuno-régulateurs, tels que l'IL10 et le TGFβ1 et, qui expriment le facteur de transcription FOXP3. Mon travail de thèse a consisté à poursuivre la caractérisation phénotypique et fonctionnelle de ces sous-populations, et notamment celle sécrétant de l'IL10, tout en évaluant son évolution chez des patients en cours de traitement par ibrutinib, un inhibiteur de Btk. Sur le plan fonctionnel, mes travaux démontrent que les lymphocytes B de LLC ont la capacité d'inhiber la prolifération lymphocytaire T CD4⁺, d'induire une différenciation lymphocytaire T régulatrice et d'inhiber la différenciation Th1. Mes résultats démontrent également que la sous-population IL10⁺ présente des caractéristiques phénotypiques et d'activation communes aux cellules de la fraction proliférative. De plus, la fréquence de la population IL10⁺, plus élevée chez les patients évolutifs, révèle que la capacité de sécrétion de l'IL10 par les cellules B de LLC est corrélée à la progression. Enfin, le traitement par ibrutinib induit une diminution rapide de la sous-population IL10⁺ qui se comporte comme celle de la sous-population CXCR4^{low}, un marqueur de la fraction proliférative. L'ensemble de ces données souligne l'importance des sous-populations immuno-régulatrices dans l'évolutivité de la LLC et apporte de nouveaux éléments sur les mécanismes d'action de l'ibrutinib.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a chronic lymphoproliferative disorder characterized by a heterogeneous clinical evolution, with indolent and progressive forms, as well as by an altered immune system; the latter being consistently found during disease progression. Our laboratory has previously demonstrated the existence of clonal CD5⁺/CD19⁺ subpopulations that secrete soluble cytokines, such as IL10 and TGFβ1, and express the transcription factor FOXP3. Based on these results, my work aimed to further characterize phenotypically and functionally these subpopulations, and notably the IL10 secreting one and to follow its evolution during therapy with ibrutinib, a Btk inhibitor. Functionally, my results demonstrate that CD5⁺ CD19⁺ B lymphocytes have the ability to inhibit CD4⁺ T cells proliferation, to induce regulatory T cells differentiation and to reduce Th1 differentiation. Moreover, we also evidenced that IL10 producing subpopulation shares common phenotypic and activation features with the CLL cells that are part of the proliferative fraction. Furthermore, the higher frequency of the IL-10⁺ found in progressive patients compared to the indolent ones reveals that IL10 secretion by CLL B cells is linked to disease progression. Finally, Ibrutinib therapy induced a rapid decrease of the absolute number of IL10⁺ cells, which behave like the cells expressing low levels of the CXCR4, a marker of the proliferative fraction. Altogether, our results highlight the crucial role of the immunoregulatory CD5⁺/CD19⁺ subpopulations in CLL progression, and provide new clues on the mechanisms underlying the therapeutic effects of ibrutinib.

Analysis of immunoregulatory CD5⁺CD19⁺ subpopulations in chronic lymphocytic leukemia and of the impact of ibrutinib therapy on these subpopulations.

Mots clés : leucémie lymphoïde chronique, lymphocyte B régulateur, interleukine 10, CXCR4, ibrutinib