



HAL
open science

Caractérisation des macrophages de lymphome B : hétérogénéité et dialogue avec la niche stromale et endothéliale

Juliette Ferrant

► **To cite this version:**

Juliette Ferrant. Caractérisation des macrophages de lymphome B : hétérogénéité et dialogue avec la niche stromale et endothéliale. Immunologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B074 . tel-04096446

HAL Id: tel-04096446

<https://theses.hal.science/tel-04096446v1>

Submitted on 12 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ÉCOLE DOCTORALE N° 605
BIOLOGIE SANTE
Spécialité : Immunologie

Par

Juliette FERRANT

Caractérisation des macrophages de lymphome B : hétérogénéité et dialogue avec la niche stromale et endothéliale

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 15 décembre 2022

Unité de recherche : Inserm U1236 – MicroEnvironnement and B-cell: Immunopathology cell
Differentiation and Cancer (MOBIDIC)

Rapporteurs avant soutenance :

Florent Ginhoux Professeur associé – Gustave Roussy, Paris
Julie Helft CR CNRS – Institut Cochin, Paris

Composition du Jury :

Président : Camille Laurent PU-PH – IUCT Oncopôle, Toulouse

Examineurs : Karine Crozat CR CNRS – Université de Rennes 1
 Florent Ginhoux Professeur associé – Gustave Roussy, Paris
 Julie Helft CR CNRS – Institut Cochin, Paris
 Élodie Segura DR Inserm – Institut Curie, Paris
 Karin Tarte PU-PH – Université de Rennes 1

Dir. de thèse : Mikaël Roussel PU-PH – Université de Rennes 1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail de thèse. En premier lieu, mes remerciements vont au professeur Florent Ginhoux et au docteur Julie Helft qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. J'espère que la lecture de ce manuscrit vous sera agréable, comme sa rédaction l'a été pour moi.

Mes remerciements vont également au professeur Camille Laurent, d'une part pour sa participation à ce jury, d'autre part pour son aide dans l'obtention de précieuses images tissulaires.

Je tiens également à remercier le docteur Elodie Segura, qui, après avoir suivi mon parcours de doctorante au travers des rendez-vous annuels que constituent les CSI, a accepté de participer à la clôture de ce cycle doctoral.

Je remercie le docteur Karine Crozat d'évaluer cette thèse, qui je l'espère constitue un jalon des travaux que vous menez à présent conjointement avec Mikaël au sein de la *myeloid brick*. J'ai hâte de voir la suite.

Un grand merci s'impose, encore et toujours, au professeur Karin Tarte. Au risque de me répéter, mon parcours de ces dernières années, tout particulièrement sur le plan scientifique, te doit beaucoup. Je mesure la chance que j'ai de pouvoir continuer à apprendre dans un environnement aussi enthousiasmant.

Bien évidemment, un très grand merci au docteur Mikaël Roussel. Dès le début, ton aide fut essentielle dans la conception du projet et l'obtention du financement de cette thèse d'université. J'ai énormément appris à tes côtés pendant ces années, tu as accompagné et soutenu mes premiers pas dans la recherche, la publication et l'enseignement scientifique. Merci aussi pour ton humour parfois provocateur, de savoir te rendre disponible alors que tu es débordé, et bien sûr de m'avoir transmis le virus des Mo&Mac. J'ai hâte de poursuivre leur exploration avec la *myeloid brick*.

Je remercie l'équipe U1236 dans son ensemble. Etudiants, ITA, chercheurs (je ne peux vous citer tous mais vous vous reconnaîtrez dans ces lignes), vous avez tous contribué à rendre ce travail possible et mes années de thèse agréables.

Merci à Céline D, David, Fred et Gersende pour les multiples petits conseils techniques et autres tuyaux scientifiques.

Merci à Céline P et toute l'équipe de la biothèque qui font un travail parfois ingrat mais ô combien indispensable.

Merci à Céline M « *Biomol Queen* » et à Laurent, pour leur aide précieuse en biomol et au trieur, et à Rachel et Yoni, rouages essentiels du bon fonctionnement quotidien de l'équipe.

Merci à Simon L et Delphine, *task force* bioinfo de luxe.

Merci à Céline B & Céline L, nos formidables gestionnaires sans qui tout serait beaucoup plus compliqué, capables de régler des problèmes avant même qu'on en apprenne l'existence.

Merci à toute l'équipe du SITI – Joëlle, Nadège, Isabelle, Maëlle, Marie, Simon, & co – également expert.e.s ès réglages de problèmes en tous genres. Votre soutien au cours de mes années « en haut » puis ces derniers mois fut précieux.

Chères et chers co-thésard.e.s d'hier et d'aujourd'hui, Nico H, Léa, Kathleen, Marvin, Claire, Natsuko, Juliette G, Marine, Baptiste, Nico B, Ophélie, Marion, Mourad, c'était un plaisir de travailler (pas toujours...) à vos côtés, râler, progresser, boire des coups et échanger des scripts R. Je pense compter un certain nombre d'entre vous parmi mes amis, et j'espère bien que vous le resterez. Vous êtes fantastiques les p'tits loups. Je vous souhaite le meilleur.

Mille mercis aux 4 camarades avec lesquels j'ai eu la chance de partager le quotidien des manip au sein de la team MR et qui m'ont grandement aidé au cours de mon M2 puis de ma thèse : notre maître à tous Simon LG « *Stromac Man* », Guillaume & Steve « *Stromac Boys* », et Francine « *Teammate* ». Sans vous, ça aurait été moins bien.

Grazie mille a Ilenia, pour son précieux soutien sur le *single cell* et toutes les passionnantes conversations *in english* avec Francine.

Je tiens à remercier, encore une fois, les seniors puis collègues du laboratoire d'immunologie côté CHU – Delphine, Erwan, Mylène, Patricia, Cédric, Steve, et Isabelle – qui, non contents d'avoir grandement influencé mon orientation vers l'immunologie, ont considérablement facilité la finalisation de mes deux thèses cette année. Merci pour votre soutien. Je suis ravie de pouvoir continuer à travailler et progresser à vos côtés.

Mes remerciements vont également à l'équipe technique et aux secrétaires du labo, qui rendent agréable le travail au quotidien.

Merci à la FHU-CAMIn d'avoir financé ce travail de thèse.

Merci aux patients et aux équipes de soin.

Merci à mes sœurs et mes parents, toujours présents.

Merci Max. Et de deux.

Sommaire

Liste des abréviations	1
Liste des figures	2
Liste des tableaux	2
Introduction et contexte de l'étude	3
1 Les macrophages associés aux tumeurs	3
1.1 Définitions et généralités	3
1.1.1 Macrophages, cellules dendritiques, monocytes : les phagocytes mononucléés (MNP)	3
1.1.2 Phagocytes mononucléés et cancer : MDSC et TAM	5
1.1.2.1 Cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC)	5
1.1.2.2 Macrophages associés aux tumeurs (TAM)	8
1.2 Un compartiment hétérogène et ambivalent	8
1.2.1 D'une polarisation M1/M2 à un spectre de polarisation	8
1.2.2 Hétérogénéité tissulaire et spécialisation des macrophages	10
1.2.3 L'ontogenèse : un autre facteur d'hétérogénéité	11
1.2.4 Influence de l'environnement tumoral sur le phénotype des TAM	13
1.2.5 Hétérogénéité des TAM à l'ère <i>single cell</i>	17
1.3 Les macrophages, membres pivots de la niche tumorale	21
1.3.1 Niche tumorale et texture immunitaire	21
1.3.2 Mécanismes pro-tumoraux médiés par les TAM	23
1.3.2.1 Soutien direct aux cellules tumorales	23
1.3.2.2 Activités immunosuppressives	24
Activités immunosuppressives directes	24
Activités immunosuppressives indirectes	26
1.3.2.3 Activités protumorales indirectes non liées à l'immunomodulation	27
1.4 Des implications pronostiques et thérapeutiques majeures	28
1.4.1 Rôles pronostiques et prédictifs	28
1.4.2 Place des macrophages dans la prise en charge thérapeutique	31
1.4.2.1 Les macrophages comme auxiliaires thérapeutiques	31
1.4.2.2 Implication des macrophages dans l'échappement au traitement	32
1.4.2.3 Les macrophages comme cibles thérapeutiques	33
2 Lymphomes B : rôle de la niche tumorale	39
2.1 Définitions et généralités	39
2.1.1 De la lymphopoïèse B physiologique à la lymphomagenèse B	39
2.1.2 Lymphome diffus à grande cellules B (<i>DLBCL</i>)	42
2.1.2.1 Définition et épidémiologie	42
2.1.2.2 Diagnostic, classification moléculaire et pronostic	42

2.1.2.3	Aspects thérapeutiques	43
2.1.2.4	Lymphomagenèse du <i>DLBCL</i>	44
2.1.3	Lymphome folliculaire (<i>FL</i>)	47
2.1.3.1	Définition et épidémiologie	47
2.1.3.2	Diagnostic et pronostic	48
2.1.3.3	Aspects thérapeutiques	49
2.1.3.4	Lymphomagenèse du <i>FL</i>	51
2.2	Le rôle déterminant de la niche tumorale de soutien	54
2.2.1	Diversité des microenvironnements de lymphomes B	54
2.2.2	Implication de la niche lymphomateuse dans la réponse aux inhibiteurs de points de contrôle	55
2.2.3	Microenvironnement tumoral du <i>DLBCL</i>	57
2.2.4	Microenvironnement tumoral du <i>FL</i>	62
3	Les macrophages dans les ganglions sains et de lymphome B	68
3.1	Hétérogénéité et niche des macrophages ganglionnaires	68
3.1.1	Architecture et organisation générale du ganglion	68
3.1.2	Les populations de macrophages résidents du ganglion	72
3.1.2.1	Macrophages des sinus lymphatiques	73
	Macrophages du sinus sous-capsulaire (<i>SSM</i>)	73
	Macrophages du sinus médullaire (<i>MSM</i>)	74
3.1.2.2	Macrophages du parenchyme ganglionnaire	75
	Macrophages des cordons médullaires (<i>MCM</i>)	75
	Macrophages à corps tingibles (<i>TBM</i>)	76
	Macrophages de la zone T (<i>TZM</i>)	76
3.1.2.3	Ontogénie des macrophages ganglionnaires	76
3.1.3	Une relation étroite avec des cellules stromales spécialisées	77
3.1.3.1	Cellules stromales ganglionnaires	77
	Cellules folliculaires dendritiques (<i>FDC</i>)	80
	Cellules réticulaires exprimant le <i>CXCL12</i> (<i>CRC</i>)	81
	Cellules fibroblastiques réticulaires (<i>FRC</i>)	82
	Cellules marginales réticulaires (<i>MRC</i>)	84
3.1.3.2	Cellules endothéliales ganglionnaires	84
	Cellules endothéliales lymphatiques (<i>LEC</i>) du ganglion	84
	Cellules endothéliales des veinules à endothélium épais (<i>HEC</i>)	85
3.1.3.3	Dialogue stroma/macrophages en situation physiologique	87
3.2	Les macrophages associés aux lymphomes B	89
3.2.1	Aspects pronostiques et prédictifs	89
3.2.1.1	Les monocytes et <i>M-MDSC</i> : biomarqueurs circulants et précurseurs des <i>TAM</i> ?	90
3.2.1.2	Caractère pronostique et prédictif des macrophages dans le lymphome B	91

3.2.2	Aspects physiopathologiques _____	93
3.2.2.1	Compartiment circulant _____	93
3.2.2.2	Soutien direct aux cellules malignes de lymphome B <i>in situ</i> _____	93
3.2.2.3	Activités protumorales indirectes <i>in situ</i> _____	94
3.2.3	Implication des macrophages de lymphomes B en thérapeutique _____	95
	Objectifs _____	100
	Résultats 1 – Phénotypage haute résolution des cellules suppressives d’origine myéloïde et macrophages associés aux tumeurs de tissu humain par cytométrie de masse _____	101
	Résultats 2 – Identification d’interactions d’intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B _____	112
	Conclusion et perspectives _____	164
	Bibliographie _____	169
	Annexes _____	212

Liste des abréviations

ABC - <i>activated B cell</i>	DAMP – <i>damage-associated molecular patterns</i> - motifs moléculaires associés au danger
ADCC - <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> - cytotoxicité médiée par les anticorps	DC – <i>dendritic cells</i> - cellules dendritiques
ADCP - <i>antibody dependent cellular phagocytosis</i> - phagocytose dépendante des anticorps	DC-SIGN/CD209 - <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
AID - <i>activation-induced cytidine deaminase</i>	DLBCL – <i>diffuse large B cell lymphoma</i> - lymphome diffus à grandes cellules B
ARG1 - arginase 1	DN - <i>double negative</i> - double négatif
B-R - bendamustine, rituximab	DZ FDC – <i>dark zone FDC</i> - FDC de la zone sombre
BCG - bacille de Calmette et Guérin	ECM - matrice extracellulaire
BCR - <i>B cell receptor</i> - récepteur des cellules B	EMP - progéniteurs érythro-myéloïdes
BEC - <i>blood endothelial cells</i> - cellules endothéliales sanguines	EMT – <i>epithelial-mesenchymal transition</i> - transition épithélio-mésenchymateuse
BFL1 - <i>BCL-2-related protein A1</i>	EZH2 - <i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
BTLA - <i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>	Fc – fragment cristallisable
BTK - tyrosine kinase de Bruton	FcγR – récepteur au fragment Fc des IgG
CAF - <i>cancer-associated fibroblast</i> - fibroblastes associés au cancer	FcεR – récepteur au fragment Fc des IgE
CAR-T ou CAR-T cells – <i>chimeric antigen receptor T cells</i>	FDC – <i>follicular dendritic cells</i> - cellules folliculaires dendritiques
CAR-Mac - <i>chimeric antigen receptor macrophages</i>	FISH – <i>fluorescence in situ hybridization</i> - hybridation in situ en fluorescence
cDC - cellule dendritique conventionnelle	FL – <i>follicular lymphoma</i> - lymphome folliculaire
CDP - progéniteur commun DC	FLIPI - <i>Follicular Lymphoma International Prognostic Index</i>
CEBPB - <i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>	FPR1 et FPR2 – <i>formyl peptide receptor 1 et 2</i>
CITE-Seq - <i>cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing</i>	FRC – <i>fibroblastic reticular cells</i> - cellules fibroblastiques réticulaires
CLP - progéniteur commun lymphoïde	GC - <i>germinal center</i> - centre germinatif
CMH - complexe majeur d'histocompatibilité	GEMys - <i>genetically engineered myeloid cells</i>
CMLP - progéniteur commun myéloïde-lymphoïde	GEP – <i>gene expression profiling</i> - profil d'expression génique
cMo - monocytes classiques	GM-CSF – <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
CMP - progéniteur commun myéloïde	GMP - progéniteur commun granulocytaire monocytaire
COO - <i>cell-of-origin</i> - cellule d'origine	HDAC - Histone désacétylases
CPA - cellules présentatrices d'antigènes	HDACi – inhibiteur d'HDAC
CPC - cellules précurseurs de cancer	HEC – <i>HEV endothelial cells</i> - cellules endothéliales des HEV
CSC – <i>cancer stem cells</i> - cellules souches cancéreuses	HEV - <i>high endothelial veinules</i> - veinules à endothélium épais
CSF1R - <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>	HIF – <i>hypoxia-inducible factors</i>
CSR – <i>class switch recombination</i> - commutation isotypique	HRS - <i>Hodgkin Reed–Sternberg cells</i>
CTL - lymphocytes T cytotoxiques	HSC - cellule souche hématopoïétique
CyTOF – <i>cytometry by time of flight</i> - cytométrie de masse	HVEM - <i>herpes virus entry mediator</i>
DA-EPOCH-R – <i>dose-adjusted etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin with rituximab</i>	

IC - *immune checkpoints* - points de contrôle immunitaires

ICB - *immune-checkpoint blockade* - blocage/bloqueur des points de contrôle immunitaires

IDO - indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN - interféron

IFRC - *interfollicular FRC* - cellules réticulaires inter-folliculaires

Ig - immunoglobulines

IGH - *immunoglobulin heavy locus*

IHC - immunohistochimie

IMC - *imaging mass cytometry* - imagerie par cytométrie de masse

iNOS - *inducible nitric oxide synthase*

intMo - monocytes intermédiaires

IPI - *International Prognostic Index*

ISG - *interferon stimulated genes* - gènes stimulés par l'interféron

ITK - inhibiteur de tyrosine kinase

LAG3 - *lymphocyte-activation gene 3*

LEC - *lymphoid endothelial cells* - cellules endothéliales lymphoïdes

LFA-1 - *lymphocyte function associated antigen 1*

LILR - *leukocyte immunoglobulin-like receptors*

LLC - *follicular lymphoma like cells* - cellules de type lymphome folliculaire

LLT1 - *lectin-like transcript 1*

LN - *lymph node* - ganglion lymphatique

LNH - lymphome non-Hodgkinien

LPS - lipopolysaccharide

LT - lymphotoxine

LTo - *lymphoid tissue organizers* - organisateurs du tissu lymphoïde

LTβR - *lymphotoxin β receptor* - récepteur à la lymphotoxine β

LZ FDC - *light zone FDC* - FDC de la zone claire

M-CSF/CSF1 - *macrophage colony-stimulating factor*

M-MDSC - cellules suppressives d'origine myéloïde de type monocytique

MALT - *mucosa-associated lymphoid tissue* - tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MAM - *metastase associated macrophages* - macrophages associés aux métastases

MARCO - *macrophage receptor with collagenous structure*

MCL - *mantle cell lymphoma*

MCM - *medullary cord macrophages* - macrophages des cordons médullaires

MCP - progéniteur mastocytaire

MDP - progéniteur des macrophages et DC

MDR1 - *multidrug resistance protein 1*

MDSC - *myeloid-derived suppressor cells* - cellules suppressives d'origine myéloïde

MEC - matrice extracellulaire

MedRC - *medullary reticular cells* - cellules réticulaires médullaires

MEP - progéniteur mégacaryocytaire et érythroïde

MMP - métalloprotéinases matricielles

MNP - *mononuclear phagocytes* - phagocytes mononucléés

MO - moelle osseuse

Mo&Mac - Monocytes et macrophages

MPS - mononuclear phagocyte system

MRC - *marginal reticular cells* - cellules marginales réticulaires

MSM - *medullary sinus macrophages* - macrophages du sinus médullaire

ncMo - monocytes non classiques

NK - natural killer

NKT - invariant natural killer T

NO - monoxyde d'azote

NOS - *not otherwise specified* - sans autre spécificité clinico-biologique

NOX2 - NADPH oxydase 2

ONOO- - ion peroxydite

NSCLC - *non-small cell lung cancer*

OLS - organes lymphoïdes secondaires

OMS - organisation mondiale de la santé

OS - *overall survival* - survie globale

PAMP - *pathogen-associated molecular patterns* - récepteurs de motifs moléculaires associés aux pathogènes

PD1 - programmed cell death 1

PDAC - *pancreatic ductal adenocarcinoma* - adénocarcinome pancréatique

pDC - *plasmacytoid dendritic cells* - cellules dendritiques plasmacytoïdes

PDL1 et PDL2 - programmed cell death 1 ligand 1 et 2

PDPN - podoplanine

PET-scanner - tomographie par émission de positons

PFS - *progression free survival* - survie sans progression

PGE2 - prostaglandine E2

PI3Kγ - phosphoinositide 3-kinase-γ

pMAC - pré-macrophages

PMBCL - lymphome à grandes cellules B primitif du médiastin

PMN-MDSC - cellules suppressives d'origine myéloïde de type polymorphonucléaire
 PRC - *perivascular reticular cells* - cellules réticulaires péri-vasculaires
 PRR - *pattern recognition receptors*
 R-CHOP - rituximab, cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone
 R-CVP - rituximab, cyclophosphamide, vincristine et prednisone
 RNASeq - séquençage ARN
 RNS - *reactive nitrogen species*
 ROS - *reactive oxygene species* - espèces réactives de l'oxygène
 S1P - sphingosine 1 phosphate
 S1PR2 - sphingosine-1-phosphate receptor 2
 scRNASeq - *single cell RNA sequencing*
 SHM - hypermutation somatique
 SIRP α - *signal-regulatory protein alpha*
 SLT - structures lymphoïdes tertiaires
 SPARC - *secreted protein acidic and rich in cysteine*
 SSM - *subscapular sinus macrophages* - macrophages du sinus sous-capsulaire
 STAT - *signal transducer and activator of transcription*
 TA-HEV - *tumor-associated HEV* - HEV associées aux tumeurs
 TAM - *tumor associated macrophages* - macrophages associés aux tumeurs
 TAN - *tumor associated neutrophils* - macrophages associés aux neutrophiles
 TBM - *tingible body macrophages* - macrophages à corps tingibles
 TBRC - *T-B border reticular cells* - cellules réticulaires bordant la zone T-B

TCR - *T cell receptor*
 TFH - *lymphocyte T follicular helper*
 TFR - lymphocyte T régulateur folliculaire
 TGF β - *tumor growth factor β*
 Th - *lymphocyte T helper*
 TIGIT - *T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains*
 TIL - *tumor-infiltrating lymphocytes*
 TIM - *tumor infiltrating monocytes*
 TIM3 - *T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3*
 TIME - *tumoral immune microenvironment*
 TIMP - *tissue inhibitor of metalloproteinases*
 TNF - *tumor necrosis factor*
 TLR - *Toll-like receptors*
 TLS - structures lymphoïdes tertiaires
 TME - *tumoral microenvironment* - microenvironnement tumoral
 TMEM - TME des métastases
 TNFRSF14 - *TNF receptor superfamily member 14*
 TRC - *T zone reticular cells* - cellules réticulaires de la zone T
 Treg - lymphocytes T régulateurs
 TREM2 - *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*
 TRM - *tissue resident macrophages* - macrophages résidents des tissus
 TZM - *T zone macrophages* - macrophages de la zone T
 VEGF - *vascular endothelial growth factor*

Liste des figures

Figure 1 Différenciation des cellules myéloïdes en situation physiologique	4
Figure 2 Différenciation des cellules myéloïdes dans l'environnement tumoral	6
Figure 3 Distinguer les MDSC des neutrophiles et monocytes conventionnels	7
Figure 4 D'une simple vision linéaire à un spectre d'activation macrophagique	9
Figure 5 La polarisation des TAM, dépendant des signaux environnementaux, présente un statut ambivalent, pro- ou anti-tumoral	10
Figure 6 Ontogenèse des macrophages associés aux tumeurs	12
Figure 7 Les facteurs déterminant le phénotype des TAM	13
Figure 8 Diversité et évolutivité des propriétés fonctionnelles des TAM au cours de la tumorigenèse	16
Figure 9 Hétérogénéité des TAM humains révélée par les études de séquençage ARN à l'échelle de la cellule unique	18
Figure 10 Composition et fonctionnement des organes lymphoïdes tertiaires dans le cancer	22
Figure 11 Multiples mécanismes pro-tumoraux directs et indirects des TAM	25
Figure 12 Valeur pronostique et prédictive de marqueurs de TAM dans les tumeurs solides	29
Figure 13 Thérapies ciblant les TAM et macrophages modifiés dans le traitement des tumeurs solides	37
Figure 14 Maturation B physiologique et origine des lymphomes B au sein du centre germinatif (GC)	40
Figure 15 Composition du microenvironnement des lymphomes B	55
Figure 16 Niche tumorale du lymphome folliculaire	67
Figure 17 Organisation générale et trafic cellulaire dans le ganglion lymphatique	69
Figure 18 Macrophages résidents du ganglion lymphatique	72
Figure 19 Hétérogénéité et rôles des populations stromales lymphoïdes des ganglions	78
Figure 20 Niches microanatomiques des macrophages ganglionnaires	88
Figure 21 Principaux résultats obtenus	164

Liste des tableaux

Tableau 1 Populations de macrophages et de monocytes identifiés au sein de tumeurs humaines par les études <i>single cell</i>	19
---	----

Introduction et contexte de l'étude

1 Les macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages associés aux tumeurs sont l'objet d'un intérêt croissant en cancérologie, souligné par le nombre exponentiel de publications à leur sujet dans de nombreuses tumeurs solides. Leur rôle ambivalent, pro- ou anti-tumoral, en font une population à décrypter dans sa diversité et son hétérogénéité. L'explosion des études à l'échelle de la cellule unique accompagne l'exploration de la diversité de ce compartiment, central en cancérologie.

1.1 Définitions et généralités

1.1.1 Macrophages, cellules dendritiques, monocytes : les phagocytes mononucléés (MNP)

Avant de s'intéresser au contexte pathologique, il convient de définir la contrepartie physiologique de notre population d'intérêt : les macrophages.

Les macrophages sont identifiés par Élie Metchnikoff comme faisant partie, conjointement avec les polynucléaires, du système phagocytaire qu'il conceptualise en 1892 ¹⁻³. À la fin des années 60, apparaît le terme de système phagocytaire mononucléaire – MPS, *mononuclear phagocyte system* – pour désigner à la fois les macrophages et les monocytes circulants, considérés comme leurs seuls précurseurs ⁴. C'est depuis les années 80 avec la découverte et caractérisation des cellules dendritiques (DC – *dendritic cells*) que le MPS inclut trois sous-types de phagocytes mononucléés (MNP – *mononuclear phagocytes*) : monocytes, macrophages, et DC ^{2,5,6}. Réunies par leurs capacités de phagocytose et de présentation antigénique ainsi que leur noyau unilobé, ces populations sont historiquement distinguées sur des critères morphologiques, phénotypiques, fonctionnels et ontogéniques, dont les contours sont souvent flous. Pour permettre une meilleure classification des MNP, une nomenclature unifiée a été proposée en 2014, reposant sur deux niveaux de classification : d'abord l'ontogénie, puis la localisation, la fonction, et le phénotype ². Elle présente toutefois l'inconvénient de reposer sur l'ontogénie, c'est-à-dire l'origine cellulaire, qui, bien que plutôt bien établie chez la souris, reste peu élucidée chez l'humain.

Les macrophages sont de grandes cellules vacuolaires localisées dans les tissus ³. Ils ont un rôle essentiel dans l'immunité innée et adaptative via leurs capacités de phagocytose, de présentation antigénique, et de production de cytokines. En plus de leur rôle de protection contre les pathogènes et d'élimination des cellules apoptotiques et des débris cellulaires, ils sont également impliqués dans le développement, l'homéostasie et la réparation tissulaire, ainsi que dans l'angiogenèse ⁷⁻⁹. La nomenclature de 2014 propose de réserver le terme de macrophages

aux cellules issues de précurseurs embryonnaires, auto-renouvelés au niveau tissulaire, mais cette distinction est peu respectée.

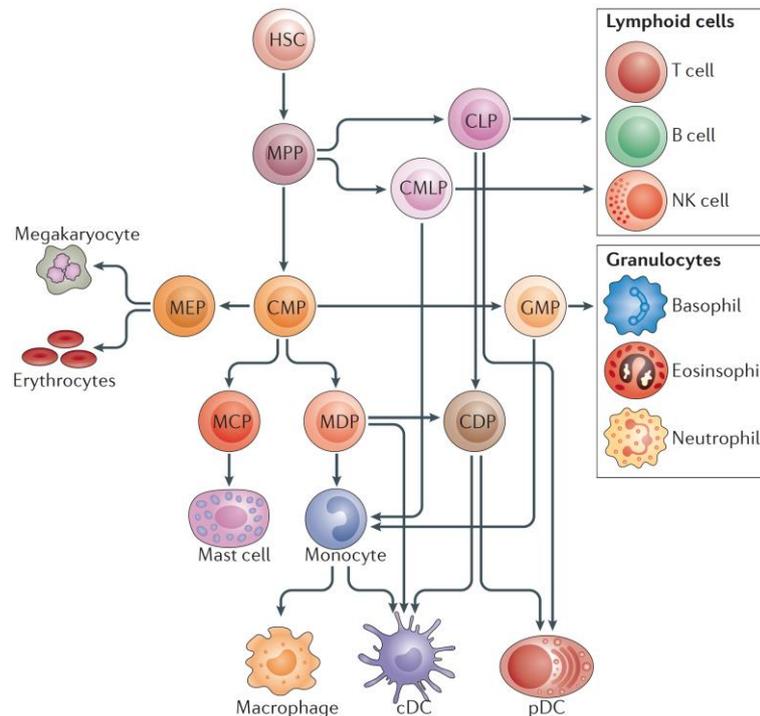


Figure 1 | **Différenciation des cellules myéloïdes en situation physiologique**

Réseau de progéniteurs à l'origine des différentes lignées cellulaires hématopoïétiques. Il est à noter sur ce schéma l'absence de représentation des macrophages résidents directement issus de progéniteurs embryonnaires et auto-renouvelés localement. HSC, cellule souche hématopoïétique ; MPP, progéniteur multipotent ; CMLP, progéniteur commun myéloïde-lymphoïde ; CLP, progéniteur commun lymphoïde ; CMP, progéniteur commun myéloïde ; CDP, progéniteur commun DC ; GMP, progéniteur commun granulocytaire monocytaire ; MCP, progéniteur mastocytaire ; MDP, progéniteur des macrophages et DC ; cDC, cellule dendritique conventionnelle ; pDC, cellules dendritique plasmacytoïde ; MEP, progéniteur mégakaryocytaire et érythroïde. D'après Gabrilovich et al., 2012¹⁰.

Les monocytes sont des phagocytes circulants. Ils présentent des capacités de présentation antigénique inférieures à celles des DC mais sont d'importants producteurs de cytokines et peuvent migrer dans les tissus. On distingue trois sous-types de monocytes^{11,12}. Les monocytes classiques, ou inflammatoires (cMo) sont CD14^{hi}CD16^{neg}, peuvent se différencier en macrophages ou DC après avoir été recrutés dans les tissus par la voie de signalisation CCL2 en contexte physiologique ou pathologique (la nomenclature de 2014 parlera de cellules dérivées de monocytes), et sont d'importants producteurs des cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-1 β , IL-6. Les monocytes non classiques, ou « patrouilleurs » - *patrolling* (ncMo), sont CD14^{lo}CD16^{pos}, sont impliqués dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins et la clairance des cellules endothéliales, et peuvent migrer aux tissus dans un contexte pathologique via la signalisation CX3CL1-CX3CR1. Enfin, les monocytes intermédiaires, ou transitionnels (intMo) sont CD14^{pos}CD16^{pos}, sont des phagocytes actifs et producteurs des cytokines TNF α , IL-1 β , IL-6^{11,12}.

Les DC sont des cellules de morphologie stellaire, capables de présenter des antigènes et d'activer des cellules T naïves : elles sont la « troisième cellule » faisant le lien entre immunité innée et adaptative ¹³. On distingue DC plasmacytoïdes (pDC) CD303/BDCA-2^{pos} et DC circulantes ou conventionnelles (cDC), elles-mêmes divisées en cDC1 CD141/BDCA-3^{pos} et cDC2 CD1c/BDCA-1^{pos}, toutes différenciées à partir d'un progéniteur DC commun (CDP) ^{2,14,15}. Les monocytes peuvent également se différencier en cellules présentant des caractéristiques de DC, là encore la nomenclature de 2014 parlera de cellules dérivées de monocytes. Toutefois, l'usage est de désigner par les terme macrophage ou le terme DC les cellules en présentant les caractéristiques décrites précédemment, qu'elles soient issues de progéniteurs spécifiques ou dérivées de monocytes. L'ensemble des MNP et leur place dans la différenciation myéloïde physiologique sont représentés dans la Figure 1.

Les marqueurs et fonctions présentés comme caractéristiques de l'un des trois grands sous-types de MNP sont en fait souvent non spécifiques, ce qui ne facilite par leur distinction. De plus, ces marqueurs ne sont pas toujours redondants de la souris à l'humain ², compliquant encore la classification des MNP en monocytes, macrophages, ou DC.

1.1.2 Phagocytes mononucléés et cancer : MDSC et TAM

Dans le cancer, la lignée myéloïde est affectée par des signaux environnementaux variés qui seront à l'origine de modifications du phénotype des MNP et de la perturbation de la différenciation myéloïde (Figure 2). Il en résulte notamment une expansion de populations immunosuppressives, parmi lesquels on retrouve des macrophages associés aux tumeurs (TAM – *tumor associated macrophages*) et des cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC – *myeloid-derived suppressor cells*). Des mécanismes moléculaires variés sont à l'origine et pourront constituer des marqueurs de ces populations (facteurs de transcription et cibles transcriptionnelles) ¹⁰.

1.1.2.1 Cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC)

Le terme MDSC est un mot-concept, encore discuté aujourd'hui, émergent en 2007 pour désigner les cellules d'origine myéloïde, immatures, et présentant des fonctions immunosuppressives, qui s'expandent en situation pathologique ^{16,17}. Leurs fonctions immunosuppressives (ou suppressives, régulatrices, immunomodulatrices...) désignent leurs capacités à inhiber de manière directe (par exemple en produisant des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 ou le TGFβ, ou en appauvrissant le milieu en acides aminés par la production d'enzymes telles que l'arginase) ou indirecte (en induisant ou recrutant d'autres cellules régulatrices) les réponses T effectrices et *Natural Killer* (NK). Il a depuis été montré qu'on peut observer des MDSC dans certaines situations physiologiques telles que la résolution de la réponse immune ou la grossesse, où leurs fonctions immunosuppressives leur confèrent un rôle

bénéfique, mais elles restent majoritairement étudiées pour leurs effets délétères, comme dans le cancer ou l'obésité ¹⁸. L'apparition des MDSC résulterait d'une activation pathologique consécutive à une stimulation persistante du compartiment myéloïde par des facteurs de croissance (comme le GM-CSF – *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* ou le M-CSF/CSF1 – *macrophage colony-stimulating factor*) et des signaux inflammatoires (comme IL-6 ou IL-1 β), situation que l'on retrouve dans le cancer mais également dans les infections chroniques ou les maladies auto-immunes.

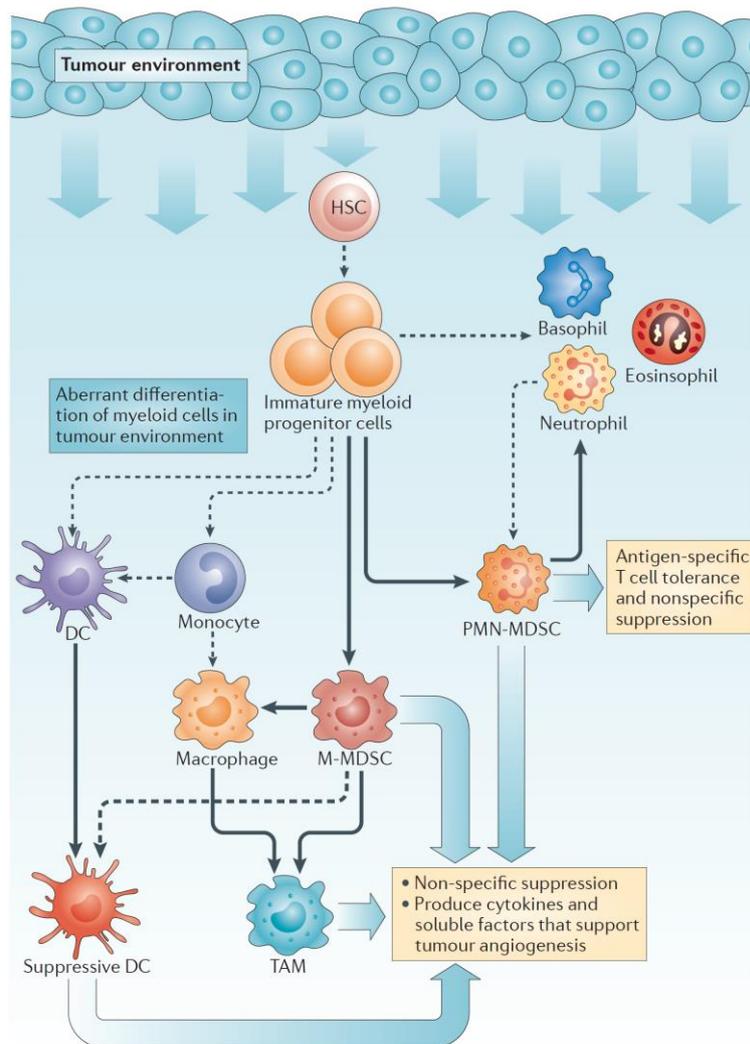


Figure 2 | **Différenciation des cellules myéloïdes dans l'environnement tumoral**

Les facteurs produits par les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement sont à l'origine d'une différenciation aberrante de la lignée myéloïde : modification des cellules dendritiques (DC), macrophages, et monocytes ; apparition de cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC) de type polymorphonucléaire (PMN-MDSC) ou monocytique (M-MDSC), et de macrophages associés aux tumeurs (TAM). Les traits en pointillés représentent les voies de différenciation normales des cellules myéloïdes. Les traits pleins représentent les voies de différenciation aberrantes promues dans le contexte tumoral. Le trait épais en pointillés (M-MDSC → *Suppressive DC*) souligne une voie de différenciation suspectée dans le contexte tumoral. D'après Gajjar et al., 2012 ¹⁰.

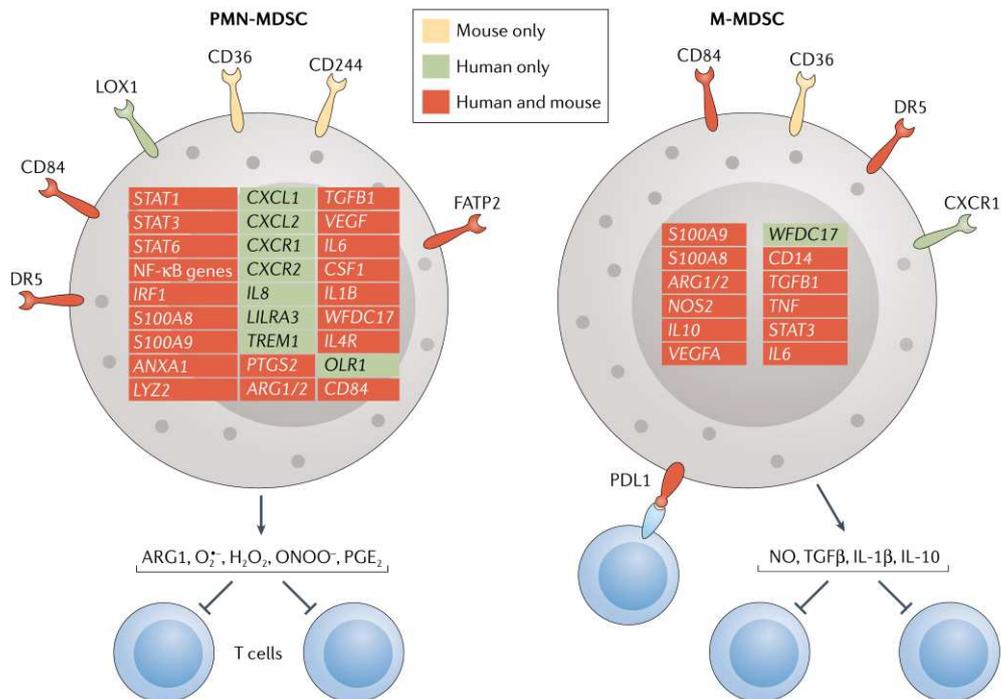


Figure 3 | **Distinguer les MDSC des neutrophiles et monocytes conventionnels**

Marqueurs phénotypiques et transcriptomiques permettant de distinguer les cellules suppressives d'origine myéloïde de type polymorphonucléaire (PMN-MDSC) ou monocytique (M-MDSC) des neutrophiles et monocytes conventionnels, chez l'humain et/ou la souris ; et principaux mécanismes immunosuppresseifs des MDSC mis en évidence dans le cancer. D'après Veglia et al., 2021 ¹⁹.

On distingue deux grands types de MDSC : les cellules suppressives d'origine myéloïde de type monocytique (M-MDSC – *monocytic MDSC*) et de type polymorphonucléaire (PMN-MDSC – *polymorphonuclear MDSC* ou G-MDSC/*Granulocytic MDSC*), qui coexistent avec leurs contreparties normales monocytes et neutrophiles, et avec lesquelles elles partagent de nombreuses caractéristiques phénotypiques et morphologiques. Ces similarités rendent complexe l'identification des MDSC, qui repose classiquement sur des validations expérimentales de leur fonctionnalité, chez l'humain comme chez la souris ¹⁹⁻²¹. En effet, les M-MDSC humaines sont le plus souvent décrites comme étant des cellules CD11b^{pos}CD14^{pos}CD33^{pos}HLA-DR^{lo/neg}, et les PMN-MDSC comme étant CD11b^{pos}CD15^{pos}HLA-DR^{lo}CD66b^{pos}, ce qui ne permet pas de les différencier formellement des monocytes et neutrophiles ²¹. En présence de certains marqueurs typiques des MDSC, il est toutefois fréquent d'utiliser le terme « *MDSC-like* » pour désigner des cellules dont on suspecte une fonctionnalité suppressive sans l'avoir démontrée. C'est le cas par exemple de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) et de S100A8/9, qu'on retrouve dans la voie de signalisation JAK2/STAT3 → MYC → S100A8/9 → dérivés réactifs de l'oxygène (ROS – *reactive oxygene species*) souvent activée dans les MDSC ²². Avec l'approfondissement de la caractérisation de ces cellules, plusieurs marqueurs sont à présent considérés comme suffisants pour identifier

les MDSC¹⁹ (Figure 3). Cependant, les approches en cytométrie haute résolution soulignent l'hétérogénéité de ce compartiment et obèrent l'hypothèse d'une signature MDSC unique^{17,23,24}.

Dans le cancer, les M-MDSC peuvent se différencier en TAM ou en DC, qui seront dysfonctionnelles^{10,18,19} (Figure 2).

1.1.2.2 Macrophages associés aux tumeurs (TAM)

Dans le cancer, on désigne les macrophages sous le terme de macrophages associés aux tumeurs (TAM) du fait des modifications subies par les macrophages dans ce contexte et de leur implication active dans la pathologie. On parle également de macrophages associés aux métastases (MAM – *metastase associated macrophages*) pour les macrophages présents au sein des métastases ganglionnaires ou tissulaires. Il existe une littérature abondante démontrant le détournement des fonctions des macrophages pour accompagner le développement tumoral chez la souris comme chez l'humain, et leur présence est classiquement associé à un mauvais pronostic^{10,25,26}. À l'instar des MDSC, avec lesquelles la frontière est parfois ténue, les TAM peuvent présenter des fonctions pro-tumorales médiées par de nombreux mécanismes immunosuppresseurs. Ils peuvent également promouvoir l'angiogenèse, faciliter l'invasion tumorale et métastatique, ou protéger les cellules tumorales de la chimiothérapie.

Les TAM constituent une population hautement hétérogène en termes de phénotype, de fonctionnalité et d'origine. Ces aspects seront abordés plus avant dans le chapitre suivant.

1.2 Un compartiment hétérogène et ambivalent

1.2.1 D'une polarisation M1/M2 à un spectre de polarisation

Les macrophages sont des cellules plastiques qui peuvent présenter différents stades d'activation (ou polarisation) en réponse à des signaux environnementaux²⁷. Historiquement, on distingue deux stades d'activation opposés : les macrophages de type 1 (M1), activés classiquement, inflammatoires, polarisés par $\text{TNF}\alpha$, lipopolysaccharide (LPS) ou $\text{IFN}\gamma$, promouvant la réponse Th1 et antimicrobienne, et sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, IL-12, $\text{TNF}\alpha$, CXCL9, CXCL10 ; et les macrophages de type 2 (M2), alternativement activés, anti-inflammatoires, polarisés par IL-4, IL-10 ou $\text{TGF}\beta$, promouvant la réponse Th2 et antiparasitaire ainsi que la réparation tissulaire, et sécrétant des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, $\text{TGF}\beta$, CCL17. Dans le cancer, les M1 seraient anti-tumoraux, en activant les cellules cytotoxiques, sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et phagocytant les cellules malignes ; alors que les M2 seraient pro-tumoraux en promouvant immunosuppression, angiogenèse et remodelage tissulaire propices à la progression tumorale. On considère que les TAM présenteraient globalement un phénotype M2. De fait, de nombreux marqueurs de TAM communément utilisés sont des marqueurs associés aux M2 : le récepteur du mannose (CD206),

le récepteur éboueur – *scavenger* – A (CD204/MSR1) et le récepteur éboueur de l'hémoglobine (CD163) ²⁸.

Cette classification binaire s'est peu à peu mue en un continuum, où l'on situe les macrophages sur une représentation linéaire entre deux pôles opposés, avant que soit proposée une représentation sous forme de roue organisée autour de trois pôles ²⁹ (Figure 4). Dans ce nouveau référentiel, si les M1 sont conservés sous l'appellation de macrophages classiquement activés, les M2 sont dissociés en macrophages réparateurs (*wound-healing*, associés à l'immunité muqueuse et antiparasitaire ainsi qu'à la réparation tissulaire, induits notamment par l'IL-4) et régulateurs (associés à la résolution de l'inflammation et à la tolérance, induits notamment par l'IL-10, le TGF β , la liaison d'IgG à leur récepteur Fc γ R ou les cellules apoptotiques). Les TAM présenteraient majoritairement un phénotype mixte réparateur et régulateur ^{8,29}.

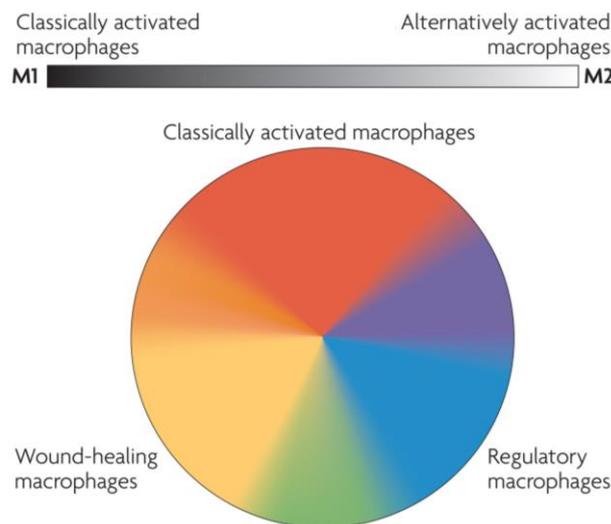


Figure 4 | **D'une simple vision linéaire à un spectre d'activation macrophagique**

Nomenclature historique M1/M2 représentée comme un continuum linéaire (haut). Concept de la roue d'activation des macrophages organisée autour de 3 pôles d'activation : classiquement activés, réparateurs, régulateurs (*classically activated macrophages*, *wound-healing macrophages*, *regulatory macrophages*). Les TAM pourraient ici être situés au niveau de la zone verte (bas). D'après Mosser & Edwards, 2008 ²⁹.

Cette représentation semble encore réductrice, tant les études mettant en évidence un vaste spectre d'activation macrophagique mêlant marqueurs M1 et M2, notamment chez les TAM, se sont multipliées ^{8,25,26,30-32}. Des travaux ont également souligné la plasticité des macrophages – associés ou non aux tumeurs – qui changent de phénotype en réponse aux stimuli reçus de leur environnement ^{8,25,27,32}. L'ensemble de ces éléments met en évidence le caractère ambivalent des TAM vis-à-vis de l'immunité anti-tumorale, sous la dépendance de leur environnement (Figure 5).

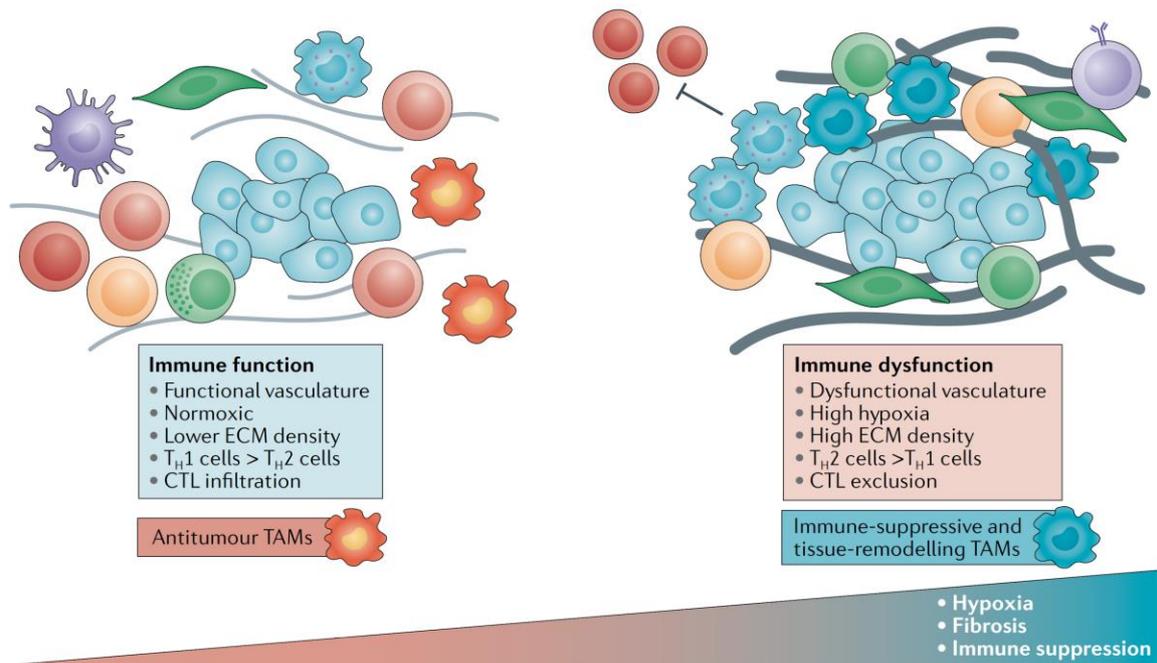


Figure 5 | La polarisation des TAM, dépendant des signaux environnementaux, présente un statut ambivalent, pro- ou anti-tumoral

Un ensemble de facteurs environnementaux, immuns ou non, influencent le phénotype des TAM vers des propriétés anti- ou pro-tumorales. À gauche, une réponse adaptative efficace est possible dans un tissu peu modifié par la pathologie présentant une densité de la matrice extracellulaire (ECM) normale, grâce notamment à des macrophages pro-inflammatoires. À droite, l'hypoxie tumorale et la fibrose, associées à une infiltration de fibroblastes associés au cancer (CAF) et de cellules immunosuppressives, polarisent les macrophages vers un phénotype immunosuppresseur et réparateur à l'origine de l'exclusion et/ou de la suppression des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). D'après DeNardo & Ruffell, 2019²⁵.

1.2.2 Hétérogénéité tissulaire et spécialisation des macrophages

Les macrophages sont retrouvés dans tous les tissus, où ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions liées à la surveillance immune et à l'homéostasie tissulaire, fonctions qui dépendent de leur localisation. Cette spécialisation tissulaire des macrophages résidents (TRM – *tissue resident macrophages*) a conduit à en définir différentes sous-populations chez l'humain (et la souris), en fonction de leurs phénotypes, propriétés et localisations^{8,9}. Les cellules de Kupffer du foie sont en charge de la clairance de bactéries pathogènes et commensales parvenant par voie sanguine, de la réparation tissulaire et présentent des propriétés immunosuppressives et pro-métastatiques. Dans l'intestin, on retrouve les macrophages de la lamina propria, pro-inflammatoires et soutenant la différenciation des cellules souches intestinales, et les macrophages de la muscularis, anti-inflammatoires et en étroite interaction avec le réseau neuronal. Les macrophages pulmonaires comprennent les macrophages alvéolaires, aux propriétés antivirales et antibactériennes, impliqués dans la clairance du surfactant et débris cellulaires, l'homéostasie des échanges gazeux, et tolérogènes ; et les macrophages interstitiels

associés à la vascularisation, aux propriétés anti-fibrotiques et anti-inflammatoires. Dans la peau ont été décrits : les cellules de Langerhans, cellules présentatrices d'antigènes (CPA) efficaces et pouvant être tolérogènes ; les mélanophages, qui dégradent les pigments cutanés et infiltrent les mélanomes ; et les macrophages du derme, des macrophages éboueurs anti-inflammatoires. Au sein du système nerveux central, la microglie est impliquée dans la neurogenèse, l'homéostasie des neurones et réseaux synaptiques et dans la clairance des débris cellulaires, alors que les macrophages des plexus choroïdes sont des CPA en charge de l'immunosurveillance du liquide cérébro-spinal. Enfin, dans la rate, on trouve les macrophages de la pulpe rouge, qui éliminent les érythrocytes sénescents et soutiennent l'hématopoïèse extramédullaire et l'immunité contre les pathogènes ; les macrophages de la pulpe blanche, qui éliminent les lymphocytes B apoptotiques des centres germinatifs ; et les macrophages de la zone marginale, impliqués dans la clairance virale, l'homéostasie tissulaire, l'érythropoïèse et le transfert d'antigènes aux DC.

En cancérologie, cette hétérogénéité des TRM pourrait être un facteur supplémentaire d'hétérogénéité des TAM, à l'origine de profils de TAM spécifiques en fonction de la localisation de la tumeur. Cela pourrait également s'appliquer aux MAM, notamment aux MAM des ganglions puisque différentes populations de TRM ont été décrites dans cet organe (détaillées plus loin).

1.2.3 L'ontogenèse : un autre facteur d'hétérogénéité

Le terme d'ontogenèse, ou ontogénie, décrit le développement de l'individu depuis la fécondation jusqu'à sa mort. En biologie cellulaire, il est utilisé pour désigner l'origine des cellules. L'ontogenèse des macrophages a été complètement repensée ces dernières années, un changement de paradigme rendu possible par les études de traçage des lignées cellulaires (*fate mapping*) sur des modèles murins. Ainsi, alors que l'on pensait les monocytes seuls précurseurs des macrophages, on considère aujourd'hui qu'en situation physiologique la plupart des populations de TRM sont dérivées de précurseurs embryonnaires et sont maintenues par auto-renouvellement, indépendamment de l'hématopoïèse adulte ^{2,30,33}. Ces deux mécanismes, prolifération *in situ* et renouvellement par recrutement de monocytes, ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent coexister ou non, en fonction du tissu, du sous-type de macrophage, et du contexte physiologique ou pathologique ^{34,35}. Par exemple, de manière physiologique, la microglie et les cellules de Langerhans se maintiennent indépendamment de l'hématopoïèse médullaire ^{36,37}, alors que dans le cœur et l'intestin les macrophages embryonnaires sont peu à peu remplacés par des macrophages dérivés de monocytes ^{38,39}. Ces différences pourraient être liées au contexte inflammatoire local, plus important dans les organes où les monocytes interviennent ⁴⁰. Si la majorité des données sur l'ontogénie des macrophages provient de travaux sur la souris, il semble bien que les macrophages humains proviennent également de précurseurs embryonnaires, comme en atteste le nombre normal de cellules de Langerhans et de macrophages pulmonaires et

cutanés chez les patients présentant une mutation *GATA2*, qui n'ont ni monocytes ni DC ⁴¹. De plus, la persistance de cellules de Langerhans du donneur 10 ans après une greffe de main, associée à la présence de mitoses dans ces cellules et à l'absence de cellules du receveur, suggère que les macrophages humains soient également capables de proliférer ⁴². En situation homéostatique, il semble que l'ontogénèse des macrophages influence peu leur phénotype et fonctions, en tous cas moins que les signaux environnementaux qu'ils reçoivent de leur niche ^{35,43-45}.

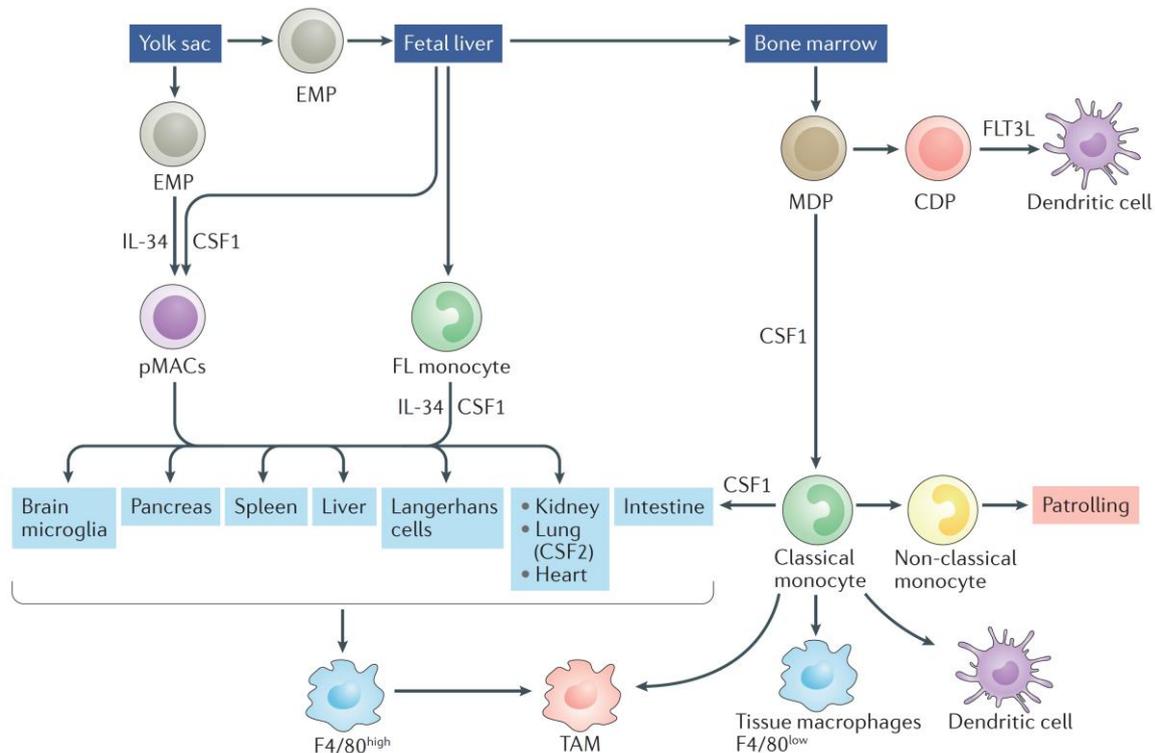


Figure 6 | **Ontogénèse des macrophages associés aux tumeurs**

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) présentent des origines diverses : 1) dérivés des macrophages résidents du tissu atteint, eux-mêmes issus soit de pré-macrophages (pMAC) directement issus de progéniteurs érythro-myéloïdes (EMP) du lécythocèle (*yolk sac*) ou du foie fœtal (*fœtal liver*), soit de monocytes provenant du foie fœtal (*FL monocyte*) recrutés au tissu lors de l'embryogenèse, soit de monocytes recrutés au tissu pour renouveler le contingent de macrophages résidents ; 2) dérivés de monocytes recrutés à la tumeur, eux-mêmes issus de progéniteurs macrophage/DC (MDP) de la moelle osseuse (*bone marrow*). D'après Cassetta & Pollard, 2018 ³⁰.

Dans de nombreuses situations pathologiques – en cas de dommage tissulaire, de réponse anti-infectieuse, d'inflammation chronique (stéatose hépatique, tissu graisseux dans l'obésité), dans le cancer (tumeur primaire et métastases) – les monocytes peuvent être recrutés aux tissus ¹¹. Jusqu'à récemment, on considérait que les TAM et les MAM provenaient de monocytes recrutés à la tumeur, principalement par la voie de signalisation CCL2-CCR2, chez la souris comme chez l'humain ^{11,35,46}. D'autres facteurs peuvent intervenir, tels que VEGFA, M-CSF/CSF1, CCL8, CCL5 ⁴⁷⁻⁵¹. Différents travaux ont montré que la tumeur pouvait détourner les TRM en TAM pro-tumoraux présentant des propriétés spécifiques distinctes des TAM provenant de monocytes

nouvellement recrutés, dans des modèles murins de tumeurs pancréatique, pulmonaire ou cérébrale ⁵²⁻⁵⁴. Ces propriétés pourraient être liées à des différences de conformation de la chromatine préexistantes ⁵². Ces résultats ont pu être récemment confirmés dans des glioblastomes et métastases cérébrales chez l'humain, mettant en évidence l'hétérogénéité des TAM et MAM en lien avec leur ontogénie ⁵⁵⁻⁵⁷.

Les TAM peuvent donc dériver soit des TRM, eux-mêmes d'origine embryonnaire ou pouvant être renouvelés à partir de monocytes, soit de monocytes recrutés à la tumeur (Figure 6). Leur ontogénie pourrait influencer le phénotype et les propriétés immunosuppressives des TAM ^{25,30}.

1.2.4 Influence de l'environnement tumoral sur le phénotype des TAM

De nombreux facteurs provenant de l'environnement tumoral (TME - *tumoral microenvironment*), immun (TIME - *tumoral immune microenvironment*) ou non, vont intervenir dans la polarisation des TRM et des monocytes nouvellement recrutés et leur faire acquérir leur phénotype et leurs fonctions de TAM (Figure 7). Les TAM peuvent donc présenter des propriétés pro- et/ou anti-tumorales, variant en fonction de la nature de la tumeur et de la localisation : tumeur primaire ou sites métastastatiques.

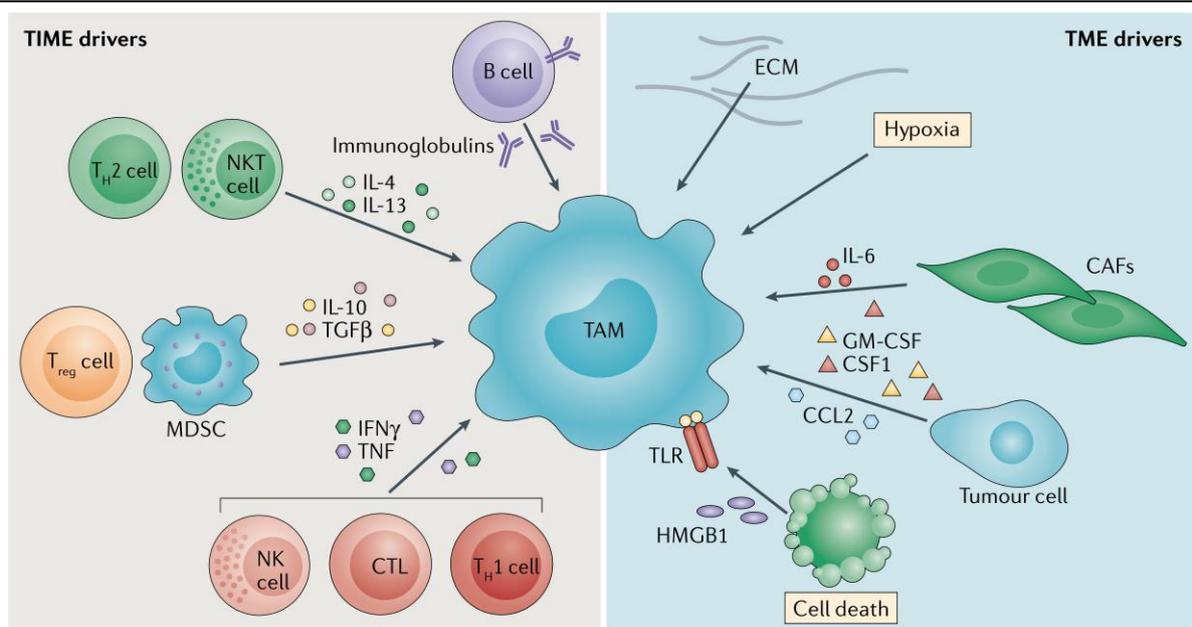


Figure 7 | **Les facteurs déterminant le phénotype des TAM**

Le phénotype des TAM est déterminé par une combinaison de facteurs provenant du microenvironnement tumoral (TME) comme l'hypoxie, la fibrose, la mort cellulaire, des composants de la matrice extracellulaire (ECM), et du microenvironnement tumoral immun (TIME) dont les cellules produisent cytokines et autres facteurs régulant l'activité des macrophages. D'après DeNardo & Ruffel, 2019 ²⁵.

Le phénotype des macrophages résulte de leur plasticité, leur permettant l'intégration de signaux environnementaux à l'empreinte épigénétique ontogénique et tissulaire ⁵⁸⁻⁶⁰. De nombreux signaux moléculaires et acteurs cellulaires participent à la détermination du phénotype

des TAM. Au sein du microenvironnement tumoral, on trouvera notamment des cellules immunitaires, et en particulier différentes populations de lymphocytes, dont la densité et la composition varient en fonction du tissu, du type de tumeur et d'un patient à l'autre. Au-delà de leurs propriétés pro-tumorales directes, de nombreuses populations lymphocytaires vont intervenir dans la polarisation des TAM. Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques et les lymphocytes NK, en produisant de l'IFN γ , peuvent polariser les macrophages en macrophages classiquement activés (M1), favorisant présentation antigénique, production de cytokines pro-inflammatoires, et phagocytose des cellules tumorales⁶¹. Cependant, la majorité des mécanismes médiés par les lymphocytes favorisent un profil pro-tumoral des TAM²⁵. C'est par exemple le cas de la production d'IL-4 et d'IL-13 par des lymphocytes Th2, à l'origine d'un profil immunosuppresseur et pro-métastatique des TAM, notamment via la production d'arginase 1 (ARG1) et d'EGF^{40,62,63}. Dans le cancer du sein, les lymphocytes activés, en produisant du GM-CSF en plus de l'IFN γ , induiraient l'expression de PD-L1 par les TAM via la voie STAT3, contribuant ainsi à l'immunosuppression⁶⁴. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) polarisent également les TAM vers un profil suppressif caractérisé notamment par la production d'IL-10⁶⁵. Il a également été proposé un rôle des lymphocytes B dans la promotion de la carcinogenèse par l'intermédiaire de macrophages pro-tumoraux, via la production d'auto-anticorps activant le récepteur au fragment Fc des IgG (Fc γ R)⁶⁶⁻⁷⁰.

Le microenvironnement ne se résume pas au TIME. De nombreux paramètres liés au métabolisme, aux cellules tumorales et à la mort cellulaire, à la matrice extracellulaire (MEC) et aux cellules stromales peuvent influencer les TAM. Sur le plan métabolique, l'hypoxie tumorale est à l'origine du recrutement de monocytes via la production de CCL2, CCL5, CXCL12, CSF1 et VEGF par les cellules tumorales et stromales⁴⁹, mais aussi du phénotype immunosuppresseur des TAM via la production de facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF – *hypoxia-inducible factors*)^{71,72}. Il est classiquement décrit que les macrophages M1 privilégient la glycolyse aérobie, contrairement aux macrophages stimulés par l'IL-4 (M2) qui préfèrent la phosphorylation oxydative⁷³. Dans le cancer, les TAM présentent des profils métaboliques hétérogènes et la faible disponibilité en glucose et en oxygène favoriserait un profil pro-tumoral des TAM⁷⁴⁻⁷⁶. L'acide lactique, reflet de l'intense activité métabolique tumorale, constitue une source additionnelle d'énergie et renforce les propriétés immunosuppressives et proangiogéniques des TAM^{75,77}. Enfin, un pH acide, indépendamment de l'acide lactique, promeut également des TAM pro-tumoraux^{78,79}.

Le stroma peut également modeler le phénotype des TAM, par le biais d'effets directs de cellules stromales (comme les fibroblastes associés au cancer – CAF) ou de composants de la MEC, ou d'effets indirects liés à la fibrose, comme la disponibilité en oxygène et nutriments. En produisant des chimiokines et facteurs de croissance tels que CCL2, CCL3, CCL5, VEGF, CXCL8,

CSF1/M-CSF et CSF2/GM-CSF, ou encore la cytokine pro-inflammatoire IL-6, les CAF peuvent promouvoir le recrutement des monocytes, la différenciation et l'activation des TAM⁸⁰. Il a été montré que les CAF pancréatiques induisent la prolifération de MDSC de manière STAT3 dépendante^{81,82}. La MEC peut réguler les TAM par ses propriétés mécaniques, biophysiques, par la concentration de ses composants ou en constituant un réservoir de facteurs sécrétés par les acteurs cellulaires de la niche tumorale²⁵. Ainsi, la réticulation du collagène et la rigidité de la MEC, retrouvées dans de nombreuses tumeurs solides, modifient la différenciation et la motilité des macrophages et des TAM, orientant ces derniers vers un phénotype de type M2⁸³⁻⁸⁵. Parmi les composants matriciels capables de polariser les TAM, citons également la périostine, qui participe au recrutement de TAM pro-tumoraux dans le glioblastome par liaison à l'intégrine $\alpha\beta_3$, ou encore l'acide hyaluronique, le versican et la ténascine qui, sous forme altérée, peuvent être reconnus comme des motifs moléculaires associés au danger (DAMP – *damage-associated molecular patterns*) par les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptors*) TLR2 ou TLR4 et ainsi recruter et polariser les TAM⁸⁶⁻⁸⁸. En outre, les cellules endothéliales de glioblastome, en produisant d'importantes quantités d'IL-6, confèrent un phénotype immunosuppresseur aux TAM via PPAR γ et HIF2 α ⁸⁹.

Les tumeurs sont le théâtre d'une importante mortalité cellulaire, d'autant plus sous l'effet des thérapies anti-cancéreuses, ce qui influencera également les TAM. La libération de DAMP sera à l'origine d'une activation chronique des macrophages, ce qui, nous l'avons vu, induit un phénotype immunosuppresseur et l'expansion de MDSC. Par ailleurs, de manière physiologique, les TAM sont programmés pour phagocyter les cellules apoptotiques sans déclencher de réponse immune⁹⁰. Cette propriété est détournée dans le cancer, où l'activation de récepteur MERTK par les cellules apoptotiques induit des TAM immunosuppresseurs⁹¹. Les cellules tumorales peuvent également polariser les TAM par l'intermédiaire de cytokines : c'est le cas par exemple des tumeurs mutées *TP53*, qui sécrètent des ligands WNT stimulant la production d'IL-1 β par les TAM, alimentant l'inflammation systémique et les propriétés pro-métastatiques des neutrophiles⁹². La prostaglandine E2 (PGE2) produite par les cellules tumorales est également impliquée dans le phénotype immunosuppresseur des MDSC⁹³.

Par ailleurs, les monocytes peuvent être conditionnés de trois façons distinctes dans le cancer : à leur arrivée au sein du TME, par les mécanismes variés précédemment décrits, mais aussi précocement dans la moelle osseuse (MO) ou la rate, ou bien dans la circulation sanguine¹¹. Par exemple, une population de monocytes Tie2^{pos} présentant des propriétés pro-angiogéniques et capable de se différencier en TAM a été décrite chez la souris et chez l'humain⁹⁴. De plus, les abondances relatives et les transcriptomes des sous-types de monocytes circulants sont modifiés

dans divers cancers humains ^{48,95-97}. Un rôle des exosomes dans la polarisation des monocytes en contexte tumoral a également été proposé, avec des fonctions opposées pro- ou anti-tumorales selon les études ^{98,99}. Il reste très délicat de définir le moment où un monocyte devient un macrophage, mais il semble clair que la localisation tissulaire modifie le profil transcriptomique des monocytes. En effet, dans des tumeurs humaines du sein et de l'endomètre, TAM et monocytes présentent des signatures transcriptomiques distinctes, alors même que les premiers sont dérivés des seconds ⁴⁸.

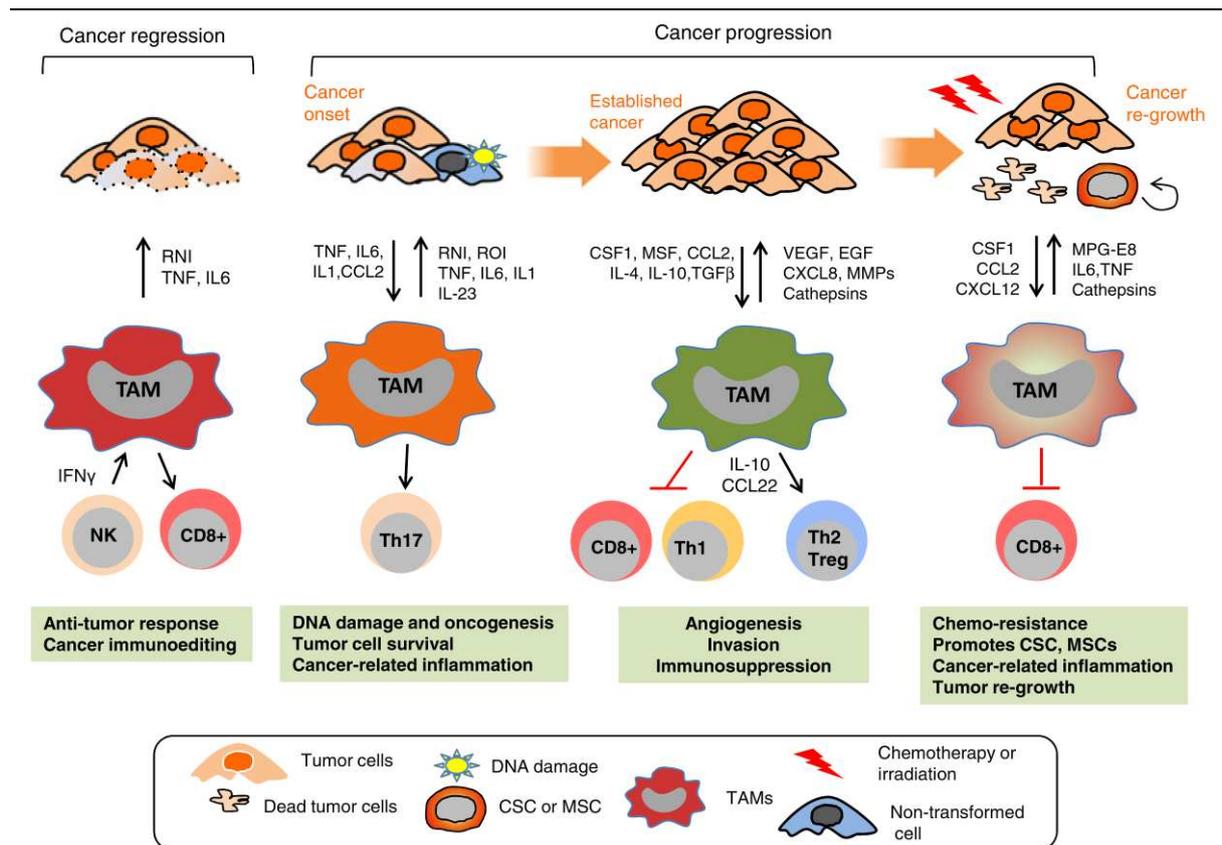


Figure 8 | Diversité et évolutivité des propriétés fonctionnelles des TAM au cours de la tumorigénèse

Les TAM peuvent présenter des fonctions variées et ambivalentes – pro- ou anti-tumorales – qui évoluent au cours du temps et avec la tumeur ainsi que son microenvironnement, influencées par des signaux environnementaux et les traitements reçus. Les TAM peuvent participer à la régression tumorale en produisant des cytokines inflammatoires et en soutenant la réponse T cytotoxique. Toutefois, la surveillance exercée par le système immunitaire entraîne une pression de sélection qui peut amener à l'émergence de clones tumoraux résistants (*immunoediting*). Lors de l'initiation de la tumeur, le contexte inflammatoire chronique, favorisant l'oncogénèse, peut a contrario polariser et être renforcé par les TAM. Au cours de l'évolution de la tumeur, les TAM vont accompagner la transition vers la malignité sous l'influence de cytokines régulatrices et de facteurs de croissance. Ils présenteront alors des propriétés pro-tumorales en favorisant l'angiogénèse, l'invasion tumorale et l'immunosuppression. Le phénotype des TAM sera également influencé par les traitements anti-cancéreux (chimiothérapie, immunothérapie) et par la clairance des cellules apoptotiques, ce qui en font des acteurs de la résistance au traitement et de la rechute. D'après Biswas et al., 2013 ¹⁰⁰.

Cette capacité à recruter et polariser précocement les monocytes, au niveau systémique et par le biais de la MO, va notamment être exploitée par la tumeur primaire pour la constitution de niches pré-métastatiques. Les monocytes recrutés et polarisés, alors appelés MAM, vont favoriser l'extravasation des cellules tumorales et la croissance métastatique²⁶. Le rôle spécifique de ces MAM a pu être démontré dans un modèle murin de cancer du sein métastatique, où leur ablation empêche le développement de métastases, même lorsqu'elle intervient après l'établissement des métastases¹⁰¹.

De nombreux acteurs, cellulaires ou non, influencent le phénotype des TAM par des mécanismes parfois redondants, variables d'une tumeur à l'autre et même au sein d'une niche tumorale. Les facteurs polarisant les TAM vont évoluer au sein d'une niche tumorale donnée – une tumeur n'est pas homogène et peut présenter plusieurs microenvironnements – et dans le temps, en fonction et avec l'évolution de la tumeur et les traitements^{10,100} (Figure 8).

1.2.5 Hétérogénéité des TAM à l'ère *single cell*

Les macrophages et TAM constituent un compartiment cellulaire d'une part imparfaitement délimité, en l'absence de marqueurs phénotypiques ubiquitaires et consensuels, d'autre part hautement hétérogène, avec une grande diversité fonctionnelle reposant sur l'ontogénie, la localisation tissulaire et les signaux microenvironnementaux. Ces caractéristiques ont pendant longtemps limité la caractérisation des macrophages en situation physiologique et dans le cancer, en particulier à grande échelle. L'avènement ces dernières années des techniques d'étude en haute résolution à l'échelle de la cellule unique, sur le plan phénotypique avec la cytométrie de masse (ou CyTOF – *cytometry by time of flight*) et sur le plan transcriptomique avec le séquençage ARN sur cellule unique (scRNASeq – *single cell RNA sequencing*) a changé la donne.

L'explosion du nombre d'études scRNASeq sur les TAM a confirmé l'impressionnante hétérogénéité de ces cellules, y compris au sein d'un type tumoral donné (Figure 9), mais a également mis en évidence l'existence de sous-populations de TAM présentant des traits fonctionnels communs malgré des divergences phénotypiques d'une tumeur à l'autre^{40,102-104}. En permettant de déterminer le transcriptome de chacune des cellules analysées, l'approche scRNASeq a confirmé la diversité et complexité de l'activation des TAM. Par exemple, plusieurs populations de TAM cohabitent dans le cancer du sein ont été décrites, tantôt de type M1 (TAM exprimant *CXCL10*), tantôt de type M2 (TAM exprimant *SIGLEC1/CD169* et TAM exprimant *EGR1*), tantôt proches de macrophages associés aux lipides (TAM exprimant *FABP5* et TAM exprimant *APOE*). De manière intéressante, les TAM *FABP5* expriment également les points de contrôle immunitaires (IC – *immune checkpoints*) *PDL1* et *PDL2* (*programmed cell death 1 ligand 1* et 2), leur conférant probablement des propriétés immunorégulatrices expliquant leur association à un pronostic péjoratif, alors même que leur signature transcriptomique n'est pas celle de TAM de

type M2 ¹⁰⁵. Cela souligne le caractère réducteur et obsolète de la classification M1/M2, a minima dans le cadre des propriétés pro- ou anti-tumorales des TAM, et l'intérêt de décrypter les différentes sous-populations macrophagiques.

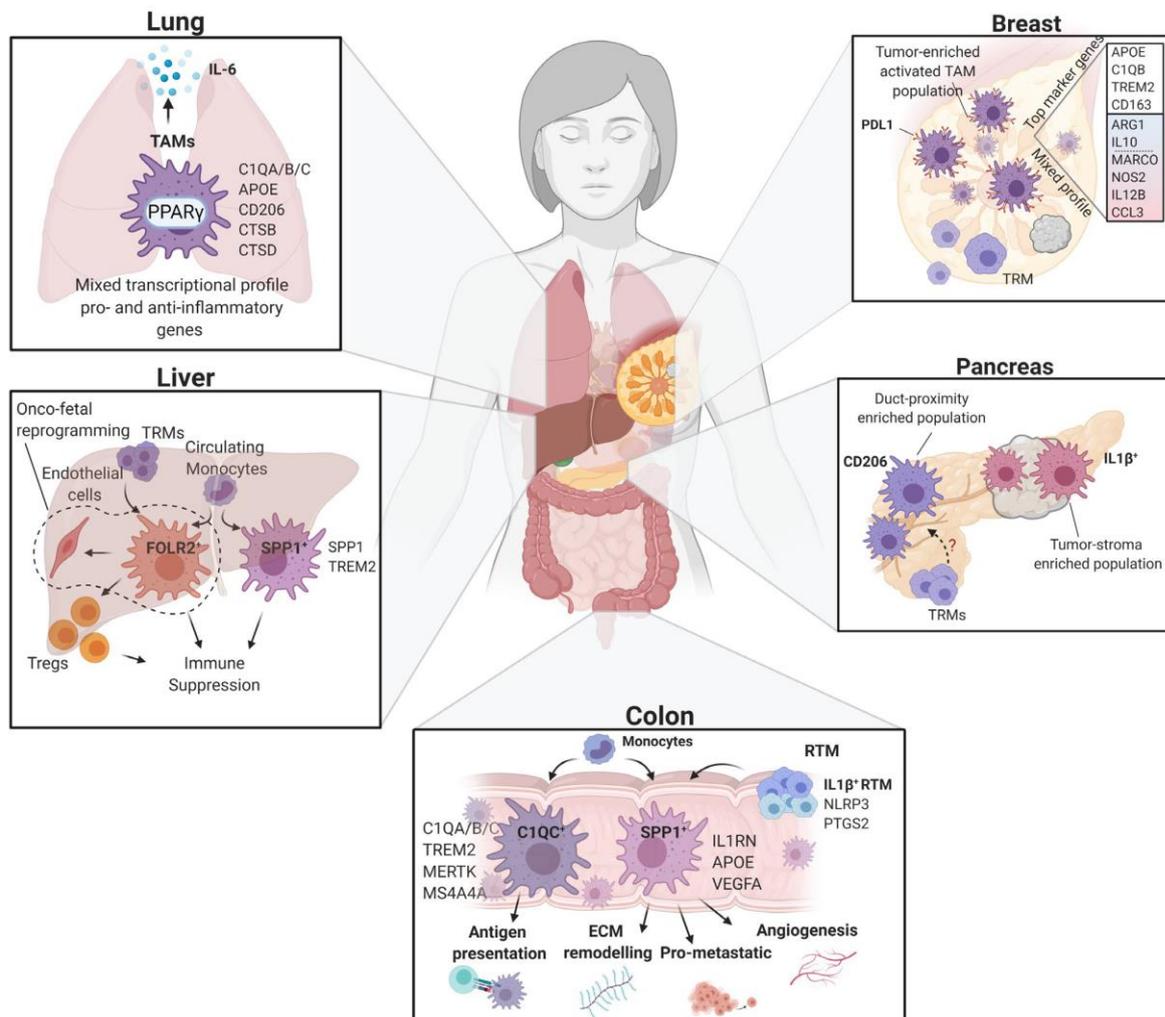


Figure 9 | Hétérogénéité des TAM humains révélée par les études de séquençage ARN à l'échelle de la cellule unique

Dans les tumeurs du sein, les TAM présentent un profil transcriptomique à la fois pro- et anti-inflammatoire, en exprimant notamment *APOE*, *C1QB*, *TREM2*, et *CD163*. Dans l'adénocarcinome du pancréas, 2 sous-types de TAM avec une localisation spatiale distincte ont été identifiés : une population *CD163*^{pos}*MS4A4A*^{pos} est principalement située dans les canaux pancréatiques, alors que des TAM *IL1β*^{pos} sont retrouvés dans le parenchyme. Deux sous-types de TAM sont également retrouvés dans le cancer colorectal : les TAM *C1QC*^{pos} dérivent des monocytes *CD14*^{pos} et pourraient présenter des capacités de présentation antigénique ; les TAM *SPP1*^{pos} proviendraient soit des monocytes soit des macrophages résidents, expriment *IL1B*, *NLRP3*, et *PTGS2*, et soutiennent la progression tumorale en promouvant l'angiogenèse et le remodelage de la matrice extracellulaire. Dans le carcinome hépatocellulaire, une population de TAM *SPP1*^{pos} issue de monocytes et présentant des propriétés immunomodulatrices coexiste avec des TAM *FOLR2*^{pos} issus de monocytes et de macrophages résidents, supportant l'immunosuppression en interagissant avec les cellules T régulatrices. Dans le cancer du poumon, les macrophages co-expriment des marqueurs pro- et anti-inflammatoires, comme *IL6* et *PPARγ*. D'après Caronni et al., 2021⁴⁰.

Les études réalisées indépendamment dans des types de tumeurs distincts conduisent à l'identification de diverses populations de TAM. Une revue récente propose une nomenclature

unifiée en répertoriant 7 populations de TAM et 3 populations de monocytes infiltrant les tumeurs (TIM – *tumor infiltrating monocytes*) retrouvées dans de multiples types de cancers¹⁰³ (Tableau 1).

Tableau 1 | **Populations de macrophages et de monocytes identifiés au sein de tumeurs humaines par les études *single cell*** (scRNASeq, CyTOF, CITE-Seq, IMC). D'après Ma et al., 2022¹⁰³.

Annotation	Signature	TF	Types de cancer	Fonctionnalité, voies de signalisation
IFN-TAM	<i>CASP1, CASP4, CD40, IDO1, CCL2/3/4/7/8, CD274^{hi}, CXCL2/3/9/10/11, IFI6, IFIT1/2/3, IFITM1/3, IRF1, IRF7, ISG15, LAMP3, CD273^{hi}, TNFSF10, C1QA/C, TNFSF10, CD38, IL411, ISG15, IFI44L CD14^{pos}, CD11b^{pos}, CD68^{pos}, PDL1^{hi}, PDL2^{hi}, CD80^{hi}, CD86^{hi}, MHCII^{hi}, CD86^{pos}, MRC1^{neg}, SIGLEC1^{neg}, HLA-DR^{lo}, CD314^{pos}, CD107a^{pos}, CD86, TLR4, CD44</i>	STAT1 IRF1/7	sein CRC GBM CHC VADS lymphome mélanome MM NSCLC OS PDAC thyroïde endomètre	Régulation de l'apoptose Soutien à la prolifération tumorale Réponse inflammatoire Recrutement Treg Immunosuppression Co-localisation avec les T épuisés Diminution de la présentation antigénique Voies réponse IFN α /IFN γ ; IL2/STAT5 ; IL6/JAK/STAT3
Inflam-TAM	<i>CCL2/3/4/5/20, CCL3L1, CCL3L3, CCL4L2, CCL4L4, CXCL1/2/3/5/8, GOS2, IL1B, IL1RN, IL6, INHBA, KLF2/6, NEDD9, PMAIP1, S100A8/A9, SPP1</i>	EGR3 IKZF1 NFKB1 NFE2L2 REL	CRC OS estomac	Recrutement et régulation de cellules immunitaires Pro-inflammatoires Recrutement neutrophiles Interaction avec les T Voies TNF ; WNT
LA-TAM	<i>ACP5, AOPE, APOC1, ATF1, C1QA/B/C, CCL18, CD163, CD36, CD63, CHI3L1, LGALS3, CTSB/D/L, F13A1, FABP5, FOLR2, GPNMB, IRF3, LIPA, LPL, MARCO, MERTK, NR1H3, MMP7/9/12, MRC1, TREM2, NRF1, NUPR1, PLA2G7, SPARC, RNASE1, ZEB1, SPP1, TFDP2 CD9^{pos}, CD80^{pos}, CD163^{lo/neg}, CD206^{pos/lo}, CD71^{pos}, CD72^{pos}, CD73, ICOSL, CD40LG, Thy-1, MAF</i>	FOS/JUN HIF1A MAF/ MAFB NR1H3 TCF4 TFEC	sein CRC GBM estomac CHC VADS NSCLC OS PDAC	Phagocytose Synthèse et dégradation de la MEC Activation du complément Présentation antigénique Biosynthèse de l'ATP Voies canoniques M2 Métabolisme des acides gras Immunosuppression Inflammation Signalisation ions fer
Angio-TAM	<i>ADAM8, AREG, BNIP3, CCL2/4/20, CD44, CD55, CD163, CD300E, CEBPB, CLEC5A, CTSB, EREG, FCN1, FLT1, FN1, HES1, IL1B, IL1RN, IL8, MAF, MIF, NR1H3, OLR1, PPARG, S100A8/9/12, SERPINB2, SLC2A1, SPIC, SPP1, THBS1, TIMP1, VCAN, VEGFA CD52^{hi}, CD163^{hi}, CD206^{hi}, CXCR4^{pos}, CD354^{pos}, FOSL2, CEBPB, MARCO, VEGFA</i>	BACH1 CEBPB FOSL2 HIFA KLF5 MAF NFKB1 NR1H3 RUNX1 SPIC TEAD1 ZEB2	sein CRC, CHC ESCA, GBM estomac mélanome VADS NSCLC ovaire PDAC rein thyroïde endomètre	Angiogenèse Interaction avec les CAF Synthèse et dégradation de la MEC Voies HIF; NF-kB ; Notch ; VEGF Adjacents aux cellules endothéliales PLVAP ^{pos} /DLL4 ^{pos}
Reg-TAM	<i>CCL2, CD274, CD40, CD80, CD86, CHIT1, CX3CR1, ICOSLG, IL-10, HLA-A/C, HLA-DQA1/B1, HLA-DRA/B1/B5, ITGA4, LGALS9, MARCO, MRC1, TGFB2</i>	-	CRC, PDAC sein, rein gliome vessie estomac CHC, peau NSCLC lymphome mélanome ovaire	Suppression des T Présentation antigénique <i>Immune checkpoints</i>

Annotation	Signature	TF	Types de cancer	Fonctionnalité, voies de signalisation
Prolif-TAM	<i>CCNA2, CDC45, CDK1, H2AFC, HIST1H4C, HMGB1, HMG2, MKI67, RRM2, STMN1, TOP2A, TUBA1B, TUBB, TYMS</i>	E2F	CRC, GBM NSCLC estomac ovaire prostate	Cycle cellulaire Prolifération Voies de la mitose
TRM-TAM	Küppfer-like	-	CHC	Voies de l'inflammation
	Alvéolaire TRM-like	-	NSCLC	Pro-inflammatoires
	Microglie-like	-	GBM gliome	Sécrétion de TNF, CCL4, CCL2 Suppression des T
	MT-TRM-like	-	CRC CHC NSCLC prostate	Homéostasie du zinc Méthallothionéine Soutien des lymphocytes B BAFF-R ^{pos} dans le cancer de la prostate
	Interstitiel TRM-like	-	CRC, ESCA CHC, rein estomac thyroïde endomètre	-
cMo	<i>S100A4/6/8/9/12/13, AREG, CCL4, CCR2, CD14, CD300E, CD36, CEBPD, CLEC11A, CTSS, CLEC12A, CSF1R, CX3CR1, CXCL2, CXCR4, EGFR, FCN1, FOS, FTH1, IL1B, ITGAM, JUNB, LGALS2, LY6C1, LY6C2, LYZ, MAF, MAFB, PEG1, NFKB1, NFKBIA, NLRP3, NR4A1, NR4A2, OSM, PTGS2, RGS2, SELL, THBS1, VCAN</i> CD14 ^{hi} , CD16 ^{neg} , CCR2 ^{pos}	CEBPD	VADS, rein ESCA, sein lymphome mélanome ovaire, MM estomac thyroïde endomètre NSCLC CRC, PDAC prostate OS, CHC	Diminution de la présentation antigénique Cytokines inflammatoires Voies réponse IFN ; TGFβ ; TNF
ncMo	<i>CX3CR1, CCL5, CD52, CDH23, CDKN1C, FCGR3A/3B, FCGR4, GNLY, GZMB, ICAM2, IFITM1, IL32, KLRC4-KLRK1, LILRA/B1, MS4A7, MTSS1, PRF1, SLC44A2</i> CD14 ^{neg} , CD16 ^{pos}	CEBPD ZFP36L2	CRC CHC VADS NSCLC	Enrichi dans le tissu sain adjacent
intMo	<i>CCL2/8, CX3CR1, CXCL10, FCGR3A, IFITM2, IL1RN, IRF7, ISG15/20, LILRB1/A1, MS4A7, MTSS1, RHOC, SERPINA1, SIGLEC10, STAT1, TCF7L2, TNFSF10, TNFSF13B</i> CD14 ^{int} , CD16 ^{pos}	-	sein CRC CHC VADS NSCLC PDAC	Induisent les Reg-TAM Voie réponse IFNγ Enrichi dans le tissu sain adjacent

Gènes en gras : gènes-clés retrouvés dans plus d'une publication. TAM : macrophages associés au cancer ; IFN-TAM : TAM activés par l'interféron ; Inflam-TAM : TAM enrichis en cytokines inflammatoires ; LA-TAM : TAM associés aux lipides ; Angio-TAM : TAM pro-angiogéniques ; Reg-TAM : TAM immunorégulateurs ; Prolif-TAM : TAM proliférants ; TRM-TAM : TAM similaires aux TRM (macrophages résidents des tissus) ; MT : méthallothionéine ; cMo : monocytes classiques ; ncMo : monocytes non classiques ; intMo : monocytes intermédiaires ; CAF : fibroblastes associés au cancer ; CRC : cancer colorectal ; ESCA : carcinome de l'oesophage ; GBM : glioblastome ; MEC : matrice extracellulaire ; CHC : carcinome hépatocellulaire ; MM : myélome multiple ; NSCLC : cancer bronchique non à petites cellules ; OS : ostéosarcome ; PDAC : adénocarcinome pancréatique ; VADS : voies aérodigestives supérieures.

Il est également possible d'évaluer les modifications du TME en général et des TAM en particulier au cours de l'évolution du cancer, en multipliant les analyses scRNASeq : au diagnostic, après traitement, à la rechute. Ainsi, l'accumulation de TAM de type M2 exprimant *CD163* et *FOLR2* a été mise en évidence dans les stades avancés de carcinome rénal ¹⁰⁶. Le scRNASeq a également rendu possible l'étude de l'ontogénie des TAM humains, notamment grâce à des approches d'homologie avec des modèles murins dans lesquels l'origine des TAM est bien caractérisée ³⁵.

Les progrès technologiques, incarnés notamment par le CITE-Seq (*cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing*, qui combine scRNASeq et étude phénotypique quantitative et qualitative des protéines de surface par l'utilisation d'anticorps couplés à des séquences nucléotidiques) et par l'imagerie de masse (IMC – *imaging mass cytometry*, qui permet d'ajouter une composante spatiale au CyTOF), devraient permettre d'accroître encore la caractérisation de l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des TAM, ainsi que leurs relations avec les cellules de l'environnement tumoral.

Ces travaux de décryptage du compartiment macrophagique dans le cancer restent toutefois principalement limités aux tumeurs solides, et sont bien souvent principalement descriptifs. Un important travail de dissection des populations de macrophages des tumeurs, y compris hématologiques, et de leurs fonctions reste à effectuer.

1.3 Les macrophages, membres pivots de la niche tumorale

1.3.1 Niche tumorale et texture immunitaire

Une tumeur est une structure hétérogène en termes de composition cellulaire et spatiale. On parle volontiers d'environnement, de microenvironnement, ou de niche tumorale (TME) pour qualifier l'ensemble des éléments, cellulaires ou non, qui accompagnent les cellules tumorales. Au sein de ce TME on trouve en particulier des cellules immunitaires, dont les macrophages sont les premiers représentants dans de nombreuses tumeurs solides. Le TME ne se limitant pas aux cellules de l'immunité, puisqu'on peut y trouver des fibroblastes et des cellules endothéliales vasculaires ou lymphatiques, on parle plus précisément de microenvironnement tumoral immun (TIME) ²⁵.

La diversité des types cellulaires, de leur densité, orientations fonctionnelles et localisation en fonction et au sein de la tumeur ont des implications pronostiques et thérapeutiques majeures, qui ont amené à l'émergence du concept de texture immunitaire (*immune contexture*). La texture immunitaire inclut le foyer tumoral, la marge d'invasion, les structures lymphoïdes tertiaires (SLT), et l'ensemble du TME ¹⁰⁷. Le rôle ambivalent (pro- et anti-tumoral) du système immunitaire au cours du cancer a été historiquement souligné dans le mélanome, où deux types de textures immunitaires archétypales ont été décrites, avec des répercussions pronostiques.

D'une part, les tumeurs infiltrées par les lymphocytes T sont constituées de nombreux lymphocytes T CD8 effecteurs, recrutés par des cytokines inflammatoires mais non fonctionnels dans un contexte immunosuppresseif notamment médié par des TAM au phénotype régulateur. Ces tumeurs, parfois appelées « chaudes » (*hot*) répondent favorablement à l'immunothérapie qui permet de lever les freins immunosuppresseifs. D'autre part, dans les tumeurs non infiltrées par les lymphocytes T, ces derniers ne sont pas recrutés et sont tenus à distance de la tumeur en raison d'une importante fibrose médiée par les CAF et des TAM au phénotype réparateur. Ces tumeurs « froides » (*cold*) répondent mal à l'immunothérapie ¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

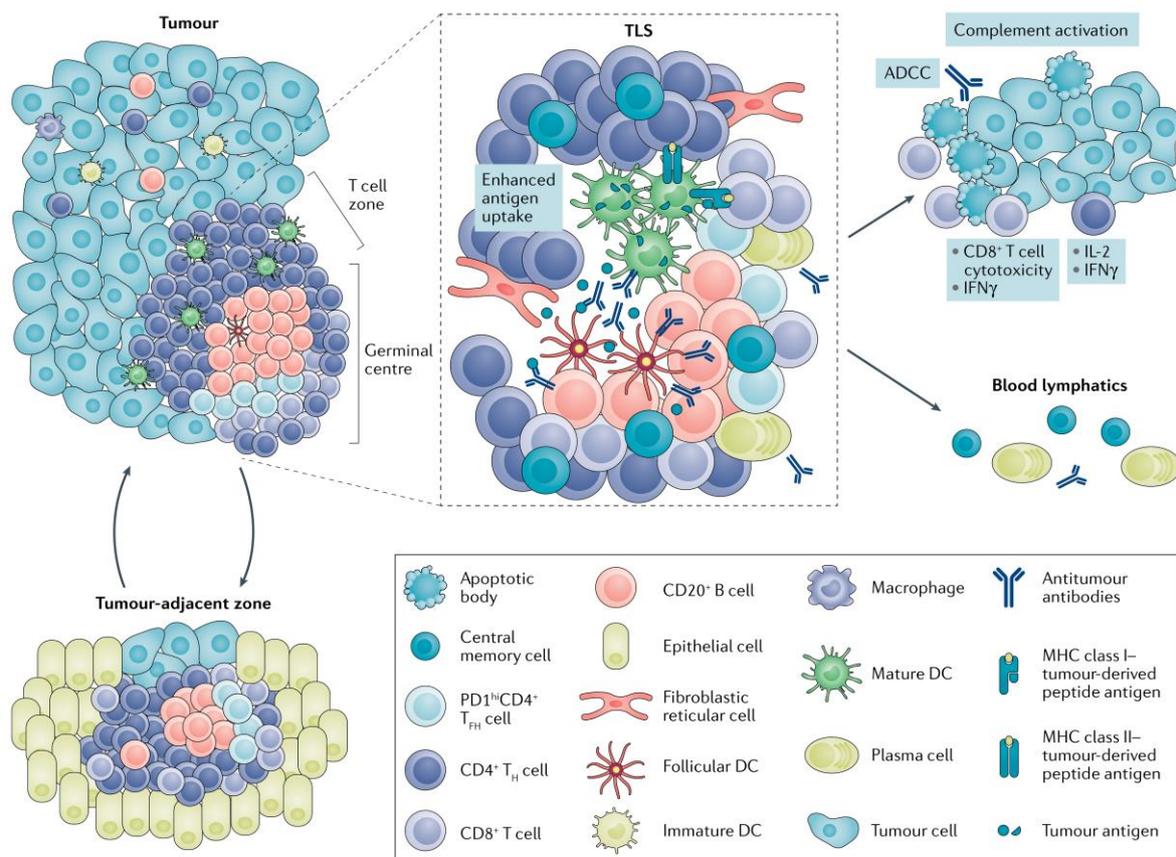


Figure 10 | **Composition et fonctionnement des organes lymphoïdes tertiaires dans le cancer**

Les structures lymphoïdes tertiaires (SLT) sont des organes lymphoïdes ectopiques comparables aux organes lymphoïdes secondaires, apparaissant dans des contextes d'inflammation chronique, notamment le cancer. Est représentée ici une SLT localisée dans une tumeur, composée d'une zone T contenant des cellules dendritiques LAMP^{pos} et des cellules fibroblastiques réticulaires (FRC), et d'une zone B avec un centre germinatif contenant des lymphocytes B, des cellules folliculaires dendritiques (FDC), et des anticorps reconnaissant les antigènes tumoraux.

La coopération de lymphocytes T CD8 cytotoxiques et de lymphocytes B présents dans la TLS permet la destruction de la tumeur *in situ* par cytotoxicité directe sur les cellules malignes et par cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC) assurée par les macrophages et les lymphocytes NK. De plus, les lymphocytes T et B mémoires générés au sein des SLT pourront circuler et protéger des métastases. Dans certains cancers toutefois, les SLT localisés dans des régions inflammatoires adjacentes à la tumeur pourraient constituer des niches favorables pour des clones tumoraux responsables de la rechute. D'après Sautès-Fridman et al., 2019 ¹¹¹.

Différentes contextures immunitaires sont retrouvées dans de nombreuses tumeurs solides, avec un impact pronostique et prédictif majeur, qui peut être pris en compte dans l'évaluation initiale du patient et les choix thérapeutiques. Cela pourrait permettre d'améliorer le taux de réponse à l'immunothérapie, aujourd'hui estimé à 20-40% des patients ¹⁰⁸. Ainsi, la présence de SLT est décrite comme de bon pronostic, et corrélée à la réponse à l'immunothérapie ¹¹²⁻¹¹⁴ (Figure 10).

En outre, les métastases se développent au sein d'une niche tumorale distincte de celle de la tumeur primaire, parfois dénommée TME des métastases (TMEM) ²⁶. Les ganglions lymphatiques (LN – *lymph nodes*) sont les premiers sites métastatiques atteints par l'évasion tumorale ^{115,116}, et voient leur architecture perturbée dans ce contexte, avec notamment une accumulation de MDSC/MAM qui favorisent la formation d'une niche immunosuppressive ^{117,118}.

En termes de nombre comme de fonctionnalité, les macrophages constituent une population centrale au sein des niches tumorales primaires et secondaires.

1.3.2 Mécanismes pro-tumoraux médiés par les TAM

Les TAM vont médier de multiples mécanismes pro-tumoraux, en soutenant directement les cellules tumorales, en dialoguant avec les autres acteurs de la niche sur lesquels ils peuvent exercer des effets immunosuppresseurs directs ou indirects, ou encore en soutenant indirectement la tumeur via des mécanismes non liés à l'immunomodulation. Si l'ensemble de ces mécanismes, immunosuppresseurs ou non, sont parfois communs aux TAM et aux M-MDSC (voire même dans une moindre mesure partagés par les DC, bien que ces dernières soient moins pro-tumorales que dysfonctionnelles dans le cancer ¹¹⁹), on s'attachera ici à présenter les effets pro-tumoraux décrits chez les TAM.

1.3.2.1 Soutien direct aux cellules tumorales

Les TAM peuvent interagir directement avec les cellules tumorales, en les protégeant de la réponse immune anti-cancéreuse et en soutenant la croissance tumorale.

En exprimant SIRP α (*signal-regulatory protein alpha*), une protéine membranaire régulatrice dont le ligand CD47 (également appelée « *don't-eat-me* » *signal*, soit signal « ne-me-mange-pas »), peut être exprimé par les cellules tumorales, les TAM verront leur capacité de phagocytose des cellules tumorales inhibée.

Les fonctions trophiques et réparatrices des macrophages peuvent être détournées par la tumeur pour soutenir son développement. Cela a notamment été proposé dans le cancer du sein, où des TAM pro-tumoraux similaires aux TRM des canaux galactophores, en charge de la surveillance de l'épithélium et du remodelage des glandes mammaires, ont été décrits ¹²⁰. À l'instar de leur pendant physiologique, les TAM seraient également impliqués dans le maintien

des niches de cellules souches tissulaires, par la mise en place d'un dialogue aberrant TAM-cellules souches cancéreuses (CSC – *cancer stem cells*)^{40,121-123}. Ainsi, dans un modèle murin de carcinome épidermoïde, il a été démontré que les CSC produisent de l'IL-33, induisant l'émergence d'un sous-type de TAM FcεR1^{pos} producteur de TGFβ, qui va amplifier l'activation des CSC et la production d'IL-33 dans une boucle de rétrocontrôle positif¹²⁴. Dans l'adénocarcinome pulmonaire, les TAM PD1^{pos} favoriseraient un phénotype de type CSC des cellules tumorales de manière PD1 dépendante¹²⁵. Les TAM peuvent en outre contribuer à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT – *epithelial-mesenchymal transition*) des cellules tumorales – processus de conversion phénotypique au cours duquel elles perdent leur jonctions cellules-cellules et acquièrent des capacités de motilité¹²⁶ – en sécrétant notamment de l'IL-1β, de l'IL-8, ou Wnt5^{121,127-129}. Enfin, au sein du TMEM, les TAM soutiennent le processus métastatique en intervenant au sein d'une boucle paracrine par la production de ligands de la famille EGF qui vont favoriser la migration et la production de CSF1 des cellules tumorales, qui vont en retour soutenir le recrutement et la survie des TAM¹³⁰.

1.3.2.2 Activités immunosuppressives

De nombreux mécanismes pro-tumoraux des TAM sont liés à la dysfonction immune qu'ils peuvent induire. Ces mécanismes immunosuppresseurs peuvent inhiber directement l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD8 effecteurs et NK, ou indirectement, via l'induction et le recrutement d'autres cellules régulatrices^{25,123} (Figure 11). Les TAM sont considérés comme une population suppressive essentielle au sein du TME, et leur déplétion permet de déclencher des réponses T anti-tumorales dans plusieurs conditions thérapeutiques^{25,131}.

Activités immunosuppressives directes

Plusieurs études fonctionnelles *ex vivo* ont pu démontrer la capacité des TAM à inhiber la prolifération des lymphocytes T naïfs^{25,71,132,133}. Cela pourrait reposer sur la production d'arginase 1 (ARG1), responsable de la dégradation de l'arginine nécessaire à la fonctionnalité T^{22,134,135}. Il est toutefois à noter que l'ARG1 pourrait également favoriser directement la croissance tumorale en fournissant des polyamines aux cellules tumorales¹³⁶. De plus, chez l'humain, l'ARG1 semble davantage produite par les granulocytes, y compris les PMN-MDSC^{137,138}. Un autre mécanisme incriminé est l'expression de l'oxyde nitrique synthase (NOS2/iNOS) productrice de monoxyde d'azote (NO) par les TAM^{132,133,139}. Le NO peut avoir un effet suppressif sur les T, directement ou via la production secondaire de peroxy-nitrite (ONOO-) qui va bloquer l'interaction du récepteur T avec le complexe majeur d'histocompatibilité par nitration de ces protéines^{140,140,141}.

La plupart des données chez l'humain orientent vers un rôle majeur des ligands des points de contrôle immunitaires (IC – *immune checkpoints*) dans l'inhibition directe des lymphocytes T par les TAM. En effet, dans de nombreuses tumeurs, les TAM expriment PDL1, et la réponse aux

inhibiteurs de l'interaction PD1(*programmed cell death 1*)-PDL1 est corrélée spécifiquement au niveau d'expression macrophagique de PDL1 ^{142,143}. De plus, le niveau d'expression de PDL1 par les TAM est négativement corrélé à la survie des patients ¹⁴². Outre PDL1, B7-H4 est une autre molécule IC surexprimée par les TAM dans de nombreuses tumeurs et inhibant la prolifération et la production d'IL-2 des lymphocytes T, via la liaison à un ligand inconnu ^{137,144,145}. Le rôle pro-tumoral de B7-H4 reste toutefois discuté et semble varier en fonction des modèles d'étude ^{146,147}.

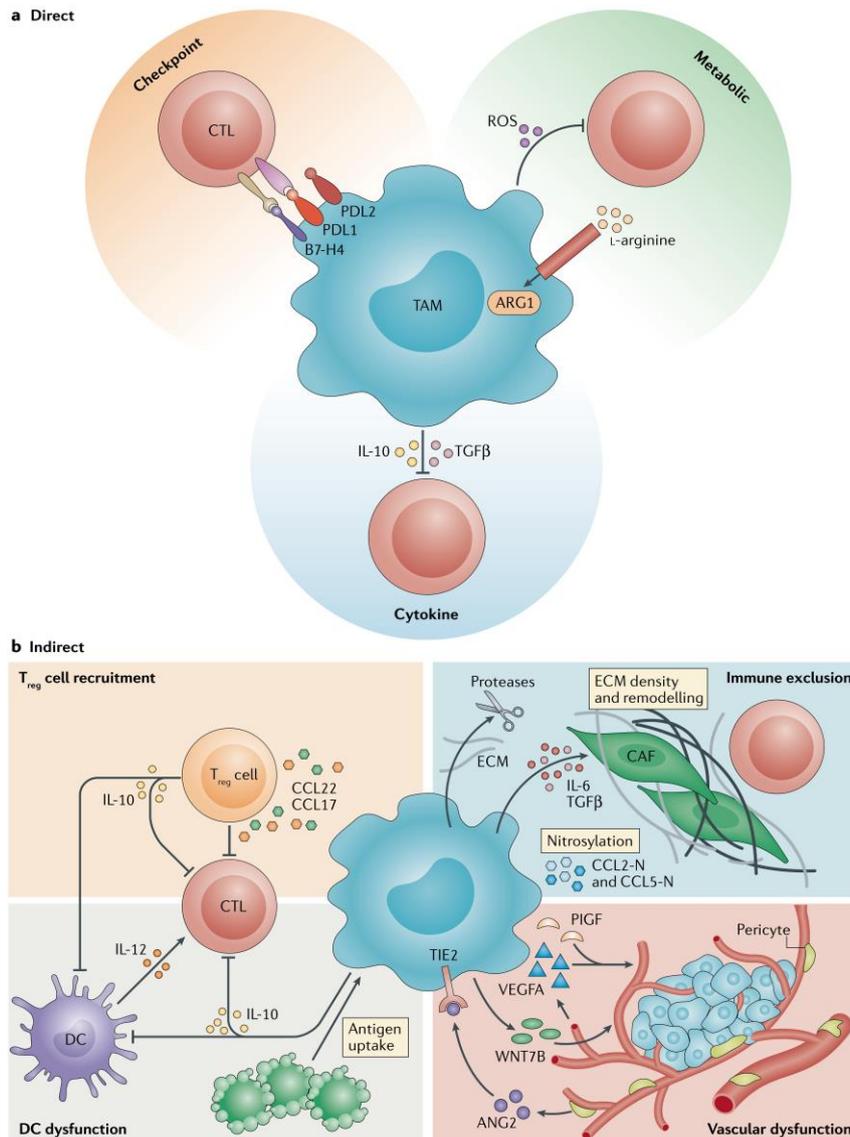


Figure 11 | **Multiples mécanismes pro-tumoraux directs et indirects des TAM**

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) peuvent inhiber directement ou indirectement la réponse anti-tumorale. a) Mécanismes d'inhibition directe des lymphocytes T : engagement des points de contrôle immunitaire par l'expression de molécules comme PDL1, production de cytokines inhibitrices comme IL-10 ou TGFβ, inhibition de l'activité métabolique par déplétion en métabolites comme la L-arginine ou par production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). b) Mécanismes d'inhibition indirecte des lymphocytes T : recrutement d'autres populations immunosuppressives telles que les lymphocytes T régulateurs (Treg), inhibition de populations immunocompétentes telles que les cellules dendritiques (DC), autres mécanismes non immuns comme la régulation de la vascularisation et de la matrice extra-cellulaire (ECM), ou la production de chimiokines influençant le phénotype des fibroblastes associés au cancer (CAF). D'après DeNardo & Ruffell, 2019 ²⁵.

Par ailleurs, les TAM peuvent constituer une source importante de la cytokine immunomodulatrice IL-10 au sein du TME, cytokine qui inhibe l'activité T cytotoxique en bloquant la co-localisation du récepteur T et de la protéine CD8^{148,149}. Enfin, les TAM expriment à leur surface un grand nombre de lectines de types C et I, parmi lesquelles CD206 est un marqueur emblématique de TAM. Il a été montré que CD206 bloque la fonctionnalité T cytotoxique en interagissant directement avec CD45 et en inhibant son activité phosphatase¹⁵⁰. Les interactions protéines-glucides médiées par les lectines exprimées par les TAM pourraient jouer un rôle important mais encore peu évalué dans leur activité immunosuppressive, au vu de la place des modifications des glucides dans la signalisation T²⁵.

Activités immunosuppressives indirectes

Au-delà de leur effet immunosuppressif direct, plusieurs études ont montré que les TAM pouvaient empêcher le recrutement des T cytotoxiques à la tumeur^{148,151-153}. Cela serait lié à la production de peroxy-nitrite responsable de la nitration des chimiokines CCL2 et CCL5, qui semblent alors incapables de recruter spécifiquement les lymphocytes T, sans effet sur la migration des monocytes¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Les TAM pourraient aussi influencer la localisation intra-tumorale des lymphocytes T, en participant à leur exclusion du foyer tumoral et à leur rétention en périphérie de la tumeur. Ainsi, inhiber les espèces réactives de l'azote (RNS – *reactive nitrogen species*) et la production de peroxy-nitrite permet d'augmenter la densité de lymphocytes T CD8 au sein du foyer tumoral sans modifier leur abondance en périphérie de la tumeur¹⁵⁵. Un mécanisme similaire d'exclusion des lymphocytes T a pu être décrit chez la souris et l'humain sous l'effet du TGFβ^{157,158}, dont les TAM sont d'importants producteurs au sein du TME¹³³. Puisque les TAM et les lymphocytes T sont majoritairement situés en périphérie du foyer tumoral, on peut également imaginer que les premiers retiennent les seconds à distance du foyer tumoral via la production de CXCL10^{25,133}.

Par ailleurs, il a été démontré que les TAM peuvent recruter des lymphocytes T régulateurs (Treg) via la production de CCL22¹⁵⁹. Ces Treg vont à leur tour présenter des propriétés immunosuppressives directes mais aussi stimuler l'expression d'IL-10 et de B7-H4 par les TAM⁶⁵. Les TAM peuvent également inhiber indirectement la réponse T CD8 en inhibant l'expression d'IL-12 par les cDC via la production d'IL-10¹⁴⁸. De plus, dans un modèle murin d'adénocarcinome pancréatique (PDAC – *pancreatic ductal adenocarcinoma*), il a été montré que la production de TNFα par les TAM inhibe la production d'IL33 par les cellules carcinomateuses, avec pour conséquence une inhibition des DC et des lymphocytes T cytotoxiques¹⁶⁰.

Fidèle à leur dénomination, les macrophages forment le premier contingent de cellules phagocytaires dans le cancer¹⁶¹. Toutefois, ils n'expriment pas CCR7, sont incapables de migrer au ganglion et sont peu efficaces pour activer les lymphocytes T CD8, un rôle anti-tumoral qui

semble en premier lieu tenu par une rare population de cDC CD103^{pos} 161–163. Les TAM pourraient donc indirectement brider l'induction de la réponse immune adaptative en soustrayant les antigènes tumoraux aux cDC. De plus, leur rôle essentiel dans la clairance des cellules apoptotiques et des débris cellulaires permettrait à la fois de réduire la quantité de DAMP au sein du TME, et de limiter leur propre activation 90,164,165.

1.3.2.3 Activités protumorales indirectes non liées à l'immunomodulation

Les effets pro-tumoraux indirects ne se limitent pas à l'immunomodulation : angiogenèse et vasculogenèse, remodelage matriciel favorisant progression tumorale, métastases et exclusion immune sont autant de processus pouvant être soutenus par les TAM et les MAM 25,26,123.

Les TAM jouent un rôle majeur dans l'angiogenèse, phénomène indispensable à la progression tumorale et au processus métastatique 166. Des travaux menés sur un modèle murin de cancer du sein l'ont souligné en montrant que la déplétion des TAM empêchait le « switch angiogénique », caractéristique du passage à la malignité des tumeurs bénignes 167. De la même manière, dans un autre modèle murin, la néoangiogenèse de tumeurs gliales humaines xéno greffées est abolie en l'absence de TAM Tie2^{pos} ou en bloquant leur recrutement par les cellules endothéliales productrices d'angiopoïétine 2 (Ang2), ligand de Tie2 94,168,169. Le « switch angiogénique » et l'angiogenèse tumorale sont avant tout induits par l'hypoxie, les TAM en sont les médiateurs essentiels. Nous l'avons vu, les TAM vont être recrutés et polarisés en contexte hypoxique via des facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie (HIF) 49,71,72,167,170. Ils vont en conséquence acquérir des fonctions immunosuppressives mais aussi pro-angiogéniques, via la sécrétion notamment de WNT7b, TGFβ, βFGF 167,170,171. Même en l'absence d'angiogenèse locale, les TAM périvasculaires qui s'accumulent sur le front d'invasion tumorale favorisent l'intravasation des cellules tumorales et leur échappement de la tumeur primaire par la circulation sanguine 172. De surcroît, le rôle central des MAM dans l'initiation de la niche métastatique repose en grande partie sur leur capacité à produire du VEGFA, avec pour effet d'augmenter la perméabilité capillaire, ce qui permet l'extravasation tissulaire des cellules tumorales 173,174.

En tant que producteurs de métalloprotéinases matricielles (MMP), en particulier MMP2, MMP7 et MMP9, les TAM contribuent au remodelage de la MEC nécessaire à la néoangiogenèse et à l'invasion tumorale, au niveau de la tumeur primaire, comme au niveau métastatique 175. Outre les MMP, d'autres protéines matricielles régulées par les TAM peuvent intervenir dans ces processus. C'est le cas de la protéine ostéonectine (ou SPARC – *secreted protein acidic and rich in cysteine*), sécrétée par les TAM, dont le caractère indispensable à la migration tumorale et aux métastases a été démontré dans un modèle murin 176. Cela serait lié aux propriétés antiadhésives de SPARC au sein de la MEC, et pourrait expliquer que les souris déficientes pour le gène SPARC présentent une charge tumorale plus importante 177,178. Les TAM peuvent également présenter des

propriétés pro-fibrotiques, à l'origine de l'exclusion des lymphocytes T cytotoxiques du foyer tumoral, protégeant ainsi les cellules tumorales de la réponse immune. Ainsi, dans l'adénocarcinome du pancréas métastatique, des TAM producteurs de granuline favorisent l'accumulation de myofibroblastes^{179,180}.

Les multiples propriétés pro-tumorales des TAM sont le reflet pathologique du large spectre de fonctions des macrophages en situation physiologique. Leurs nombreuses interactions avec les cellules tumorales et avec l'ensemble des acteurs du TME font des TAM un membre pivot de la niche tumorale. Les travaux qui ont permis de révéler ces mécanismes pro-tumoraux soulignent l'importance des TAM dans la tumorigenèse, et par conséquent leur potentielle implication dans le pronostic et la prise en charge thérapeutique du cancer.

1.4 Des implications pronostiques et thérapeutiques majeures

Étudier l'hétérogénéité des TAM et leurs caractéristiques phénotypiques et transcriptomiques dans le cancer présente évidemment un intérêt majeur dans la prise en charge des patients, tant d'un point de vue pronostique que thérapeutique. À l'ère de la médecine personnalisée, le développement de nouvelles approches thérapeutiques et la sélection des patients pouvant en bénéficier repose sur une description fine de la tumeur et de sa niche. Le rôle prépondérant des TAM au sein de cette niche, ainsi que leur implication dans la réponse à l'immunothérapie, font de ces cellules une cible pronostique et thérapeutique de choix^{25,26,30,181}.

1.4.1 Rôles pronostiques et prédictifs

La place des TAM comme biomarqueurs pronostiques dans le cancer a été démontrée sur d'importantes cohortes de patients dès les années 90, en utilisant des approches de type immunohistochimie avec des marqueurs histologiques pan-macrophages comme CD68. Dans ces travaux, un grand nombre de TAM infiltrant la tumeur est classiquement associé à une moins bonne survie globale (OS – *overall survival*), mais avec des résultats parfois contradictoires, notamment en fonction des tumeurs considérées^{182,183}. Cependant, CD68 n'est spécifique ni des macrophages ni des TAM, et n'est pas non plus exprimé par l'intégralité des sous-populations macrophagiques. Le marqueur CD163, associé aux macrophages de type M2, est communément utilisé comme marqueur plus spécifique des TAM. L'utilisation de différents marqueurs histologiques pourrait également expliquer les résultats parfois discordants des études pronostiques portant sur les TAM.

Plus récemment, la démocratisation du séquençage ARN (RNASeq) a permis d'établir le caractère pronostique de signatures moléculaires associées aux TAM, obtenues en estimant leur abondance au sein de la tumeur à l'aide d'algorithmes de déconvolution ou bien en triant les cellules avant de procéder au séquençage. Ces travaux ont confirmé la corrélation entre

infiltration macrophagique, en particulier lorsqu'ils présentent un profil de type M2, et survie diminuée dans la majorité des tumeurs^{48,107,181,184}. Par exemple, une signature transcriptomique associée à des TAM exprimant *SIGLEC1/CD169* et *CCL8* a été décrite comme de mauvais pronostic dans le cancer du sein⁴⁸.

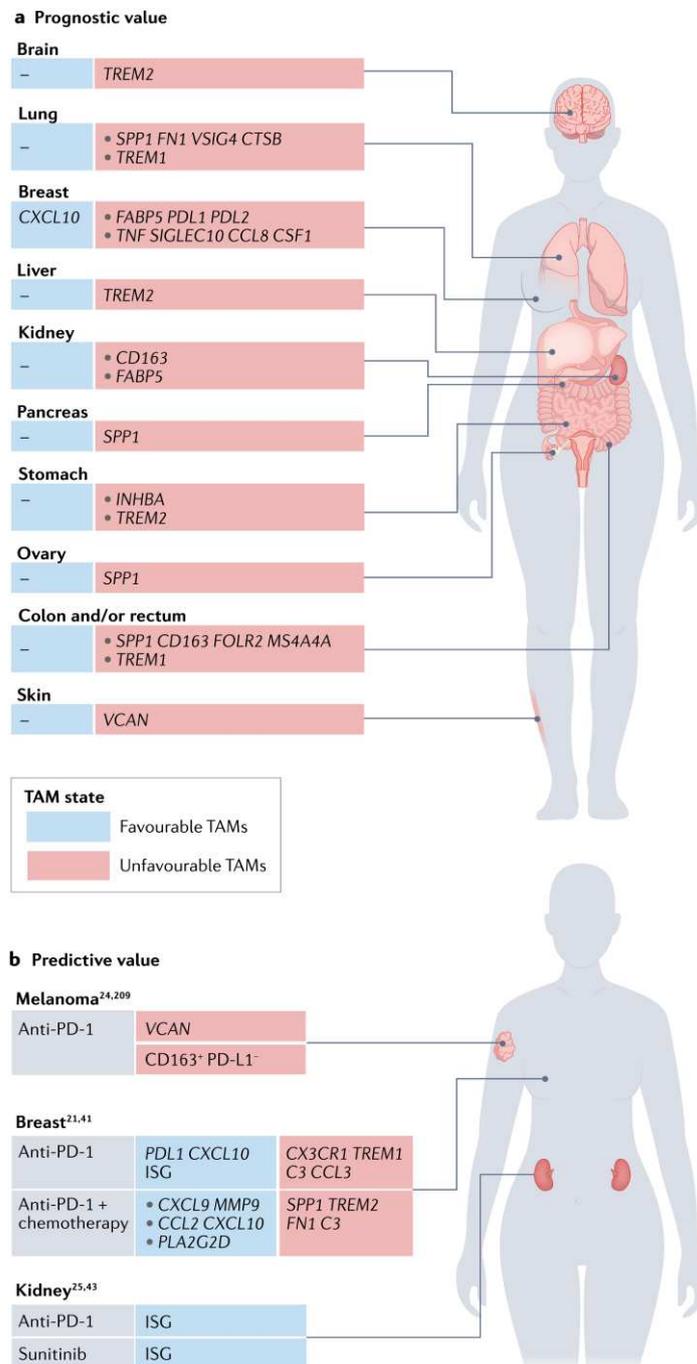


Figure 12 | Valeur pronostique et prédictive de marqueurs de TAM dans les tumeurs solides

a) Marqueurs pronostiques favorables ou défavorables associés aux TAM dans les tumeurs solides : une augmentation de l'abondance des TAM exprimant ces marqueurs est associée à une meilleure ou au contraire à une moins bonne survie globale des patients. b) Valeur prédictive de certains marqueurs TAM : une augmentation de l'abondance des TAM exprimant ces marqueurs est associée à une meilleure ou au contraire à une moins bonne réponse aux traitements mentionnés. D'après Pittet et al., 2022¹⁸¹.

L'avènement des études scRNASeq rend possible un nouveau raffinement des signatures TAM pronostiques, en confirmant que les marqueurs d'intérêt identifiés sont bien exprimés par cette population mais aussi en rendant possible l'identification de sous-populations minoritaires de TAM d'intérêt pronostique (Figure 12a). Par exemple, chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules (NSCLC – *non-small cell lung cancer*), la présence d'une sous-population de TAM exprimant notamment *MMP12* et *CXCL5* et présentant un profil d'activation atypique (ni M1, ni M2) est corrélée à un mauvais pronostic ¹⁸⁵. C'est également le cas d'une sous-population de TAM *FABP5*^{pos}, exprimant *PDL1* et *PDL2*, dans le cancer du sein ¹⁰⁵. Une vaste étude portant sur 15 types de cancers issus de 210 patients a pu déterminer différents types de TAM associés à un pronostic péjoratif ¹⁰². Notons que nombre de ces populations de TAM présentent une signature transcriptomique pro-angiogénique, c'est le cas de TAM *SPP1*^{pos} retrouvés dans le NSCLC, le cancer colorectal, le cancer de l'ovaire, et l'adénocarcinome pancréatique (PDAC), ou encore de TAM *INHBA*^{pos} dans le cancer gastrique, de TAM *VCAN*^{pos} dans le mélanome, et de TAM *FN1*^{pos} dans le carcinome rénal.

Sur le plan prédictif, c'est à dire de la réponse au traitement, les TAM se révèlent également des biomarqueurs d'intérêt (Figure 12b). Si le rôle prédictif de la réponse à la chimiothérapie d'une importante infiltration macrophagique a été décrit ¹⁸⁶, la plupart des données portent sur l'immunothérapie. Ainsi, une étude portant sur un petit nombre de patients atteints de carcinome rénal, traités ou non par inhibiteurs de points de contrôle immunologiques (ICB – *immune-checkpoint blockade*) a permis l'identification d'un contingent de TAM exprimant des gènes stimulés par l'interféron (ISG – *interferon stimulated genes*) et présentant également une signature transcriptomique pro-angiogénique. En appliquant leur signature sur de plus importantes cohortes de patients, il semble que ces TAM ISG^{pos} se révèlent de mauvais pronostic en cas de traitement par ICB, mais de bon pronostic si le sunitinib, un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK), est utilisé ¹⁸⁷. Cela pourrait être expliqué par l'inhibition exercée par le sunitinib sur les récepteurs au VEGF (VEGFR). De surcroît, dans le cancer du sein traité par ICB, les biopsies pré-traitement des patientes bonnes répondeuses contiennent des TAM exprimant *PDL1* et *PDL2*, ainsi que les gènes des cytokines pro-inflammatoires *CXCL9*, *CXCL10* et des ISG. À l'inverse, les mauvaises répondeuses présentent davantage de TAM exprimant *CX3CR1*, *C3*, *TREM2*, *CCL3* et *CCL4*. Notons également que d'autres populations sont retrouvées indistinctement dans les deux groupes, dont des TAM exprimant des marqueurs M2 (*CD163*, *MRC1/CD206*, *DC-SIGN/CD209*, *IL-10* et *FOLR2*) ¹⁸⁸. Les macrophages *FOLR2*^{pos} correspondraient à des TRM situés notamment en périvasculaire, et sont corrélés positivement à une infiltration T et à un pronostic favorable, tandis que les macrophages *TREM2*^{pos} sont plutôt issus de monocytes recrutés à la tumeur ¹⁸⁹. Une autre étude dans le cancer du sein triple négatif a pu montrer que la présence au diagnostic de TAM exprimant *CXCL9* et *CXCL10* permet d'identifier les patientes répondant favorablement à la

combinaison chimiothérapie-ICB alors que des TAM exprimant *TREM2*, *C3* et *FN1* sont plus fréquents chez celles qui ne répondront pas¹⁹⁰. Ces différents résultats obtenus en scRNASeq présentent toutefois l'inconvénient d'être purement corrélatifs et de reposer sur un nombre limité de patients, et ils ne peuvent permettre d'infirmer que les populations de TAM pronostiques ou prédictives identifiées sont directement impliquées dans la progression tumorale ou la résistance au traitement.

D'autres approches moins coûteuses et réalisables à plus grande échelle seront nécessaires pour stratifier les patients éligibles aux traitements¹⁸¹. Une récente étude propose ainsi une approche *in situ* d'imagerie multispectrale quantitative sur coupes de tissu tumoral basée sur 6 marqueurs, permettant de prédire la réponse aux anti-PD1 dans le mélanome, réponse inversement corrélée à la présence de TAM CD163^{pos}PDL1^{neg}¹⁹¹.

Au vu des fonctionnalités ambivalentes des macrophages dans le cancer, bien soulignées par leur rôle pronostique parfois contradictoire en fonction des sous-populations ciblées et des traitements utilisés, leur ciblage en thérapie devra reposer à la fois sur des inhibiteurs et activateurs, et s'attacher à épargner certaines sous-populations de TAM.

1.4.2 Place des macrophages dans la prise en charge thérapeutique

Du fait de leur plasticité et de leur diversité fonctionnelles, les TAM sont impliqués de multiples façons dans le traitement de la tumeur ; en tant qu'auxiliaires thérapeutiques, dans l'échappement au traitement, mais aussi comme cibles ou outils thérapeutiques. Les nombreuses fonctions pro- ou anti-tumorales des TAM sont autant de candidates pouvant être soutenues, combattues, ou exploitées pour cibler indirectement la tumeur.

1.4.2.1 Les macrophages comme auxiliaires thérapeutiques

Les capacités des macrophages à éliminer les cellules tumorales par phagocytose ou cytotoxicité, ainsi qu'à stimuler les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T et NK en leur présentant des antigènes tumoraux, en font des acteurs incontournables de la réponse anti-tumorale. À ce titre, les TAM peuvent intervenir comme adjuvants des traitements anti-cancéreux conventionnels (chimiothérapie et radiothérapie). Ainsi, dans un modèle murin humanisé, le cyclophosphamide induit la sécrétion de CCL4, IL8, VEGF et TNF α par les cellules leucémiques B, avec pour conséquence une augmentation de l'infiltration et de la phagocytose des TAM de la moelle osseuse, facilitant la clairance de la tumeur, ce qui augmente l'efficacité de la thérapie ciblée¹⁹². De plus, l'association d'un grand nombre de TAM à un pronostic péjoratif dans le PDAC est levée en cas de chimiothérapie adjuvante post-résection chirurgicale, ce qui serait expliqué par la capacité de la gemcitabine à provoquer un « switch » des TAM d'un profil pro- à anti-tumoral¹⁸⁶. De la même manière, le caractère pronostique favorable de l'abondance de TAM dans le cancer colorectal traité par une chimiothérapie adjuvante à base de 5-fluorouracil (5-FU)

serait lié à un effet synergique des macrophages et du 5-FU sur la mortalité des cellules malignes ¹⁹³. En outre, l'effet de l'irradiation à faible dose sur les TAM a été étudié dans divers modèles murins, permettant de mettre en évidence une polarisation vers un phénotype iNOS^{pos} anti-tumoral producteur de chimiokines recrutant et activant les T effecteurs ¹⁹⁴.

Leurs fonctions de phagocytose dépendante des anticorps (ADCP – *antibody dependent cellular phagocytosis*) et de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC – *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) font des TAM des alliés essentiels de la réponse à l'immunothérapie basée sur les anticorps. Ces approches thérapeutiques vont également modifier le phénotype des TAM, qui, nous l'avons vu, peut être influencé par la liaison d'anticorps au FcγR. D'ailleurs, dans des tumeurs pancréatiques et cutanées, il a été montré que la déplétion des lymphocytes B ou l'inhibition de la signalisation du FcγR par différents traitements (inhibiteurs de la tyrosine kinase de Bruton – BTK, de la tyrosine kinase SYK, ou de la phosphoinositide 3-kinase-γ – PI3Kγ) amendaient les fonctions immunosuppressives des TAM, améliorant la réponse à la chimiothérapie et à l'ICB et la survie ⁶⁶⁻⁷⁰.

1.4.2.2 Implication des macrophages dans l'échappement au traitement

L'ambivalence des TAM est une nouvelle fois soulignée par les traitements anti-cancéreux conventionnels, puisque suivant les circonstances les TAM peuvent être essentiels à l'efficacité thérapeutique, comme nous l'avons vu plus haut, ou bien orchestrer la chimiorésistance ¹⁹⁵. Cela a pu être montré dans des modèles murins de tumeur mammaire où l'inhibition de CSF1-CSF1R, axe essentiel à la survie des macrophages, augmente l'efficacité de la chimiothérapie ^{196,197}. À l'instar de leur rôle dans l'initiation de la métastase, les TAM périvasculaires peuvent promouvoir la rechute en favorisant la revascularisation notamment via VEGFA ¹⁹⁸. En modifiant le phénotype des macrophages, la chimiothérapie peut leur conférer des propriétés pro-tumorales. Ainsi, la doxorubicine induit l'accumulation de TAM périvasculaires pro-angiogéniques favorisant la rechute, un effet levé par l'association thérapeutique d'un ciblage spécifique de ces TAM ¹⁹⁸. Le 5-FU pourrait induire la production de putrescine par les TAM, protégeant les cellules tumorales de l'apoptose ¹⁹⁹. Le paclitaxel confère un phénotype pro-tumoral aux TAM dans le cancer du sein triple négatif, ce qui pourrait compromettre l'efficacité des ICB ¹⁹⁰. En outre, si la radiothérapie oriente les macrophages vers un phénotype phagocytaire pro-inflammatoire de type M1, les macrophages irradiés conservent leur capacité à soutenir l'angiogenèse et l'invasion tumorale, et le processus de réparation tissulaire post-radiothérapie entraîne le recrutement de macrophages aux propriétés réparatrices favorisant la rechute ^{200,201}.

L'immunothérapie, dont le principe repose sur la stimulation de la réponse immune anti-cancéreuse, a révolutionné la prise en charge thérapeutique du cancer. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire en sont les chefs de file, et permettent de lever les freins rendant les

cellules T cytotoxiques anergiques. Les TAM peuvent toutefois constituer un obstacle à leur efficacité, comme cela a été montré dans plusieurs modèles murins de cancer colorectal, de mélanome ou de cancer du poumon, dans lesquels leur déplétion améliore ou restaure l'efficacité des ICB^{152,153,202}. Ce phénomène pourrait être expliqué par différents mécanismes. D'abord, les TAM partagent avec les cellules malignes l'expression d'IC comme PDL1 et PDL2 qui inhibent directement les fonctions T cytotoxiques, ce qui pourrait créer un effet de compétition lors d'un traitement par ICB, réduisant l'efficacité thérapeutique²⁶. Les TAM participent à l'exclusion des lymphocytes T cytotoxiques hors du foyer tumoral par leurs propriétés pro-fibrotiques, mais aussi en formant des interactions durables avec les lymphocytes T CD8, compromettant leurs fonctions effectrices cytotoxiques même après la levée des freins immunosuppresseurs par les ICB¹⁵². Enfin, les propriétés régulatrices des TAM étant multiples, les ICB pourraient se révéler insuffisants pour lever l'immunosuppression. Ainsi, chez les patients atteints de glioblastome traités par anti-PD1, la réponse T CD8 est associée à une modification du phénotype des TAM, qui semblent induire une réponse interféron favorisant le recrutement et l'activation T, sans toutefois diminuer leur sécrétion de facteurs immunosuppresseurs¹⁸⁷.

1.4.2.3 Les macrophages comme cibles thérapeutiques

Il y a plus d'un siècle, Élie Metchnikoff proposait déjà que la clé de la réponse immune était de stimuler les phagocytes²⁰³. Les macrophages constituent en effet une cible thérapeutique de choix dans le cancer, et différentes stratégies visant à inhiber leurs fonctions pro-tumorales, stimuler leur fonctions anti-tumorales, ou même les utiliser comme outils thérapeutiques sont utilisées ou testées actuellement (Figure 13). Le rôle pro-tumoral des TAM et de leurs précurseurs (monocytes, MDSC) peut être contrôlé à plusieurs niveaux : en limitant leur recrutement à la tumeur, leur accumulation, et la fonctionnalité des cellules. L'ensemble des mécanismes pro-tumoraux, immunosuppresseurs ou non, des TAM sont autant de cibles thérapeutiques potentielles pouvant être bloquées ou reprogrammées.

Diverses stratégies visant à inhiber le recrutement des monocytes/macrophages en bloquant les signalisations CCL2-CCR2, CCL5-CCR5 ou CXCL12-CXCR4, à les éliminer en ciblant l'axe CSF1-CSF1R, ou à les inactiver en utilisant des biphosphonates ont été largement testées, y compris dans des essais cliniques en association à la chimiothérapie et/ou l'immunothérapie dans divers cancers^{26,181}. Ces stratégies visant à éliminer les TAM, quel que soit leur phénotype, présentent toutefois l'inconvénient de compromettre l'exploitation de leurs fonctions anti-tumorales, pourtant essentielles à l'élimination de la tumeur. Le blocage de l'axe CCL2-CCR2 pourrait également avoir un effet sur le recrutement des lymphocytes T effecteurs, ce qui pourrait en partie expliquer les résultats discordants des essais cliniques. De plus, chez la souris, il a été mis en évidence une accumulation de PMN-MDSC contrecarrant le bénéfice de l'élimination des TAM par

anti-CSF1R²⁰⁴. Enfin, les effets indésirables des thérapies anti-CSF1 (anticorps ou molécules inhibitrices) constatés chez les patients ne sont pas négligeables²⁰⁵.

Dans une approche plus raffinée, les TAM peuvent être reprogrammés dans le but de les faire passer d'un phénotype pro-tumoral à anti-tumoral. Des études dans différents modèles murins en ont apporté la preuve de concept. Ainsi, un traitement combinant CCL16, CpG (ligand de TLR9) et anti-IL-10R permet une accumulation de macrophages pro-inflammatoires au site tumoral qui empêchent croissance tumorale et métastases²⁰⁶. L'administration de GM-CSF entraîne les mêmes effets en inhibant la production de VEGF, IL-10 et IL4 par les TAM²⁰⁷. Plus récemment, l'utilisation d'agonistes de CD40, conférant un phénotype pro-inflammatoire aux TAM, a permis de restaurer l'efficacité du traitement par ICB dans des modèles murins de cancer colorectal et du sein. Prenant en compte la remarquable plasticité des macrophages et le risque de voir ces macrophages reprogrammés par le traitement être rééduqués ensuite par la tumeur, l'adjonction d'anti-CSF1R éliminant ces macrophages a été testée avec succès²⁰⁸. Les agonistes CD40 sont en cours d'évaluation chez l'homme dans différentes tumeurs¹⁸¹. Différentes stratégies thérapeutiques visent à reprogrammer globalement les TAM, en ciblant les voies de signalisation impliquées dans leur polarisation (inhibiteurs d'histone désacétylases ou de PI3K γ , agonistes TLR), ou bien les marqueurs qu'ils expriment préférentiellement et leurs interactions (comme LILRB-2, MARCO, TREM2, ANG2). D'autres approches se focalisent sur certaines fonctions des TAM, et cherchent à promouvoir la phagocytose (interactions CD47 – SIRP1, CMH-1 – LILRB1, CD24 – SIGLEC10), ou inhiber l'immunosuppression (axe PD1 – PDL1).

Les Histone désacétylases (HDAC) sont des enzymes régulatrices épigénétiques qui sont impliquées dans de nombreux cancers et peuvent être ciblées par des inhibiteurs pharmacologiques (HDACi). Les HDACi ont montré leur efficacité dans des modèles murins de cancer du sein, où ils permettent de réduire la masse tumorale et les métastases pulmonaires en altérant le phénotype des TAM²⁰⁹. Ils diminuent également le risque de métastases post-résection chirurgicale chez des souris atteintes de tumeurs pulmonaires, mammaires et oesophagiennes en inhibant le recrutement et les activités des MDSC/TAM à l'origine de l'établissement de la niche pré-métastatique²¹⁰. L'activation de la PI3K γ a pour effet d'augmenter les propriétés immunosuppressives et pro-angiogéniques des macrophages. Les inhibiteurs de PI3K γ permettraient donc d'orienter les TAM vers un profil anti-tumoral²¹¹, et plusieurs essais cliniques évaluent leur intérêt dans différentes tumeurs solides^{26,181}. La stimulation des TLR, classiquement par des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP – *pathogen-associated molecular patterns*), polarise les macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire. Différents ligands de synthèse ont été développés dans le but d'exploiter cette propriété, et testés avec succès chez la souris. Des dizaines d'essais cliniques sont en cours afin d'évaluer les agonistes TLR chez l'humain, mais l'imiquimod (agoniste de TLR7) et le bacille de Calmette et Guérin (BCG, agoniste de TLR2 et

TLR4) sont déjà utilisés en pratique courante pour traiter respectivement certains carcinomes cutanés et le cancer de la vessie ²⁶.

La famille des récepteurs leucocytaires de type immunoglobuline (LILR – *leukocyte immunoglobulin-like receptors*) comprend des récepteurs activateurs (LILRA) et des récepteurs inhibiteurs (LILRB) et est spécifique aux primates ²¹². Le rôle des LILRB dans la modulation des macrophages est imparfaitement connu du fait de leur absence chez la souris, mais leur blocage pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante puisque les anti-LILRB2 inhibent le phénotype suppressif des macrophages et améliore l'efficacité des anti-PDL1 dans un modèle de souris transgénique exprimant LILRB2 ²¹³. Le récepteur MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*) appartient à la famille des récepteurs éboueurs et son expression est régulée positivement lors d'infections bactériennes ²¹⁴. Des sous-populations de TAM immunosuppresseurs exprimant MARCO ont été décrites dans de nombreuses tumeurs : mélanome, sein, colon, endomètre et poumon. En provoquant un « switch » phénotypique des TAM MARCO^{pos}, l'utilisation d'anti-MARCO permet de réduire la croissance de la tumeur et les métastases dans des modèles murins ²¹⁵⁻²¹⁷. Les récentes études scRNASeq ont montré qu'un grand nombre de tumeurs contenaient des TAM exprimant le récepteur TREM2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) au sein de leur TME. TREM2 est impliqué dans la survie, la migration, et la fonctionnalité des macrophages. Sa liaison à des phospholipides abroge la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires, et induit la production de facteurs immunosuppresseurs²¹⁸. Les TAM TREM2^{pos} sont considérés comme promoteurs de tumeur, associés à un mauvais pronostic, et les anti-TREM2 ont montré leur efficacité chez la souris ²¹⁹⁻²²¹. Un anticorps anti-TREM2 est actuellement à l'essai chez des patients atteints de tumeurs solides réfractaires à tout traitement ¹⁸¹. Nous l'avons vu, ANG2 promeut le recrutement de monocytes TIE2^{pos} pro-angiogéniques qui se différencient en TAM pro-tumoraux ¹⁶⁹. Un inhibiteur peptidique de la liaison ANG2 – TIE2 n'a toutefois pas montré d'efficacité chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire ²²². Cependant, des études précliniques ont pu montrer l'efficacité thérapeutique d'un anticorps bispécifique ANG2-VEGF, capable de reprogrammer les TAM vers un phénotype anti-tumoral et anti-angiogénique ^{223,224}.

Les cellules tumorales peuvent échapper à la phagocytose en exprimant des protéines anti-phagocytaires qui seront reconnues par les cellules phagocytaires, au premier rang desquelles les macrophages. Le plus connu est le CD47, signal « *don't eat me* » d'expression ubiquitaire, qui se lie à SIRPα exprimé par les TAM, mais aussi par les autres cellules myéloïdes et les neurones ^{225,226}. Le ciblage thérapeutique de l'interaction CD47 – SIRPα par des anticorps ou des protéines de fusion a fait l'objet de nombreux essais thérapeutiques et est toujours évalué dans de nombreux cancers, en association avec des traitements conventionnels ou des ICB, avec plus ou moins de succès en fonction de la tumeur et de la combinaison thérapeutique ^{26,181}. D'autres interactions

anti-phagocytaires pourraient constituer des cibles intéressantes, comme la liaison de la β 2-microglobuline (β 2-M) du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-1) au récepteur LILRB1 exprimé par les TAM ²²⁷, ou la liaison de la sialoglycoprotéine « *don't eat me* » CD24 exprimée par les cellules tumorales à SIGLEC-10 porté par les TAM ²²⁸. Cependant leur efficacité thérapeutique n'est pas encore connue chez les patients ¹⁸¹.

Les propriétés pro-tumorales des TAM reposent en grande partie sur leurs fonctions immunosuppressives, qui constituent donc des cibles thérapeutiques de choix. La plus emblématique de ces thérapies est probablement l'inhibition de l'interaction entre le point de contrôle immunitaire PD1 et son ligand PDL1, surexprimé par nombre de cellules tumorales, mais aussi par les TAM. La liaison de PDL1 entraîne l'activation de PD1, à l'origine de la phosphorylation de CD28 qui abroge l'activation du TCR et par conséquent la cytotoxicité des lymphocytes T ²²⁹. En plus de bloquer l'interaction suppressive directe, les anti-PDL1 peuvent entraîner un « switch » phénotypique des TAM d'un phénotype pro- à anti-tumoral ²³⁰⁻²³². En outre, les TAM peuvent également exprimer PD1, dont l'interaction avec son ligand aura pour effet d'inhiber leur potentiel phagocytaire et anti-tumoral. Un traitement par anti-PD1 augmente ainsi les capacités de phagocytose des TAM et améliore la survie dans des modèles murins ²³³.

La dernière révolution thérapeutique en oncologie est probablement représentée par les lymphocytes T porteurs d'un récepteur chimérique, ou CAR-T (CAR-T cells – *chimeric antigen receptor T cells*). Cette approche de thérapie cellulaire utilise des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer à leur surface un récepteur T chimérique issu de la bio-ingénierie, combinant les fonctions de liaison à l'antigène et de co-activation T. Si les CAR-T actuellement utilisées ciblent les antigènes tumoraux, des études chez la souris semblent démontrer l'intérêt de CAR-T dirigées spécifiquement contre les TAM pro-tumoraux ^{234,235}. En outre, les CAR-T dirigées contre les cellules tumorales peuvent permettre de reprogrammer ou d'activer les TAM, par exemple en produisant de l'IL-12 de manière inductible lors de l'engagement du récepteur CAR avec sa cible ²³⁶, ou en sécrétant constitutivement du CD40L ²³⁷.

Pour finir, les macrophages peuvent être utilisés comme outils thérapeutiques. Ainsi, différents macrophages porteurs de CAR (CAR-Mac) dirigés contre HER2 ont été développés, dans un but anti-tumoral direct ²³⁸, ou avec CD147 inductible à l'origine de la production de MMP dégradant la MEC et favorisant l'infiltration de T cytotoxiques ²³⁹. Des cellules myéloïdes génétiquement modifiées pour produire de l'IL-12, dénommées IL12-GEMys (*genetically engineered myeloid cells*), permettent de promouvoir l'immunité anti-tumorale et de limiter croissance tumorale et métastases ²⁴⁰. La production de macrophages modifiés et en particulier de CAR-Mac présente toutefois de nombreux défis techniques, certains partagés avec les CAR-T, mais aussi d'autres supplémentaires. Notamment, les macrophages ne prolifèrent pas.

Néanmoins, ce domaine en pleine expansion devrait offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans les années à venir¹⁸¹.

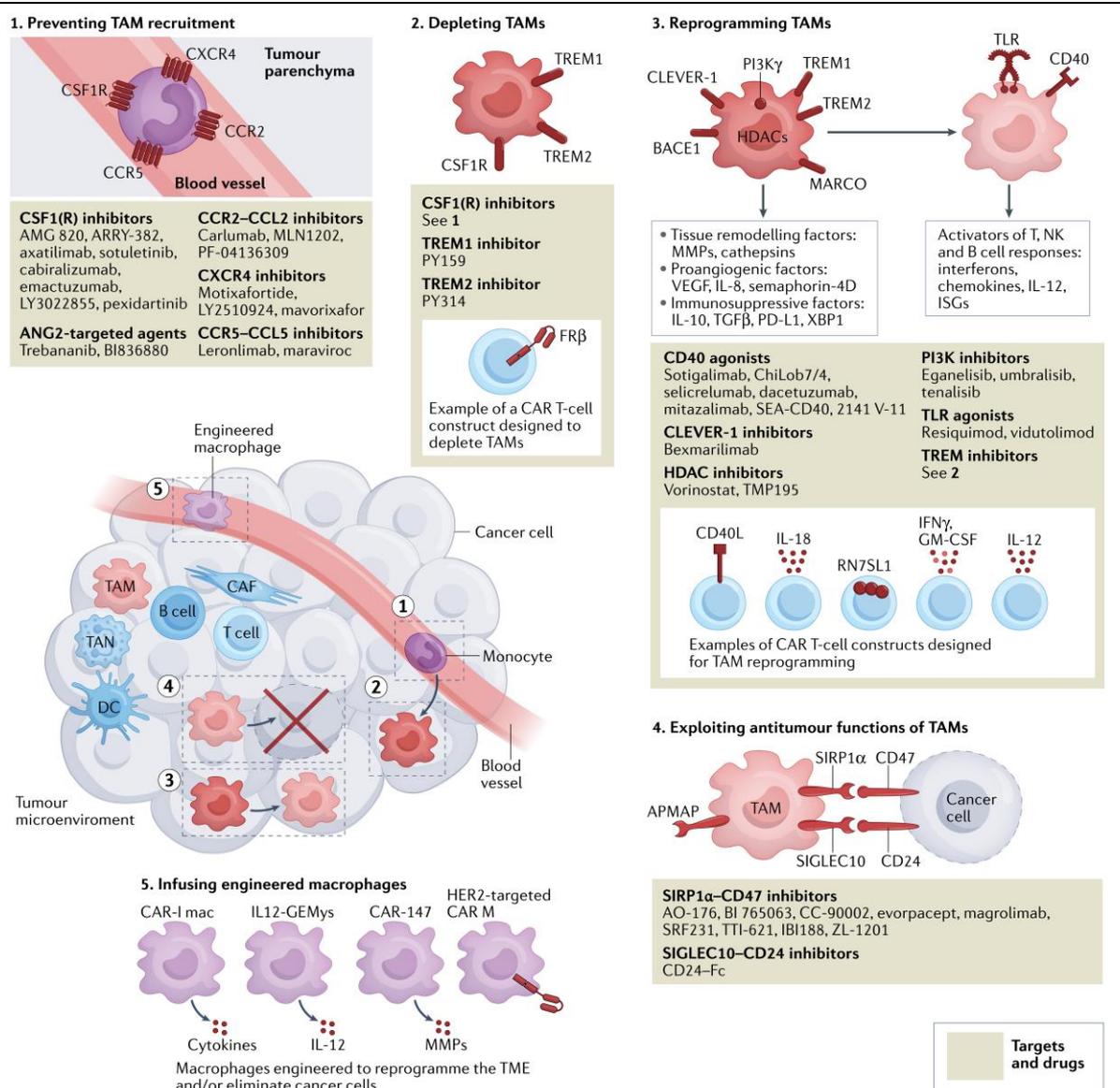


Figure 13 | **Thérapies ciblant les TAM et macrophages modifiés dans le traitement des tumeurs solides**

De nombreuses approches thérapeutiques ciblant ou exploitant les macrophages dans les tumeurs solides ont été développées et sont listées ici. Elles reposent sur 5 grands axes : 1) empêcher le recrutement des TAM à la tumeur primaire et aux métastases ; 2) éliminer les TAM ; 3) reprogrammer les TAM ; 4) exploiter les fonctionnalités anti-tumorales des TAM ; 5) traiter les patients avec des macrophages modifiés. D'après Pittet et al., 2022¹⁸¹.

En raison de leurs fonctions ambivalentes pro- ou anti-tumorales, de leurs multiples interactions avec les autres acteurs de la niche tumorale, de leur caractère pronostique et prédictif et de leur potentiel thérapeutique, les TAM sont une population d'intérêt majeur en cancérologie. L'essor des études à l'échelle de la cellule unique a permis de commencer à dévoiler leur grande diversité dans de nombreuses tumeurs solides, y compris au sein des métastases ganglionnaires et tissulaires, mais les TAM restent peu étudiés dans les cancers hématologiques, où ils représentent un contingent cellulaire classiquement moins abondant.

2 Lymphomes B : rôle de la niche tumorale

2.1 Définitions et généralités

2.1.1 De la lymphopoïèse B physiologique à la lymphomagenèse B

Les lymphocytes B sont issus de la moelle osseuse (MO), une origine qui leur confère leur nom (B pour *bone marrow*). Toutefois, et même s'il existe une voie de différenciation rapide en plasmocytes de faible affinité, c'est au sein des organes lymphoïdes secondaires (OLS) et plus précisément d'une structure spécialisée appelée centre germinatif (GC) qu'ils vont subir différentes étapes de maturation pour donner naissance à des plasmocytes et des lymphocytes B mémoires de forte affinité pour l'antigène ^{241,242} (Figure 14). Le GC est une structure transitoire apparaissant lors d'une stimulation antigénique et est histologiquement caractérisé par une zone sombre et une zone claire. Après avoir rencontré l'antigène via leur récepteur de cellules B (BCR – *B cell receptor*), les lymphocytes B vont migrer au sein de la zone sombre du GC sous l'influence de CXCL12 produit par les cellules folliculaires dendritiques (FDC) de la zone sombre, ligand de leur récepteur CXCR4 ^{243,244}. Ils y subissent une intense prolifération ainsi qu'un processus d'hypermutation somatique (SHM), et sont alors appelés centroblastes. Ce sont de grandes cellules avec un cytoplasme réduit, donnant son aspect et son nom à la zone sombre. Le processus d'SHM, en conduisant à de multiples modifications génétiques au niveau de la région variable des immunoglobulines (Ig) via l'activité de l'enzyme AID (*Activation-induced cytidine deaminase*), est un mécanisme essentiel de diversification du répertoire B ^{242,245}. Les lymphocytes B matures vont ensuite être sélectionnés par les FDC et les lymphocytes Tfh en fonction de l'affinité de leur BCR à l'antigène au sein de la zone claire. Ils sont alors appelés centrocytes, sont de plus petite taille avec un noyau plus réduit et un cytoplasme plus important, et se distinguent des centroblastes par l'expression de CD83 et CD86 ²⁴⁶. Leur tropisme au sein de la zone claire est médié par CXCL13, ligand de leur récepteur CXCR5 ²⁴³. C'est au niveau de la zone claire du GC qu'on a longtemps considéré que la commutation isotypique (CSR – *class switch recombination*) permettant de déterminer l'isotype de l'Ig produite avait lieu, mais ce phénomène pourrait en fait être plus précoce ²⁴⁷. Les lymphocytes B sélectionnés vont ensuite se différencier en plasmablastes puis en plasmocytes, cellules spécialisées dans la production d'anticorps qui vont rejoindre leur niche médullaire, ou bien en lymphocytes B mémoires, qui formeront un contingent de cellules B matures prêtes à retourner dans le GC subir de nouveaux processus de sélection d'affinité en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène. Dans le cas contraire, ils rentreront en apoptose et seront phagocytés par les macrophages à corps tingibles (TBM – *tingible body macrophages*) ou retourneront au sein de la zone sombre subir de nouvelles étapes de prolifération et SHM ²⁴⁸.

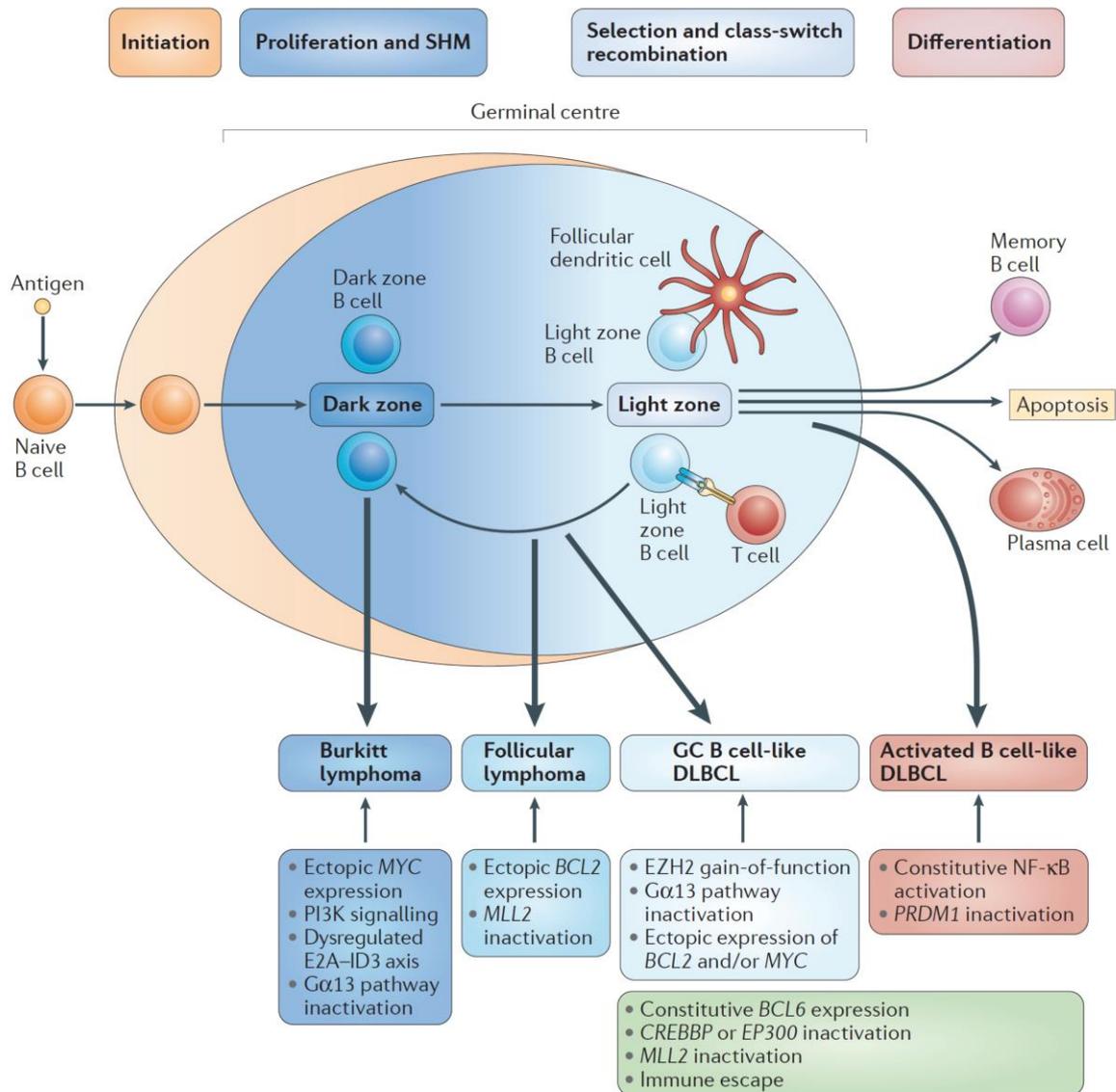


Figure 14 | **Maturation B physiologique et origine des lymphomes B au sein du centre germinatif (GC)**

De manière physiologique, les lymphocytes B naïfs ayant effectué avec succès une recombinaison VDJ dans la moelle osseuse et exprimant un récepteur de cellules B (BCR - *B cell receptor*) spécifique d'un antigène migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Après avoir rencontré leur antigène au sein de ces OLS, les lymphocytes B subissent différentes étapes de mutations et de sélections afin d'aboutir à une différenciation en lymphocytes B mémoires et plasmocytes fonctionnels de forte affinité pour l'antigène. Le lymphocyte B ayant reconnu l'antigène va tout d'abord être localisé dans la région extra-folliculaire des ganglions, à la frontière des zones B et T. Après un contact avec les lymphocytes T CD4 de type pré-Tfh, eux-mêmes préalablement activés par des cellules dendritiques (DC), le lymphocyte B va migrer dans le centre germinatif (GC) du ganglion lymphatique. Une fois dans le GC, va avoir lieu une première étape de prolifération des lymphocytes B, alors appelés centroblastes (*dark zone B cells*), dans la zone sombre, qui s'accompagne d'hypermutations somatiques (SHM) aléatoires. Ils vont alors migrer dans la zone claire et, alors dénommés centrocytes (*light zone B cells*), subir un processus de sélection en fonction de leur affinité pour l'antigène, par le biais d'interactions avec les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et les lymphocytes Tfh. Les lymphocytes B ainsi sélectionnés peuvent alors retourner au sein de la zone sombre subir de nouvelles étapes de prolifération et de SHM, ou se différencier soit en plasmablastes puis plasmocytes producteurs d'anticorps, soit en lymphocytes B mémoires, cellules différenciées quiescentes prêtes à retourner dans le GC en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène.

S'ils ne reçoivent pas de signaux de survie des lymphocytes Tfh, les lymphocytes B entreront en apoptose.

Différents types de lymphomes dérivés du GC ont pour origine des cellules bloquées aux différents stades de maturation précédemment décrits : les cellules tumorales du lymphome de Burkitt ressemblent à des centroblastes, le lymphome folliculaire (FL) et le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) de type GC dérivent de centrocytes, le DLBCL de type ABC (*activated B cell*) présente des caractéristiques de plasmablastes. Diverses voies de signalisation peuvent être impliquées dans la lymphomagenèse, les plus fréquemment touchées pour chaque type de lymphome sont présentées sur cette figure. Le cadre vert présente les altérations génétiques communément retrouvées dans le DLBCL, quel que soit son type. D'après Basso & Dalla-Favera, 2015 ²⁴⁹.

Les différentes étapes d'activation et de maturation B sont accompagnées par des modifications des caractéristiques structurales du BCR et par des variations de niveau d'expression de marqueurs de différenciation et de facteurs de transcription ²⁴⁹. Par exemple, le répresseur transcriptionnel BCL6 est fortement exprimé par les centroblastes de la zone sombre, inhibant le facteur de transcription MYC et les gènes de contrôle du cycle cellulaire ²⁵⁰. À l'inverse, dans la zone claire, les centrocytes vont diminuer leur expression de BCL6, ce qui inhibe leur prolifération.

L'instabilité génétique intervenant dans la maturation B, bien que nécessaire à la diversité du répertoire B et des isotypes d'Ig, est le facteur déclenchant essentiel de la lymphomagenèse B ^{251,252}. L'enzyme AID, qui médie la SHM et la CSR, est d'ailleurs indispensable à la tumorigenèse B ²⁵³. Cette fragilité est illustrée par le fait que 90% des lymphomes sont des lymphomes B, alors que les proportions de lymphocytes T et B sont plus équilibrées dans l'organisme ²⁵⁴. Contrairement au BCR, le récepteur T (TCR – *T cell receptor*), lui, est figé à la sortie du thymus et ne subit pas de maturation d'affinité.

La nomenclature des lymphomes, basée sur des critères cliniques, histologiques, génétiques, et moléculaires, est en constante évolution ²⁵⁵. Néanmoins, les différents types de lymphomes à cellules B matures peuvent être rattachés à différents stades de la lymphopoïèse B physiologique au sein du GC ^{249,256} (Figure 14). Les lymphocytes B tumoraux évoluent au sein d'une niche tumorale, fruit de la co-évolution des clones tumoraux et des cellules qui composaient leur niche physiologique. Le lymphome de Burkitt, le lymphome folliculaire (FL – *follicular lymphoma*), et le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL – *diffuse large B cell lymphoma*), qui représentent 80% des lymphomes B non-Hodgkiniens, sont tous trois dérivés de lymphocytes B du GC ^{257,258}. Sur la base de leur profils d'expression génique, les cellules malignes de lymphome de Burkitt semblent être issues de centroblastes, tandis que les lymphocytes tumoraux de FL ou de DLBCL de type GC peuvent être rapprochés des centrocytes, et les cellules tumorales du DLBCL de type ABC (*activated B cell*) des plasmablastes ^{246,259}. Le DLBCL et le FL sont les lymphomes B les plus fréquents et partagent au moins partiellement la même origine cellulaire.

2.1.2 Lymphome diffus à grande cellules B (DLBCL)

2.1.2.1 Définition et épidémiologie

Le DLBCL représente 30% des cas de lymphomes non-Hodgkinien (LNH), ce qui en fait le LNH le plus fréquent. Son incidence est estimée à 150 000 nouveaux cas chaque année au niveau mondial ²⁶⁰. L'âge moyen au diagnostic est de 55 à 60 ans, avec une légère prédominance masculine. L'exposition à certains herbicides augmenterait le risque de DLBCL ²⁶¹.

Les patients se présentent typiquement avec une lymphadénopathie progressive, une atteinte extranodale (système nerveux central, sein, os, médiastin, testicule...), ou les deux, et nécessitent d'être traités. Le lymphome diffus à grandes cellules B tient son nom de son aspect histologique. Les cellules lymphomateuses sont de grande taille, dispersées au sein des ganglions et des tissus atteints. Le DLBCL est une maladie agressive et hétérogène.

2.1.2.2 Diagnostic, classification moléculaire et pronostic

Le diagnostic du DLBCL repose sur l'examen anatomo-pathologique du tissu tumoral, idéalement réalisé sur une biopsie d'exérèse, ou en cas d'impossibilité sur une biopsie à l'aiguille fine ²⁶². Au-delà des caractéristiques morphologiques en histologie, la classification des lymphomes nécessite également des examens spécialisés : cytométrie en flux (CMF), hybridation in situ en fluorescence (FISH – *fluorescence in situ hybridization*), immunohistochimie (IHC), biologie moléculaire.

La classification des lymphomes de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de 2016 catégorise en DLBCL une petite vingtaine d'entités clinico-biologiques, parmi lesquels le DLBCL NOS (*not otherwise specified*, sans autre spécificité clinico-biologique) est de loin le plus fréquent ²⁵⁵. Les DLBCL NOS, souvent simplement appelés DLBCL, représentent eux-mêmes un groupe hétérogène de pathologies.

Des études de profil d'expression génique (GEP – *gene expression profiling*) ont permis de définir deux types de DLBCL : de type centre germinatif (GC, 40-50% des DLBCL) et de type *activated B cell* (ABC, 50-60% des DLBCL) ²⁵⁹. Cette classification moléculaire basée sur la cellule d'origine (COO – *cell-of-origin*) permet de définir deux entités clinico-biologiques qui diffèrent en terme de pronostic et de réponse au traitement : le DLBCL de type ABC, avec une survie globale à 5 ans de 44%, est de moins bon pronostic que le type GC, qui présente une survie globale d'environ 90% ²⁶³. Elle date cependant de plus d'une vingtaine d'années, et malgré son intérêt en terme de prise en charge thérapeutique, n'est pas utilisée en pratique clinique, probablement pour des raisons d'accessibilité ^{260,264}. Des travaux plus récents ont permis une analyse plus détaillée des altérations moléculaires (mutations géniques, variations du nombre de copies...) survenant dans le DLBCL, ainsi que les modifications du TME associées, permettant l'identification de multiples sous-types de DLBCL au-delà de la cellule d'origine ²⁶⁵⁻²⁶⁸. Ces nouvelles classifications pourraient

présenter un intérêt en médecine personnalisée, mais leur pertinence clinique et leur applicabilité restent à évaluer.

Des réarrangements génétiques d'intérêt clinique peuvent être détectés par FISH, comme le réarrangement *MYC* retrouvé dans 12% des cas de DLBCL, parfois associé à des réarrangements *BCL2* et/ou *BCL6* dans 4 à 8% des cas. Ces réarrangements sont le plus souvent retrouvés dans les DLBCL de type GC, et même uniquement dans ce type pour les réarrangements *BCL2* ^{269,270}. Certains DLBCL font à présent l'objet d'une classification particulière au sein des lymphomes B de haut grade avec réarrangements *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6* (*high-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements*). Communément appelés lymphomes double- ou triple-hit, ils sont associés à un mauvais pronostic sous traitement associant rituximab et chimiothérapie par cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine (Oncovin) et prednisone (R-CHOP) ^{255,269,271}.

La stratification des patients et l'évaluation de la réponse au traitement sont réalisées à l'aide des critères cliniques d'Ann Arbor et de Lugano qui reposent sur le bilan d'extension de la maladie, après une imagerie par PET-scanner ^{262,272,273}. L'IPI (*International Prognostic Index*), créé en 1993, reste le principal outil pronostique et de stratification des patients dans le cadre des essais cliniques ²⁷⁴. Sa forme modernisée, permettant une meilleure discrimination des patients à haut risque, est connue sous l'appellation NCCN-IPI (*National Comprehensive Cancer Network IPI*) ²⁷⁵⁻²⁷⁷. Ces classifications pronostiques reposent uniquement sur des critères cliniques et présentent l'inconvénient majeur de ne pas discriminer les patients à très haut risque. Un index intégrant les divers paramètres biologiques d'intérêt pronostique identifiés ces dernières années reste à mettre au point ²⁶⁰.

2.1.2.3 Aspects thérapeutiques

Le traitement standard de première ligne consiste en un schéma R-CHOP, associant une immunothérapie par anticorps anti-CD20 à la chimiothérapie, et permet de guérir 60% à 70% des patients ²⁵⁵. Environ 10 à 15% des patients présentent une maladie réfractaire (réponse incomplète ou rechute dans les 6 mois) et 20 à 25% rechuteront dans les 2 ans après une réponse complète ²⁷⁸. L'espérance de vie des patients qui ne rechutent pas pendant deux ans à compter du diagnostic rejoint quasiment celle de la population générale du même âge ²⁷⁸.

En cas d'échec de la première ligne, une greffe de cellules souches autologues après chimiothérapie de sauvetage peut être réalisée si cela est envisageable sur le plan médical, ce qui n'est le cas que dans environ 50% des cas au vu de l'âge et des comorbidités des patients. Un traitement par CAR-T anti-CD19 ciblant les lymphocytes B tumoraux peut alternativement être envisagé, mais malgré leur efficacité clinique ²⁷⁹⁻²⁸⁵, la complexité de leurs modalités de fabrication et leur coût très élevé limitent leur utilisation en pratique courante. La combinaison

de l'anti-CD19 tafasitamab et du lénalidomide représente une alternative intéressante ^{286,287}. La rechute ou l'absence de réponse au traitement de deuxième ligne grèvent le pronostic. Les patients concernés présentent le plus souvent une maladie agressive résistante à la chimiothérapie, probablement liées à des altérations génétiques et épigénétiques qu'il conviendrait de décrypter.

Les lymphomes B de haut grade avec réarrangements *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6*, dits double- et triple-hit, nécessitent une prise en charge particulière du fait de leur mauvaise réponse au traitement R-CHOP ; par exemple avec un schéma EPOCH-R avec ajustement posologique (DA-EPOCH-R – *dose-adjusted etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin with rituximab*) ^{260,288}.

Différents essais cliniques ont évalué l'intérêt de nouvelles thérapeutiques, le plus souvent en addition au traitement R-CHOP. Les inhibiteurs de PD1 n'ont pas donné de résultat convaincant ²⁸⁹. Le bortezomib (inhibiteur du protéasome) n'a pas montré d'effet bénéfique ^{290,291}. L'ibrutinib (inhibiteur de BTK) a donné des résultats mitigés ^{292,293}, tout comme le lénalidomide ²⁹⁴⁻²⁹⁶, le venetoclax (inhibiteur de BCL2) ²⁹⁷, et le tazemetostat (inhibiteur d'EZH2) ²⁹⁸⁻³⁰⁰. Le magrolimab, un inhibiteur de CD47, a montré des résultats encourageants en association avec le rituximab ³⁰¹. Du fait de l'hétérogénéité biologique du DLBCL, des thérapies ciblées pourraient très probablement bénéficier à des sous-groupes de patients sélectionnés sur la base de biomarqueurs validés.

2.1.2.4 Lymphomagenèse du DLBCL

L'apparition du DLBCL résulte de l'accumulation de multiples altérations génétiques qui vont modifier la structure ou le niveau d'expression de proto-oncogènes, de gènes suppresseurs de tumeurs, ou de gènes codant pour des protéines impliquées dans la pathologie. Ces altérations génomiques à l'origine de l'apparition du clone tumoral lymphomateux sont le reflet pathologique des mécanismes d'instabilité génétique nécessaires à la maturation du lymphocyte B et de son BCR. Ainsi, des translocations chromosomiques peuvent résulter d'erreurs au cours de la recombinaison VDJ, de la SHM, ou de la CSR, et l'enzyme AID peut être responsable d'hypermuation somatique aberrante ³⁰²⁻³⁰⁴. Cette particularité explique probablement la remarquable complexité du paysage mutationnel dans le DLBCL, comparé aux autres hémopathies malignes ³⁰³.

Les cellules tumorales de DLBCL de type GC ont un profil d'expression génique proche des centrocytes, et n'expriment pas de marqueurs de différenciation post-GC, alors que dans le type ABC elles présentent une signature transcriptomique analogue à celle de lymphocytes B activés, également présents dans la zone claire du GC, mais déjà orientés vers une différenciation en plasmablastes. Certains programmes génétiques peuvent être dérégulés dans ces deux types de

DLBCL, tandis que d'autres lésions génétiques sont spécifiques soit du DLBCL de type GC, soit du DLBCL de type ABC.

Parmi les altérations génomiques communes au DLBCL de types GC et ABC, on retrouve des atteintes de régulateurs chromatinien et de marques histones, la dérégulation de l'activité de BCL6, différents mécanismes d'échappement de la surveillance immunitaire, et les mutations *FOXO1*³⁰³.

Dans 85% des cas de DLBCL, on retrouve une mutation d'un gène codant pour des enzymes régulatrices de marques histones (méthyltransférases, acétyltransférases) ou pour les histones eux-mêmes³⁰⁵. L'inactivation de la méthyltransférase KMT2D/MLL2 par des mutations mono-voire bi-alléliques de son gène est l'atteinte génétique la plus fréquente, elle est retrouvée chez 30% des patients^{302,306}. Les gènes des acétyltransférases CREBBP et EP300 sont mutés respectivement dans 25% et 5% des cas de DLBCL, le plus souvent de type GC³⁰⁷.

BCL6 est un répresseur transcriptionnel exprimé dans le GC, en particulier dans la zone sombre, où ses multiples activités de répression des gènes d'arrêt du cycle cellulaire, de détection et réponse aux dommages à l'ADN, des programmes anti-apoptotiques (en inhibant BCL2) et de différenciation terminale sont indispensables à la fonctionnalité du GC en autorisant l'intense prolifération des centroblastes ainsi que la SHM et la CSR^{250,308-315}. Des translocations chromosomiques positionnant le gène *BCL6* en aval de séquences promotrices hétérologues sont retrouvées dans un tiers des DLBCL, le plus souvent de type ABC³¹⁶. Plusieurs partenaires sont impliqués, les plus fréquents étant les loci des gènes des chaînes d'Ig, avec comme résultat identique une activation constitutive de BCL6 et la persistance pathologique du phénotype GC, qui présente une tolérance aux altérations de l'ADN et le blocage de la différenciation³¹⁷. L'expression de BCL6 peut également être altérée par des mécanismes alternatifs, bien moins fréquents³¹⁸⁻³²⁰.

Différentes altérations génomiques retrouvées dans le DLBCL aboutissent à un échappement à la surveillance immunitaire. Ainsi, 60% des DLBCL n'expriment pas de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I – ce qui leur permet d'éviter la cytotoxicité T – en raison d'inactivation bi-allélique et/ou de délétion focale du locus *B2M* codant pour la β 2-microglobuline (β 2M, 29% des DLBCL de type GC et 15% des types ABC), de mutations ponctuelles ou de perte des loci HLA, ou encore de l'absence d'expression ou bien de localisation cytoplasmique aberrante du complexe β 2M/HLA-I par inhibition épigénétique ou défaut d'assemblage et de transport (30-40% des cas)³²¹. D'autres mécanismes d'échappement incluent l'inactivation du gène codant pour CD58, ligand de CD2 exprimé par les lymphocytes T et NK (23% des DLBCL de type ABC et 12% des types GC)³²¹, la sous-expression du CMH II (40-50% des cas, corrélée à un mauvais pronostic)^{322,323}, ou encore des gains de copie, amplifications, réarrangements chromosomiques aboutissant

à la surexpression de PDL1 (environ 20-30% des cas de DLBCL, plus souvent dans le type ABC) ³²⁴⁻³²⁶.

Enfin, le gène du facteur de transcription FOXO1 peut être muté dans 8-10% des cas de DLBCL, ce qui serait associé à un pronostic péjoratif ³²⁷. FOXO1 a un rôle majeur dans la différenciation B, il est exprimé spécifiquement dans la zone sombre, dont il participe au programme en partenariat notamment avec BCL6. Il est négativement régulé par la voie PI3K-AKT-mTOR, régulation qui serait levée par les mutations retrouvées dans le DLBCL, avec pour résultat une activation constitutive de FOXO1 ^{328,329}.

Dans le DLBCL de type GC, on peut retrouver des translocations chromosomiques de *BCL2* et *MYC* ainsi que différentes mutations affectant *EZH2*, la migration B, ou encore *TNFRSF14/HVEM* ³⁰³.

BCL2 est un facteur de transcription anti-apoptotique majeur, exprimé dans la plupart des tissus mais pas dans le GC, où il est inhibé par *BCL6* ^{250,313}. Une translocation t(14 ;18) positionnant *BCL2* sous le contrôle du locus des Ig, avec pour conséquence son expression ectopique conférant un avantage de survie au lymphocyte B tumoral, est retrouvée dans 30% des DLBCL de type GC, et est associée à un mauvais pronostic ^{323,330,331}.

MYC est un facteur de transcription impliqué dans de nombreux processus biologiques, dont la prolifération, la différenciation, et la croissance cellulaire, l'activité télomérase, le métabolisme énergétique, et l'apoptose ³³². *MYC* est globalement inhibé par *BCL6* dans le GC, mais peut être exprimé de manière constitutive et ectopique dans 10 à 14% des DLBCL de type GC, le plus souvent en raison d'une translocation chromosomique le plaçant sous le contrôle du locus des Ig ^{333,334}. La dérégulation de *MYC* est également de mauvais pronostic ³³⁵. Dans 5 à 10% des DLBCL, des translocations chromosomiques affectent à la fois *BCL2* et *MYC*, conférant à ces lymphomes double-hit un pronostic péjoratif ³³⁶.

EZH2 est une méthyltransférase responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), une marque épigénétique associée à la répression transcriptionnelle. *EZH2* est nécessaire à la formation du GC et impliquée dans le contrôle épigénétique de nombreux gènes liés à la régulation du cycle cellulaire et à la différenciation terminale des lymphocytes B ^{337,338}. Des mutations activatrices d'*EZH2* sont retrouvées dans 22% des cas de DLBCL de type GC ^{339,340}.

Le maintien des lymphocytes B au sein du follicule est médié par les récepteurs S1PR2 (*sphingosine-1-phosphate receptor 2*) ³⁴¹ et P2RY8 (*P2Y receptor family member 8*) ³⁴², dont la liaison à des ligands lipidiques entraînent une inhibition de la signalisation pAKT et de la migration cellulaire. Des mutations de ces récepteurs et de la voie de signalisation correspondante sont observées dans 30% des DLBCL de type GC ^{342,343}.

Pour finir, des délétions et mutations de *TNFRSF14* (*TNF receptor superfamily member 14*), codant pour la protéine HVEM (*herpes virus entry mediator*), sont retrouvées dans 30% des DLBCL de type GC, et uniquement dans ce type. Les voies de signalisation activées par HVEM, qui peut être exprimé par les lymphocytes T et B, sont variées et dépendent de ses nombreux ligands ³⁴⁴. Des travaux menés dans un modèle murin de FL ont montré les propriétés de gènes suppresseur de tumeur d'HVEM, dont la perte de fonction entraînerait la levée des interactions cellule-cellule inhibitrices médiées par HVEM et son ligand BTLA, favorisant un environnement pro-tumoral ³⁴⁵.

Le DLBCL de type ABC est caractérisé au niveau moléculaire par des altérations génomiques affectant des gènes des voies de signalisation du BCR et des TLR, entraînant une activation constitutive de la voie NF- κ B ³⁰³. Y sont notamment associées des mécanismes de blocage de la différenciation terminale B, ainsi que de fréquentes amplifications de *BCL2* (30% des cas) ^{323,346}. Parmi les mécanismes d'activation de la voie NF- κ B, on retrouve des mutations de la voie du BCR, de *MYD88*, ou bien de *TNFAIP3*. L'activation chronique du BCR dans le DLBCL de type ABC peut être par exemple liée à des mutations gain-de-fonction de *CD79B* ou de *CD79A* (21% des cas), mais les mécanismes d'amplification du signal BCR seraient insuffisants et nécessiteraient également une interaction chronique du BCR avec des auto-antigènes ^{347,348}. *MYD88*, impliquée dans la transmission du signal entre TLR et voie NF- κ B et dans la voie JAK/STAT3, présente des mutations gain-de-fonction de son gène dans environ 30% des DLBCL de type ABC ^{349,350}. *TNFAIP3*, qui code pour une enzyme également appelée A20 et impliquée dans la régulation négative de la voie NF- κ B, présente des mutations inactivatrices dans presque 30% des cas de DLBCL de type ABC ³⁵¹⁻³⁵³. L'activation de la voie NF- κ B est très souvent associée à un blocage de la différenciation B. Ainsi, 25% des patients présentent des mutations perte-de-fonction ou des délétions de *PRDM1/BLIMP1*, un répresseur transcriptionnel inhibant notamment *BCL6*, impliqué dans la différenciation plasmocytaire et exprimé par un contingent de lymphocytes B de la zone claire engagé dans cette voie de différenciation ^{314,354}.

Le DLBCL, ou plutôt les DLBCL, constituent un ensemble de lymphomes agressifs partageant un aspect histologique typique mais présentant une grande variété de présentations clinico-biologiques, avec des aspects physiopathologiques et pronostiques hétérogènes.

2.1.3 Lymphome folliculaire (FL)

2.1.3.1 Définition et épidémiologie

Le lymphome folliculaire (FL) est le deuxième LNH le plus fréquent derrière le DLBCL ; il représente 20% des lymphomes, avec une incidence estimée à 3500 nouveaux cas par an en France ^{255,355}. Comme le DLBCL, c'est une maladie du sujet relativement âgé, avec un âge moyen au diagnostic de 65 ans, et une légère prédominance masculine (sexe-ratio de 1,2) ³⁵⁶. Il semble

plus fréquent dans les populations caucasiennes et plus rare sur les continents africain et asiatique. Différents facteurs de risque ont été décrits, parfois avec des résultats contradictoires, mais l'exposition à certains herbicides et pesticides semble augmenter le risque de FL ^{261,357-359}.

C'est un lymphome indolent mais incurable, avec une phase asymptomatique précédant sa révélation clinique puis une évolution lente caractérisée par des rechutes, et ce malgré les avancées thérapeutiques considérables des deux dernières décennies ³⁶⁰⁻³⁶². Il est défini par son aspect histologique, dont il tient son nom : c'est une néoplasie lymphocytaire B du GC avec une présentation folliculaire focale ²⁵⁵.

2.1.3.2 Diagnostic et pronostic

La présentation clinique au diagnostic se limite généralement à des adénopathies paucisymptomatiques le plus souvent périphériques, parfois de découverte fortuite lors d'un examen d'imagerie, et pouvant fluctuer plusieurs années en l'absence de traitement ^{255,360,363}. Si les signes généraux associés aux lymphomes B (fièvre, sueurs nocturnes, amaigrissement) sont peu fréquents ³⁶³, le FL est souvent déjà disséminé au diagnostic, avec une atteinte médullaire retrouvée dans 70% des cas, et pouvant être à l'origine de cytopénies ^{255,360,363}. L'atteinte médullaire est un facteur prédictif péjoratif de rechute ²⁵⁵. Les atteintes extranodales sont rares et constituent parfois des FL localisés (duodéal, cutané, testiculaire) faisant l'objet d'une classification particulière, et caractérisés par un pronostic favorable ^{255,355}.

Le diagnostic de FL repose sur l'examen histologique d'une biopsie tumorale, qui révèle un effacement de l'architecture ganglionnaire normale par des follicules néoplasiques envahis de cellules de type centrocytes et/ou centroblastes. La quantification des cellules d'aspect centroblastique par champ microscopique permet d'établir le grade du FL ; les grades 1 et 2 en contiennent peu, contrairement au grade 3, qui est subdivisé en 3A et 3B en fonction de la présence ou non de centrocytes résiduels. Les patients présentant un FL de grade 3B, considéré comme plus agressif, sont traités comme des patients atteints de DLBCL ³⁶³. La majorité des patients sont diagnostiqués aux grades 1/2.

Des analyses complémentaires peuvent être effectuées. Un phénotypage en CMF retrouvera des cellules tumorales B CD10^{pos}CD5^{neg}CD43^{neg}, exprimant fortement BCL2, mais aussi BCL6 en fonction du stade la maladie. Des analyses cytogénétiques peuvent être réalisées pour mettre en évidence la translocation t(14;18) emblématique du FL ; à l'aide d'un caryotype, ou bien d'une FISH localisant le gène *IGH-BCL2*, produit de fusion de la translocation ³⁶⁰. La translocation t(14;18) n'est toutefois pas pathognomonique du FL, elle n'est ni nécessaire ni suffisante pour poser le diagnostic ³⁵⁵.

Le bilan d'extension au diagnostic, ainsi que le suivi, reposent sur le PET-scanner, à la recherche d'adénopathies profondes et/ou de petite taille, et sur la biopsie ostéo-médullaire

(BOM), à la recherche d'un envahissement médullaire. L'évaluation de la dissémination du lymphome permet la stratification des patients suivant la classification d'Ann Arbor/Lugano ²⁶², qui permet aussi d'évaluer la réponse au traitement. On distingue les FL de stade limité (I/II) des FL de stade avancé (III/IV), qui représentent la majorité des diagnostics du fait du développement indolent de la pathologie ^{262,363}. Différents scores pronostiques ont également été développés, et sont utilisés principalement dans le cadre des essais cliniques. Le FLIPI (*Follicular Lymphoma International Prognostic Index*) ³⁶⁴ et le FLIPI2 ³⁶⁵ sont les plus fréquemment employés et reposent respectivement sur la survie globale (OS – *overall survival*) et la survie sans progression (PFS – *progression free survival*). Un score simplifié intégrant uniquement le dosage de la $\beta 2m$ et l'invasion médullaire, baptisé PRIMA-PI (*PRIMA-prognostic index*), a été proposé pour une application facilitée en pratique courante ³⁶⁶. Avec la démocratisation progressive de la biologie moléculaire, différents scores reposant sur des panels mutationnels ont été proposés, mais leur utilisation reste limitée par l'accès aux technologies de séquençage, et leur valeur pronostique est tributaire des traitements utilisés ^{362,367}. Ainsi, le m7-FLIPI intègre au FLIPI le statut mutationnel de 7 gènes d'intérêt pronostique (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP* et *CARD11*), permettant ainsi d'identifier plus finement les patients à risque de rechute à l'immunothérapie de première ligne ³⁶⁸. Un autre outil, permettant d'identifier les patients à risque élevé de transformation histologique, repose sur un panel mutationnel de 4 gènes (*NOTCH2*, *DTX1*, *UBE2A*, *HIST1H1E*) ³⁶⁹.

Le pronostic du FL est plutôt bon puisque la médiane de survie est supérieure à 15 ans, avec un état général souvent conservé. Le taux de survie à 10 ans est supérieur à 90% chez les patients présentant une faible masse tumorale, et supérieur à 80% chez ceux avec une forte masse tumorale ³⁵⁵. Néanmoins, la plupart des patients alternent périodes de rémission et rechutes, avec une maladie de plus en plus résistante aux traitements. Le risque de transformation histologique en lymphome agressif, le plus souvent de type DLBCL, est de 2% par an soit 20% au cours de leur vie, et grève le pronostic ³⁷⁰. Malgré les progrès thérapeutiques, le FL reste incurable et la première cause de mortalité des patients demeure leur hémopathie ³⁷¹.

2.1.3.3 Aspects thérapeutiques

Le traitement de première ligne dépend du stade de la maladie, déterminé par la classification d'Ann Arbor/Lugano ²⁶². Les FL de stade limité (I/II) peuvent être traités par radiothérapie localisée. Chez certains patients, notamment en cas de comorbidités, l'abstention thérapeutique accompagnée d'une simple surveillance peut être envisagée, sans préjudice en terme de survie. Même au stade avancé, si les patients présentent une faible masse tumorale et sont asymptomatiques (absence de signes B, de cytopénies, d'atteinte d'organe), l'abstention thérapeutique avec surveillance rapprochée est recommandée, compte tenu de l'incurabilité et des effets indésirables des traitements ^{362,363}. C'est au total 30% des patients qui bénéficieront de

cette stratégie « *watch and wait* ». A contrario, en cas de forte masse tumorale, quelle que soit la dissémination (stade II « *bulky* » ou stades III/IV), un traitement par immunochimiothérapie est indiqué ³⁶³. L'ajout de rituximab à la chimiothérapie ayant considérablement amélioré la survie des patients ^{372,373}, son utilisation est incontournable quel que soit le schéma thérapeutique utilisé : R-CHOP, R-CVP (rituximab, cyclophosphamide, vincristine, prednisone) ou B-R (bendamustine, rituximab). Un autre anti-CD20, l'obinutuzumab, a montré une augmentation de la PFS, mais sans amélioration de l'OS ³⁷⁴. Sa conception visant à induire davantage d'ADCC pourrait en partie expliquer les effets indésirables plus importants observés chez les patients, qui limitent son utilisation. Plus récemment, le remplacement de la chimiothérapie par un immunomodulateur, le lénalidomide (Revlimid), a montré des résultats équivalents aux protocoles conventionnels tout en réduisant la toxicité ³⁷⁵⁻³⁷⁹. Le protocole R² (Revlimid/rituximab) devrait donc se généraliser dans les années à venir.

La plupart des patients rechutent après quelques années, même après une bonne réponse initiale. De nouveau, l'instauration d'un traitement de seconde ligne dépendra de la masse tumorale et/ou de la symptomatologie ³⁶³. En cas de forte masse tumorale ou de signes généraux, diverses options sont envisageables, comme le rituximab seul ³⁸⁰, un protocole incluant l'obinutuzumab ³⁸¹, un schéma R² ³⁸², ou encore une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, réservée aux sujets jeunes présentant une pathologie résistante ³⁸³.

Le décryptage de la physiopathologie de la maladie a conduit à l'apparition d'approches thérapeutiques innovantes. Ainsi, les voies de signalisation du BCR, impliquées dans la lymphomagenèse, peuvent être ciblées par des inhibiteurs enzymatiques. L'ibrutinib (inhibiteur de BTK), bien que décevant en monothérapie ^{384,385}, a montré des résultats encourageants en association avec le rituximab ³⁸⁶. Un autre inhibiteur de BTK, l'alacabrutinib, pourrait aussi être efficace en monothérapie ou en association avec le rituximab ³⁸⁷. Les inhibiteurs de PI3K comme l'idelalisib, le copanlisib, le duvelisib et l'umbralisib sont également prometteurs ³⁸⁸⁻³⁹³, tout comme le tazemetostat, inhibiteur d'EZH2 ³⁹⁴. Le venetoclax, inhibiteur de BCL2, s'est également révélé peu convaincant ^{297,395}. Les cellules CAR-T anti-CD19 peuvent également être indiquées dans des FL réfractaires ou transformés ^{377,396-401}. Enfin, des anticorps bispécifiques ciblant conjointement CD3 et CD20 afin de favoriser l'engagement des lymphocytes T anti-tumoraux (*bispecific T-cell engaging antibodies*), comme le mosunetuzumab, pourraient représenter une alternative thérapeutique de choix, seuls ou en association ⁴⁰²⁻⁴⁰⁵.

Tout comme dans le DLBCL, les approches de biologie moléculaire ont souligné l'intérêt pronostique et prédictif du paysage mutationnel du FL, suggérant que certains patients pourraient bénéficier de traitements spécifiques.

2.1.3.4 Lymphomagenèse du FL

L'exploration de son paysage mutationnel a permis de mettre en évidence trois éléments fondamentaux de la lymphomagenèse du FL : la translocation *IGH/BCL2*, des altérations génétiques additionnelles affectant en particulier la régulation épigénétique, et l'acquisition d'un BCR N-glycosylé ⁴⁰⁶.

La translocation réciproque t(14;18)(q32;q21), quoique non pathognomonique – on peut la retrouver dans certains DLBCL mais aussi chez des individus sains, et elle est absente dans certains cas de FL – est emblématique du lymphome folliculaire. Cette translocation serait le premier évènement oncogénique intervenant dans la lymphomagenèse, survenant précocement dès le stade pro-B dans la moelle osseuse, après un réarrangement chromosomique aberrant au cours de la recombinaison VDJ. Elle confère un avantage de survie au lymphocyte B, en positionnant le gène anti-apoptotique *BCL2* sous la dépendance du promoteur du gène des chaînes lourdes d'Ig (*IGH*), entraînant son expression constitutive ^{252,407,408}. Toutefois, *BCL2* présente également des propriétés anti-prolifératives ⁴⁰⁹, et une translocation t(14;18) est retrouvée dans une faible proportion des lymphocytes B de près de 70% des individus sains – dont la plupart ne développeront pas de FL – avec une incidence augmentant avec l'âge ^{410,411} ; ces deux éléments amènent à penser que d'autres évènements sont nécessaires à la survenue du FL ⁴¹². De plus, la translocation *IGH/BCL2* n'est pas retrouvée dans 10 à 15% des cas de FL ; il existe des FL *BCL2* négatifs, notamment parmi les FL de grade 3 ^{255,363,408,413}.

Après avoir migré aux OLS, les lymphocytes B pré-tumoraux, protégés de la sélection d'affinité par la surexpression de *BCL2*, y recevront de nouveaux signaux (notamment antigéniques) entraînant leur entrée dans le GC, leur prolifération, l'acquisition de nouvelles mutations orchestrées par AID, puis leur recirculation dans l'organisme ^{253,409,412}. Au bout de plusieurs années, après de multiples passages par le GC et l'accumulation d'altérations génomiques ⁴¹², le lymphocyte B porteur de la translocation t(14;18) sera à l'origine du clone tumoral, ou plutôt des différents clones tumoraux du FL. En effet, la progressivité voire la lenteur de l'émergence de cette pathologie expliquerait son hétérogénéité et la multiplicité des sous-clones tumoraux retrouvés dans les différentes niches tumorales ⁴¹⁴. Certains facteurs génotoxiques pourraient également être à l'origine de ces hits oncogéniques supplémentaires. Notons d'ailleurs que l'exposition aux pesticides et herbicides est un facteur de risque du FL, et que la fréquence de la translocation t(14;18) augmente drastiquement chez les individus exposés aux pesticides ³⁵⁷⁻³⁵⁹.

Bien qu'il n'ait pas été aussi extensivement étudié que celui du DLBCL, le paysage mutationnel du FL est relativement bien décrit, et on retrouve nombre de similarités parmi les altérations génomiques affectant les histones et leur régulation dans ces deux lymphomes dérivés du GC.

Ainsi, des mutations affectant les méthyltransférases KMT2D/MLL2 et EZH2 sont retrouvées dans respectivement 70 à 90% et 10 à 30% des cas de FL, tandis que les gènes des acétyltransférases CREBBP et son partenaire EP300 sont mutés dans 30 à 70% et 10 à 20% des cas ^{302,307,339,415-418}. KMT2D est affecté par des mutations perte-de-fonction, dont le potentiel lymphomagène a été démontré chez la souris ⁴¹⁹. Les mutations perte-de-fonction de CREBBP ont pour conséquence la dérégulation de BCL6, dont il est un répresseur, l'inhibition du gène suppresseur de tumeur TP53, mais aussi une baisse d'expression du CMH II favorisant l'échappement à la réponse immune et à la pression de sélection induite par les Tfh ^{307,420,421}. Le gène ARID1A, qui code pour une protéine intervenant dans le remodelage de chromatine et reconnaissant les dommages à l'ADN, est muté dans 15% des FL ; sa perte de fonction augmente l'instabilité génétique ⁴²². Au total, la quasi-totalité des FL chez les patients adultes présentent des mutations de gènes impliqués dans l'épigénétique, qui sont autant de hits oncogéniques additionnels à la translocation IGH/BCL2 ^{418,423,424}. Ces altérations épigénétiques, qui interviendraient assez précocement dans la lymphomagenèse, ont pour point commun de préserver un programme génétique de type GC et de bloquer la différenciation en plasmocytes, notamment en maintenant l'expression de Bcl6 ²⁴⁹. Les lymphocytes B de FL ne restent néanmoins pas figés dans un programme génétique donné, ils conservent une hétérogénéité et une plasticité de leurs profils transcriptionnels ⁴²⁵. Il a été proposé de désigner les lymphocytes B arrêtés dans un phénotype de type GC par l'appellation FLLC (*follicular lymphoma like cells* – cellules de type lymphome folliculaire) ⁴⁰⁷. Ces FLLC, caractérisées par leur forte instabilité génétique, vont disséminer, recirculer dans l'organisme et entre les OLS, former de nouveaux GC et créer de nombreux sous-clones. Les FLLC seraient à l'origine de cellules précurseurs de cancer (CPC) et de néoplasies folliculaires *in situ* ^{360,426}. Les CPC constitueraient un réservoir de cellules pré-cancéreuses, responsable des rechutes, tandis que les néoplasies folliculaires *in situ* représentent un stade préclinique susceptible d'évoluer en FL.

La nécessité de l'expression d'un BCR fonctionnel est soulignée par le biais de sélection négatif contre les mutations affectant le BCR constaté dans le FL ^{406,427,428}. Une activation constante du BCR semble même requise pour la survie des cellules tumorales, à l'image des lymphocytes B normaux ⁴²⁹. Cette stimulation du BCR ne semble pas passer par une interaction avec un auto-antigène, puisque peu de cellules tumorales de FL se révèlent capables de reconnaître un antigène (Ag) du soi ⁴³⁰, et que l'intense mutagenèse rend peu probable la reconnaissance d'un même Ag spécifique tout au long de la lymphomagenèse ⁴⁰⁷. Une stimulation Ag-indépendante du BCR serait donc en cause, via l'interaction d'un BCR N-glycosylé avec des lectines du microenvironnement tumoral ⁴⁰⁶. En effet, des motifs de N-glycosylation sont retrouvés dans les régions variables des chaînes lourdes dans quasiment tous les FL ⁴³¹. Des altérations génétiques sont à l'origine de l'introduction de ces motifs oligo-mannoses, qui vont interagir avec la lectine DC-SIGN/CD209

exprimée à la surface de cellules du microenvironnement – au premier rang desquels les macrophages – et induire l'activation de la voie de signalisation du BCR^{432,433}. Cette interaction du BCR N-glycosylé avec DC-SIGN induit un signal de survie pour les lymphocytes B de FL, plus important pour les FL d'isotype IgM^{434,435}. Un BCR N-glycosylé semble indispensable à la lymphomagenèse du FL, puisque les clones qui ne présentent pas ou perdent les modifications génétiques induisant son expression ne persistent pas⁴³⁶. De plus, les FLLC subissent une pression de sélection pour conserver un BCR d'isotype IgM, alors que le processus de CSR est actif. Ainsi, la plupart des FL présentent une commutation de classe aberrante de l'allèle fonctionnel permettant de conserver l'expression d'une IgM, alors que l'allèle non fonctionnel en raison de la translocation BCL2/IGH subit une CSR normale^{407,437,438}.

D'autres altérations génomiques peuvent intervenir dans le FL, affectant notamment des régulateurs de la différenciation B, comme *BCL6* ou *MEF2B*, mutés respectivement dans 50% et 15% des cas^{416-418,439}. De la même manière que dans le DLBCL, c'est une sur-activation du répresseur transcriptionnel BCL6 qui va entraîner un blocage de la différenciation B et le maintien d'un phénotype de type GC.

Pour finir, certaines mutations n'ont pas d'effet oncogénique direct mais vont altérer le dialogue avec le microenvironnement⁴⁴⁰. Nous l'avons vu, *CREBBP* fonctionne comme un gène suppresseur de tumeur en régulant notamment BCL6, mais ses mutations inactivatrices vont aussi être à l'origine d'une diminution de l'expression du CMH II et de l'inhibition de nombreux gènes impliqués dans la présentation antigénique par les cellules malignes de FL, entraînant une baisse de l'interaction avec le TCR des lymphocytes T, notamment des Tfh, favorisant ainsi l'échappement à la surveillance immune et à la sélection d'affinité médiée par les Tfh^{307,420,421}. La diminution de interactions B tumoraux – Tfh est également médiée par des mutations d'*EZH2*, qui atténuent la dépendance des lymphocytes B aux signaux de survie des Tfh, favorisant ainsi le rôle de soutien des FDC⁴⁴¹. L'interaction de DC-SIGN/CD209, exprimé par les macrophages, avec le BCR N-glycosylé, qui favorise la survie des lymphocytes B de FL, est également rendue possible par des mutations génétiques. Enfin, une inactivation du gène *TNFRSF14* codant pour HVEM est présente dans la moitié des FL, et associée à un pronostic péjoratif^{418,442}. En compromettant l'interaction d'HVEM avec son ligand BTLA, les mutations perte-de-fonction vont favoriser un environnement tumoral de soutien via le recrutement de lymphocytes Tfh et l'activation des lymphocytes B tumoraux et de cellules stromales présentant des propriétés pro-tumorales³⁴⁵.

2.2 Le rôle déterminant de la niche tumorale de soutien

2.2.1 Diversité des microenvironnements de lymphomes B

Tout comme les cellules malignes de tumeurs solides, les cellules lymphomateuses évoluent au sein d'un microenvironnement tumoral. La composition de ce TME dépend de multiples facteurs interdépendants, liés à la localisation tissulaire (de la tumeur initiale, mais aussi des localisations secondaires en cas de dissémination), aux caractéristiques propres des cellules tumorales (aberrations génétiques, prolifération, capacité d'échappement immunitaire, degré de dépendance aux signaux de survie...), et à la réponse immune. L'intégration de l'ensemble de ces paramètres conduit à la formation d'une niche tumorale variant d'une tumeur à l'autre. Dans le cas des lymphomes B, trois modèles archétypaux de microenvironnement ont été proposés ²⁵⁴ (Figure 15). Un premier modèle, dit de recrutement, est incarné par le lymphome de Hodgkin classique. Dans ce modèle, les cellules tumorales, très minoritaires, évoluent au sein d'une niche de soutien composée de cellules non malignes distinctes des cellules physiologiques des tissus lymphoïdes normaux. Un second modèle, dit d'effacement, est représenté par le lymphome de Burkitt. Cette fois, les cellules tumorales présentent des altérations génétiques leur conférant un fort pouvoir de prolifération et une autonomie vis-à-vis des signaux de survie, rendant inutile la présence d'une niche de soutien. La dépendance des lymphomes B à leur niche, indirectement représentée par le taux d'infiltration de cellules tumorales, varie grandement en fonction de la pathologie : depuis le lymphome de Hodgkin, hautement dépendant à des cellules de soutien qui représentent 90% des cellules de la niche, jusqu'au lymphome de Burkitt, virtuellement indépendant de cellules non malignes quasiment inexistantes ²⁵⁴ (Figure 15). Le troisième et dernier modèle, dit rééducatif, est illustré par le FL. Dans ce modèle, les cellules lymphomateuses conservent un certain degré de dépendance à l'égard de cellules non malignes leur fournissant des signaux de survie. La composition et l'organisation de la niche de soutien est dans ce cas relativement similaire à celle des tissus lymphoïdes physiologiques. Le DLBCL étant une pathologie très hétérogène, son microenvironnement se révélera plus ou moins proche des modèles d'effacement ou de rééducation. Le DLBCL comme le FL surviennent le plus souvent dans les ganglions lymphatiques, les présentations extra-nodales étant rares. La composition de leur microenvironnement correspondra donc aux restes du tissu lymphoïde normal, plus ou moins effacé et modifié par l'infiltration de cellules malignes, la réponse immune de l'hôte, mais aussi les traitements.

Le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans la physiopathologie des lymphomes B, ce qui se traduit en terme pronostique et de réponse aux traitements ^{254,263,443,444}.

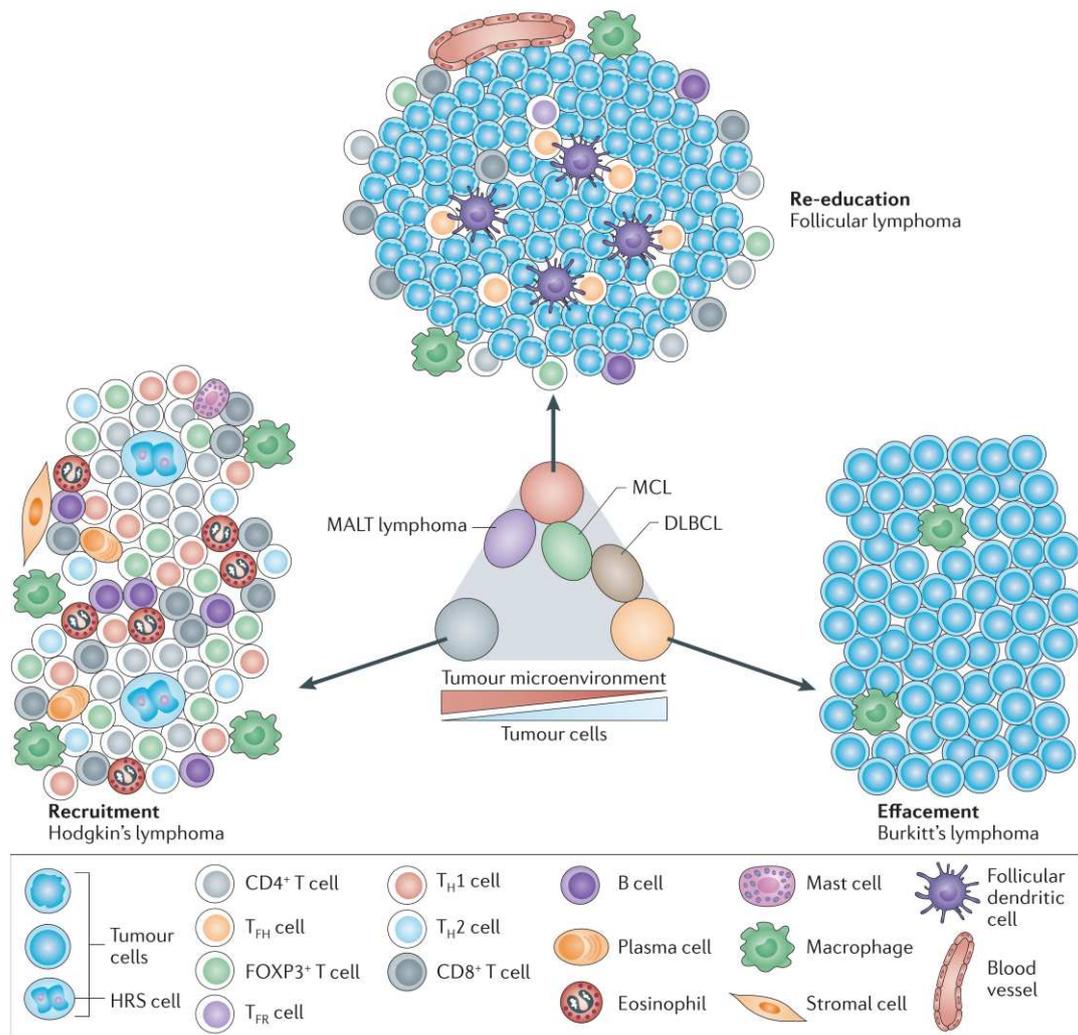


Figure 15 | **Composition du microenvironnement des lymphomes B**

Composition schématique des niches tumorales typiques de trois lymphomes B, représentant les extrêmes d'un spectre de microenvironnements tumoraux : recrutement, rééducation, effacement, dépendants de l'infiltration tumorale. Le microenvironnement du lymphome de Hodgkin contient environ 1% de cellules tumorales, avec un ratio cellules malignes/cellules de la niche faible, alors que la niche du lymphome de Burkitt est envahie par plus de 90% de cellules tumorales, avec un ratio cellules malignes/cellules de la niche très élevé. Le FL et le DLBCL représentent des états intermédiaires. DLBCL, lymphome diffus à grandes cellules B ; HRS, cellules de Reed-Sternberg (*Hodgkin Reed-Sternberg*); MALT, tissu lymphoïde associé aux muqueuses (*mucosa-associated lymphoid tissue*); MCL, lymphome du manteau (*mantle cell lymphoma*); TFH, lymphocyte T *follicular helper*; TH, lymphocyte T *helper*; TFR, lymphocyte T régulateur folliculaire. D'après Scott & Gascoyne ²⁵⁴.

2.2.2 Implication de la niche lymphomateuse dans la réponse aux inhibiteurs de points de contrôle

Le TME des lymphomes B est variable sur le plan qualitatif et quantitatif en termes de cellules immunitaires et stromales, de vascularisation et de matrice extracellulaire. Sur le plan cellulaire, on trouvera au sein du TME des cellules stromales, endothéliales, et des cellules de l'immunité

comme les lymphocytes T (dont des lymphocytes T CD8 cytotoxiques, T *helper* (Th), T *follicular helper* (Tfh), T régulateurs) et les phagocytes mononucléés (macrophages, monocytes, cellules dendritiques, MDSC) ^{254,443,445}. L'immunothérapie, qui constitue actuellement le traitement de choix des lymphomes B, influence et repose en partie sur les cellules du TME, et en particulier les cellules immunitaires. Cela est illustré par le rôle pronostique majeur de signatures transcriptomiques associées au compartiment stromal et/ou aux macrophages dans les lymphomes B, rôle pronostique qui peut varier de péjoratif à favorable avec l'arrivée des immunothérapies de type anticorps anti-CD20, comme le rituximab ^{263,444,446-451}. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) de lymphome joueraient donc un rôle essentiel dans l'efficacité du traitement par rituximab, probablement lié à leurs propriétés de phagocytose et de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCP et ADCC). L'ADCC fait évidemment également intervenir les lymphocytes T cytotoxiques.

L'immunothérapie ne se résume pas aux anticorps anti-CD20, qui ciblent directement les lymphocytes B tumoraux afin de les éliminer. Après avoir révolutionné la prise en charge de nombreux cancers solides ^{452,453}, les approches de type blocage des points de contrôle immunitaires ont été testées dans le lymphome. Les stratégies ICB sont avant tout représentées par leurs chefs de file anti-PD1 et anti-PDL1, qui visent à bloquer les interactions entre PDL1 exprimé par les cellules tumorales ou d'autres cellules du TME et PD1 exprimé principalement par les lymphocytes T cytotoxiques, interactions qui rendront ces derniers anergiques. Les résultats de premiers essais cliniques ont mis en évidence une efficacité remarquable des traitements ICB dans le lymphome de Hodgkin classique et le lymphome à grandes cellules B primitif du médiastin (PMBCL) ⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁷. A contrario, les ICB se sont révélés plutôt décevants dans le FL et le DLBCL ^{289,458,459}. Ces apparentes discordances sont à mettre en regard de la diversité moléculaire des lymphomes, mais aussi et peut-être surtout de la diversité des niches tumorales de soutien. En effet, l'efficacité des ICB semble corrélée à certaines particularités microenvironnementales. Comme évoqué plus haut, l'implication de la texture immunitaire dans la réponse aux ICB a fait l'objet de nombreux travaux aboutissant à l'établissement des concepts archétypaux de tumeurs « chaudes », inflammatoires, infiltrées par les lymphocytes T, opposées aux tumeurs « froides », non inflammatoires, non infiltrées par les lymphocytes T. Les tumeurs infiltrées par les lymphocytes T sont promptes à répondre à l'ICB, contrairement aux tumeurs non infiltrées ¹⁰⁷⁻¹¹⁰. De la même manière, le lymphome de Hodgkin classique se caractérise par un TME inflammatoire et se révèle sensible à la thérapie ICB ⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁶. A l'inverse, dans les lymphomes peu infiltrés par des cellules inflammatoires, comme le FL ou le DLBCL, la stratégie ICB semble moins efficace ^{289,459}. Les altérations génétiques des cellules tumorales, qui peuvent dicter la texture immunitaire ⁴⁶⁰, permettent d'expliquer au moins partiellement ces différences. Les cellules tumorales du lymphome de Hodgkin, appelées cellules de Reed-Sternberg

(HRS – *Hodgkin-Reed-Sternberg cells*) présentent de très nombreuses altérations génétiques facilitant l'échappement immunitaire, en particulier des gains de copies du gène PDL1 entraînant sa surexpression^{324,461,462}. Si elles n'ont pas été décrites dans le FL, jusqu'à près de 30% des DLBCL, principalement de type ABC, présenteraient des atteintes génétiques similaires, associées à un TME infiltré³²⁴⁻³²⁶. L'application du concept de tumeur infiltrée versus non infiltrée est moins aisée dans les lymphomes et pourrait être réductrice, du fait de leur tropisme au sein des OLS physiologiquement riches en cellules immunitaires. Toutefois, la description fine de la niche tumorale, associée aux anomalies génétiques arborées par les cellules tumorales et à la réponse aux stratégies thérapeutiques de type ICB, permet l'extrapolation de ce concept au lymphome⁴⁶³. Les lymphomes infiltrés, bons répondeurs à l'ICB, seraient donc le lymphome de Hodgkin, le PMBCL, et certains DLBCL. La majorité des DLBCL, les FL et le lymphome de Burkitt feraient partie des lymphomes non inflammatoires, peu sensibles à l'ICB.

En définitive, une connaissance précise des TME des différents lymphomes permettrait de comprendre, prédire, et même améliorer la réponse à l'ICB. La réponse à l'ICB n'est en effet pas clairement corrélée aux altérations génétiques affectant PDL1 ni à son expression dans les cellules tumorales de DLBCL^{289,326}. De plus, mieux comprendre les mécanismes par lesquels les lymphomes non infiltrés échappent à la réponse T cytotoxique pourrait permettre de concevoir des nouvelles molécules visant à contourner ces processus d'échappement. Ces nouvelles pistes thérapeutiques pourraient être utilisées indépendamment ou en association avec les ICB, comme cela a par exemple été testé avec succès dans un modèle murin de lymphome traité par ICB et vaccination *in situ*⁴⁶⁴.

2.2.3 Microenvironnement tumoral du DLBCL

Le terme DLBCL regroupe un ensemble de lymphomes B dérivés du GC partageant des caractéristiques histologiques mais hautement hétérogène sur le plan moléculaire, comme cela a été souligné par les études de séquençage ADN et ARN, à l'échelle de la tumeur puis de la cellule unique. On peut donc logiquement concevoir que les différents sous-types de DLBCL présentent des TME variés, plus ou moins proches des différents modèles de niches lymphomateuses. Ainsi, une étude récente propose de distinguer 4 groupes de DLBCL, sur la base de signatures transcriptomiques microenvironnementales obtenues par déconvolution : de type GC, mésenchymateux, inflammatoire, et désertique (*GC-like, mesenchymal, inflammatory, depleted*)⁴⁶⁵. La signature de type GC est riche en gènes associés aux cellules du GC (Tfh, FDC), ainsi qu'en lymphocytes Treg, évoquant le TME du FL et le modèle rééducatif. Le groupe mésenchymateux est enrichi en gènes associés à la MEC et son remodelage et en cellules fibroblastiques (cellules fibroblastiques réticulaires [FRC – *fibroblastic reticular cells*] et CAF). La signature inflammatoire serait le résultat d'une infiltration de granulocytes, macrophages, lymphocytes T, rappelant le

modèle de recrutement. Enfin, les DLBCL désertiques présentent un TME quasi inexistant, proche du modèle de TME d'effacement. Les différents acteurs de la niche, cellulaires ou non, vont soutenir la tumeur par divers mécanismes, plus ou moins partagés par les différents sous-groupes de DLBCL, et qui peuvent être orchestrés par les cellules tumorales.

La niche tumorale du DLBCL peut être influencée par des mécanismes oncogéniques liés aux cellules tumorales. Dans le cas des DLBCL non infiltrés, les altérations génétiques des cellules malignes entraînant l'exclusion des lymphocytes T restent à élucider ⁴⁶³. De surcroît, cette catégorie semble regrouper une grande variété de DLBCL, tant en terme de paysage mutationnel que microenvironnemental : on y retrouve probablement les sous-groupes désertique, mésenchymateux, et de type GC décrits ci-avant ⁴⁶⁵. Néanmoins, des mutations des gènes *PTEN*, *EZH2*, ou encore *TP53* sont associées à une diminution de signatures transcriptomiques associées aux cellules de l'immunité innée et/ou adaptative ³⁰⁵. En outre, des mutations activatrices d'*EZH2* semblent fortement liées à la diminution de l'expression du CMH par les cellules tumorales mais aussi de l'infiltration T ^{271,466}. Bien que purement corrélatives, ces associations suggèrent une implication de ces différentes mutations dans l'exclusion de la réponse immune médiée par la tumeur.

Le rôle des aberrations génomiques des cellules tumorales dans la promotion d'un microenvironnement infiltré n'est guère plus limpide. Un sous-groupe de DLBCL présenterait une suractivation de la voie NF- κ B et une surexpression de PDL1, associées à une signature transcriptomique de réponse immune, et un microenvironnement inflammatoire ^{326,463,465,467,468}. D'autres travaux ont mis en évidence un sous-groupe de DLBCL présentant des mutations des gènes *NOTCH* et une signature liée à la réponse immune, suggérant un lien entre ces mutations et un microenvironnement inflammatoire ^{265,266,352}. Le rôle de ces mutations dans le recrutement et/ou l'activation des cellules immunitaires reste à élucider, d'autant que, de nouveau, ces associations sont purement corrélatives. Des études fonctionnelles *in vitro* ou *in vivo* sont nécessaires pour identifier les éventuels liens mécanistiques entre altérations génétiques des cellules tumorales d'un côté et propriétés fonctionnelles des cellules du TME de l'autre, puisque ces deux compartiments co-évoluent au cours de la tumorigenèse. De tels travaux ont permis de suggérer récemment que les mutations inactivatrices de l'acétyltransférase CREBBP et de son partenaire EP300 pourraient entraîner une activation de la voie NOTCH et la production de CCL2 et de CSF1 par les cellules tumorales, à l'origine du recrutement de TAM de type M2 ⁴⁶⁹.

Le rôle du TME dans la pathogénie du DLBCL a été mis en avant par des travaux montrant que les patients atteints de DLBCL peuvent être séparés en deux groupes de pronostics distincts sur la base de leur signature transcriptomique. L'ensemble des gènes impliqués dans ces signatures

se sont révélés être liés à la niche et non aux cellules tumorales elles-mêmes. La première signature, nommée stromal-1, comprend des gènes associés à la MEC et aux macrophages, et est associée à un pronostic favorable. La deuxième, stromal-2, inclue des gènes associés à l'angiogenèse et est de moins bon pronostic ²⁶³. S'il est bel et bien reconnu, le rôle des différents acteurs du TME – lymphocytes T, dont les Treg, TAM, MDSC, cellules stromales et endothéliales, matrice extra-cellulaire – dans le soutien à la tumeur, l'échappement immunitaire et la résistance à l'immunothérapie reste encore flou à ce jour ^{470,471}.

La cellule tumorale des lymphomes B a la particularité de dériver de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, capables de présenter des Ag via les CMH de classe I et II. Par conséquent, afin d'éviter d'être hautement immunogènes, ces tumeurs présentent des mécanismes d'échappement immunitaire variés, déjà présentés plus haut. Ces mécanismes vont notamment influencer l'interaction avec les différents types de lymphocytes T, qui sont modifiés en terme quantitatif et qualitatif dans le DLBCL, avec des conséquences variables. Sur le plan pronostique, si les lymphocytes T CD8⁺ sont plutôt associés à un bon pronostic ⁴⁷², d'autres lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL – *tumor-infiltrating lymphocytes*), comme les lymphocytes T régulateurs (Treg) et/ou des lymphocytes T exprimant des points de contrôle immunitaires (IC) ont des valeurs pronostiques plus discutées ⁴⁷³⁻⁴⁷⁶. En comparaison aux OLS sains, les lymphocytes T de DLBCL expriment davantage de PD1 et présentent volontiers un phénotype épuisé (*exhausted*), illustré par la co-expression d'autres récepteurs inhibiteurs comme TIM3 (*T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3*) ^{477,478} et/ou LAG3 (*lymphocyte-activation gene 3*) ^{477,479} et/ou TIGIT (*T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains*) ⁴⁸⁰. Ces lymphocytes seraient donc incapables de déclencher une réponse anti-tumorale. Entre 40 et 70% des DLBCL présenteraient un TME exprimant PD1, mais les implications pathogéniques et répercussions pronostiques pourraient dépendre des particularités des cellules les exprimant, donc de la précision de leur description, mais aussi du traitement. Ainsi, si les TIL PD1^{pos} ont pu être associés à un bon pronostic ^{473,475}, des populations de TIL LAG3^{pos} et PD1^{pos}TIM3^{pos}LAG3^{pos} seraient plutôt en faveur d'un pronostic péjoratif ^{477,479}. En exprimant PD1, ces différents lymphocytes peuvent interagir avec PDL1 présenté par les cellules tumorales ou d'autres cellules du TME, ce qui empêchera leur activation et la réponse anti-tumorale. Ils représentent également une cible pour les traitements par ICB. Les résultats discutables des thérapies par ICB dans le DLBCL, ainsi que leur rôle pronostic ambigu, pourraient être expliqués par la présence d'autres points de contrôle à la surface de ces lymphocytes. Bien que cela n'ait pas été exploré dans le DLBCL, l'expression de TIM3, LAG3, TIGIT pourraient conférer aux TIL des fonctions inhibitrices d'autres cellules de l'immunité, dont les DC et les lymphocytes T effecteurs. La perte de l'interaction HVEM-BTLA constitue un autre exemple d'altération des interactions B-T physiologiques du GC dans le contexte du lymphome B. En effet, HVEM est normalement impliqué

dans le contrôle des lymphocytes B du GC par les Tfh, qui expriment son ligand inhibiteur BTLA. La perte de l'expression d'HVEM par les cellules lymphomateuses empêcherait donc leur interaction avec les Tfh et serait responsable d'une prolifération incontrôlée ⁴⁸¹.

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont des lymphocytes T CD4 habituellement définis par leur expression du facteur de transcription FOXP3 et présentant des propriétés immunosuppressives essentielles pour la tolérance immune mais délétères dans le cancer. Les lymphocytes Treg seraient 3 fois plus abondants dans les ganglions de DLBCL en comparaison avec des ganglions sains, des données obtenues cependant sur des ganglions probablement non réactionnels car prélevés lors de chirurgies mineures ⁴⁸². Étonnamment, les lymphocytes FOXP3^{pos} seraient associés à un pronostic favorable dans le DLBCL traités par chimiothérapie avec ou sans rituximab ^{473,474,476}. Leur implication dans la pathogénie du DLBCL nécessiterait donc des études complémentaires.

Des gènes associés aux macrophages figurent dans la signature stromal-1, associée à un pronostic favorable dans le DLBCL. Toutefois, de nombreuses études ont montré le caractère ambivalent des TAM sur le plan pronostique dans cette pathologie, avec des résultats discordants en fonction des marqueurs utilisés et des traitements dont bénéficient les patients. Le rôle pronostique des TAM dans le DLBCL est détaillé plus loin. Les TAM seraient les principales cellules exprimant PDL1 au sein du TME de DLBCL, loin devant les lymphocytes B tumoraux : 85 à 95% des patients présenteraient des TAM exprimant PDL1, tandis que seulement 10% d'entre eux auraient des B tumoraux PDL1^{pos} ⁴⁸³. Contrairement à ce qui est habituellement décrit dans les tumeurs solides, ces TAM PDL1^{pos} ne seraient pas associés à un pronostic péjoratif chez les patients traités par immunochimiothérapie ⁴⁸³, un traitement qui pourrait influencer le pronostic. En effet, les TAM sont impliqués dans la phagocytose des lymphocytes B tumoraux reconnus par le rituximab. La fonction de phagocytose des TAM est par ailleurs inhibée dans le DLBCL, où les lymphocytes B tumoraux surexpriment le ligand CD47, à l'origine de l'inhibition des TAM qui expriment son récepteur SIRPα ⁴⁸⁴. Une autre propriété pro-tumorale des TAM a été évoquée dans un modèle murin de xénogreffe de DLBCL, où des TAM de type M2 producteurs de légumine présentent des propriétés pro-angiogéniques et de remodelage matriciel ⁴⁸⁵. En outre, dans le modèle murin de lymphome B agressif A20, les MDSC peuvent présenter les Ag tumoraux et induire des lymphocytes Treg, via la production d'arginase ⁴⁸⁶. Ces potentiels mécanismes pro-tumoraux des TAM et MDSC dans le DLBCL restent toutefois à confirmer chez l'humain.

Les neutrophiles associés aux tumeurs (TAN – *tumor associated neutrophils*) ont très peu été étudiés dans le DLBCL. Il semble toutefois que les lymphocytes B tumoraux, en produisant de l'IL-8, favorisent le recrutement de TAN qui soutiendront la croissance tumorale en sécrétant le facteur APRIL ^{487,488}.

Si le rôle des cellules stromales est essentiel à la maturation B au sein du GC, et que les fibroblastes associés au cancer (CAF) font l'objet d'un intérêt croissant dans les cancers solides, ce compartiment est méconnu dans le DLBCL. Quelques données existent toutefois chez la souris. Ainsi, dans un modèle de tumeur A20 des glandes lacrymales, où les cellules tumorales dépendent du TME pour leur survie, la co-injection de cellules stromales mésenchymateuses (MSC) avec les cellules tumorales induit le recrutement de diverses cellules immunes, dont des lymphocytes Treg et des MDSC, suggérant un rôle immunosuppresseur indirect des cellules stromales⁴⁸⁹. Dans un autre modèle de lymphome agressif, le modèle Eμ-Myc, une expansion des FRC est observée au niveau de la zone T, créant une niche pro-tumorale soutenant la migration et la survie des B tumoraux notamment via une signalisation hedgehog⁴⁹⁰⁻⁴⁹³. Cette expansion du réseau de FRC est retrouvée sur des biopsies de patients atteints de DLBCL⁴⁹⁴. Ces FRC de DLBCL présentent un phénotype de type CAF, avec une surexpression de FAP (*fibroblast activation protein*), αSMA (*alpha smooth muscle actine*), mais aussi PDL1, responsable d'une inhibition des lymphocytes T cytotoxiques⁴⁹⁴. Les cellules stromales joueraient donc un rôle essentiel dans le soutien aux B tumoraux et l'immunosuppression, mais les aspects mécanistiques de ce rôle restent à déchiffrer.

La signature stromal-1 est enrichie en gènes de fibroblastes, mais aussi associés à des composants de la matrice extra-cellulaire, comme des collagènes, des protéines matricellulaires, et des métalloprotéinases matricielles (MMP)²⁶³. La composition de la MEC est modifiée par les interactions entre ses composants et différentes enzymes produites par les cellules du TME, et est impliquée dans la progression de nombreuses tumeurs solides. SPARC, aussi appelée ostéonectine, est une glycoprotéine matricellulaire exprimée par certains macrophages et présentant un rôle ambigu dans le cancer, où elle peut soit inhiber soit promouvoir la progression tumorale en fonction du tissu et du type de tumeur⁴⁹⁵. SPARC serait impliquée dans la lymphomagenèse B, mais les mécanismes en cause ne sont pas élucidés⁴⁹⁶. Dans le DLBCL, une positivité SPARC est de bon pronostic²⁶³. Une autre protéine matricellulaire, l'ostéopontine, est notamment impliquée dans l'invasion tumorale et les métastases via sa fonction régulatrice de MMP2 et MMP9⁴⁹⁷. Cette fonction régulatrice pourrait favoriser la dissémination et la progression des lymphomes B, où son expression est corrélée à l'agressivité de la maladie et à un pronostic péjoratif^{498,499}. Les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMP – *tissue inhibitor of metalloproteinases*), produits par les cellules tumorales, les cellules endothéliales et les cellules stromales, régulent la MEC par leur activité inhibitrice des MMP et peuvent jouer un rôle dans la progression tumorale. TIMP1 est aussi un inhibiteur de l'apoptose des lymphocytes B du GC et promeut la survie des lymphocytes B tumoraux dans le DLBCL, où il constitue un facteur de mauvais pronostic^{500,501}. En outre, l'héparanase, une enzyme capable de dégrader la MEC et de favoriser la progression tumorale et les métastases, ainsi que d'augmenter la biodisponibilité de

cytokines et facteurs de croissance, est enrichie dans le TME d'au moins une partie des DLBCL, mais aussi des FL ⁵⁰².

La signature stromal-2, qui inclue des gènes liés à l'angiogenèse comme *CD31* ou *VEGF*, est associée à un mauvais pronostic dans le DLBCL ²⁶³. De fait, une augmentation de la densité et une désorganisation du réseau vasculaire sont observées dans le DLBCL en comparaison de lymphomes moins agressifs ^{503,504}. Dans le modèle murin Eμ-Myc, il a été montré un remodelage vasculaire incluant la dédifférenciation et la régression des veinules à endothélium épais (HEV – *high endothelial veinules*), et perturbant le trafic cellulaire au sein du ganglion ^{505,506}. La néoangiogenèse pourrait être directement liée au VEGF, dont l'expression est corrélée à celle d'HIF1α, marqueur d'hypoxie, et à un pronostic péjoratif dans le DLBCL ^{507,508}. Le VEGF est au moins partiellement sécrété par les cellules tumorales de DLBCL, notamment en cas de dérégulation de MYC ⁵⁰⁹. En outre, les cellules endothéliales pourraient contribuer au TME immunosuppresseur à travers l'expression d'IC ; une expression de TIM3 par les cellules endothéliales de DLBCL a d'ailleurs été rapportée, et ces cellules endothéliales TIM3^{pos} sont corrélées à un pronostic péjoratif et inhibent les T CD4 de type Th1 *in vitro* et *in vivo* ⁵¹⁰.

Bien que le rôle de la niche tumorale de DLBCL soit évident tant au niveau pathogénique et pronostique que de la réponse aux traitements, elle reste relativement peu connue. Les études mécanistiques manquent pour mieux élucider les multiples mécanismes de soutien à la tumeur existants dans cette pathologie. De plus, l'hétérogénéité intra-tumorale de cette tumeur classiquement considérée comme homogène est possiblement sous-estimée ⁵¹¹. La grande diversité des différents types de DLBCL complexifie l'étude de son TME, et rend probablement impossible une vision intégrée unique de ses fonctions pro-tumorales. Ces mécanismes constituent pourtant autant de potentiels biomarqueurs et cibles thérapeutiques, dont les patients pourraient bénéficier dans le cadre d'une prise en charge personnalisée. L'exploration du TME de DLBCL devrait probablement être bouleversée dans les années à venir par les technologies haute résolution récentes comme le CyTOF, l'IMC ou le scRNASeq.

2.2.4 Microenvironnement tumoral du FL

Comme pour le DLBCL, la composition du microenvironnement du FL en conditionne le pronostic ⁴⁴⁴. La présence d'une réponse anti-tumorale, illustrée par une infiltration de lymphocytes T CD8, est corrélée à une évolution plus favorable du FL ⁵¹². Mais ces lymphocytes T CD8 sont maintenus en périphérie du foyer tumoral ⁵¹³, et le FL est un lymphome peu infiltré, ce qui expliquerait au moins partiellement les résultats décevants des thérapies ICB dans cette pathologie ⁴⁶³.

La niche du FL est constituée principalement de cellules stromales, de lymphocytes Tfh et de macrophages, reflétant plus ou moins la composition et l'architecture d'un GC réactionnel, que les

cellules lymphomateuses auront modifié à leur avantage en recrutant des cellules et/ou en les modifiant *in situ*. Le FL présente ainsi un TME dit rééducatif ²⁵⁴, rappelant la niche physiologique du lymphocyte B dont la cellule tumorale est issue, nécessaire à sa survie et à sa progression ^{440,443,514,515}. La dépendance du FL à sa niche tumorale est soulignée par l'impossibilité de cultiver isolément les lymphocytes tumoraux de FL ⁴⁴³. De plus, si les cellules tumorales de FL colonisent principalement les ganglions lymphatiques, une infiltration de la moelle osseuse (MO) est fréquemment retrouvée. Or, ces infiltrats paratrabéculaires se développent au sein d'une niche rappelant la niche ganglionnaire : on y retrouve des cellules stromales lymphoïdes comme des FRC et des FDC, normalement absentes de la MO et dérivant probablement de précurseurs mésenchymateux locaux ⁵¹⁶⁻⁵¹⁹. Dans le ganglion, la niche tumorale du FL conserve une architecture folliculaire, dont le lymphome folliculaire tire son nom. Les follicules envahis de cellules tumorales contiennent des lymphocytes Tfh et des FDC, tandis qu'un réseau de FRC et de lymphocytes T CD8 est retrouvé en périphérie. Il semble finalement que les lymphocytes B de FL conservent la dépendance aux interactions avec les cellules T et stromales ganglionnaires, ainsi qu'à l'expression et l'activation du BCR, caractéristiques des lymphocytes B normaux du GC. Les cellules immunitaires et stromales associées au FL présentent toutefois des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles spécifiques, à l'origine d'interactions bidirectionnelles avec les B tumoraux mais aussi entre elles, constituant un réseau dynamique impliqué dans la lymphomagenèse, la progression, et la résistance aux traitements ^{440,514,515}.

Les CAF de FL soutiennent directement les cellules B tumorales par des mécanismes parfois similaires aux propriétés fonctionnelles de leur contrepartie normale, à savoir les cellules stromales lymphoïdes physiologiques, mais aussi indirectement en favorisant le recrutement d'autres cellules pro-tumorales de la niche. Les CAF de FL promeuvent le recrutement et l'activation des lymphocytes B tumoraux, qui présentent un phénotype CXCR4^{pos}CXCR5^{pos}CCR7^{hi}, via une production augmentée de la chimiokine CXCL12 induite par l'IL4 produite par les lymphocytes Tfh de la niche ⁵¹⁷, et de CXCL13 ⁵²⁰. La chimiokine CCL21, surexprimée par les CAF de FL, participerait également à la migration des B tumoraux ⁵²¹. Les CAF pourraient également faciliter l'infiltration des cellules lymphomateuses en exprimant CD70, ligand de CD27 exprimé par les lymphocytes B tumoraux ⁵²⁰. Par l'intermédiaire de différents mécanismes imparfaitement élucidés, comme la production de ligands hedgehog, de BAFF, ou encore de TGFβ, les CAF pourraient aussi inhiber l'apoptose des cellules tumorales de FL ^{491,520,522-524}. En exprimant les molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM1, qui se lient à leur ligand MDR1 (*multidrug resistance protein 1*, qui joue un rôle dans l'élimination intracellulaire des molécules thérapeutiques) sur les cellules tumorales, les CAF favorisent également la résistance aux traitements ⁵²⁵. VCAM1, en tant que ligand de l'intégrine VLA4, serait également impliquée dans la croissance des B tumoraux et

la résistance au rituximab ⁵²³. Outre ces fonctions de soutien direct aux cellules malignes, les cellules stromales participent à l'organisation de la niche tumorale de FL. Ainsi, l'expression de CCL2 par les CAF de FL entraîne le recrutement de monocytes ultérieurement polarisés en TAM présentant un profil de type M2 et pro-angiogénique ⁵¹⁶. Des neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) sont recrutés et voient leur survie favorisée par l'IL-8 sécrétée par les CAF ⁴⁸⁷. Via la production d'IL-6, les CAF de FL soutiennent la survie des lymphocytes Tfh et Treg, aux propriétés pro-tumorales⁵²⁶. A contrario, via la sécrétion d'IDO, induite par l'IFN γ dont la niche de FL est riche, ils inhibent l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs ^{527,528}. Les CAF de FL produisent aussi la prostaglandine immunosuppressive PGE2 ⁵²⁹.

La polarisation des cellules stromales de la niche en véritables CAF de FL est influencée par les lymphocytes B tumoraux, mais aussi par les autres acteurs du TME. Une synergie des signalisations TNF/lymphotoxine (LT) et TGF β , induite par les lymphocytes B tumoraux, serait à l'origine de l'émergence des CAF de FL producteurs de CCL21 à partir de précurseurs stromaux locaux ^{521,530-532}. La production d'IL-8 et de CCL2 par les CAF est TNF dépendante ^{487,516,533}. Par ailleurs, une fois recrutés, les TAN contribueraient à la polarisation des CAF via l'activation de la voie NF- κ B ⁴⁸⁷. Les Tfh sont également d'importants producteurs de TNF et de LT, qui, conjointement avec l'IL-4, induisent un phénotype CXCL12^{pos} des CAF ^{517,530}. Un intéressant mécanisme de polarisation du stroma à distance de la tumeur serait par ailleurs en jeu dans la dissémination du FL à la MO : la niche stromale médullaire serait induite par le biais de vésicules extracellulaires produites par les lymphocytes B tumoraux ⁵³⁴. Au cours de l'évolution du FL, le réseau de FDC tend à disparaître, notamment sous l'effet de la diminution de la production de LT par les cellules tumorales, ce qui serait associé à une croissance diffuse de la tumeur ^{517,535,536}.

In fine, les CAF de FL ne constituent pas un compartiment monolithique et figé, mais pourraient plutôt présenter différents états de polarisation et d'activation au sein de la niche, co-évoluant avec la tumeur. L'hétérogénéité des CAF avait déjà été soulignée par des études scRNASeq dans les cancers solides ⁵³⁷, et a tout récemment été décrite dans le FL ⁵²⁰. L'étude des cellules stromales de FL à l'échelle de la cellule unique a ainsi pu montrer que certaines sous-populations de CAF exprimaient les gènes codant pour la périostine, EGFL6 (*EGF Like Domain Multiple 6*), ou encore FAP, ce qui pourrait mettre en évidence diverses propriétés pro-tumorales de ces populations, liées à la promotion de la progression tumorale, des cellules souches cancéreuses, de l'angiogenèse, et de l'immunosuppression.

Différentes populations de lymphocytes T vont jouer un rôle essentiel dans les propriétés immuno-régulatrices de la niche du FL. Les TIL CD4 et CD8 présenteraient une motilité et une capacité à former la synapse immunologique altérées, compromettant la réponse immune anti-tumorale ^{538,539}. Comme dans le DLBCL, on observe dans le FL une infiltration de lymphocytes T

PD1^{pos} avec un phénotype épuisé, illustré par l'expression de LAG3 et/ou TIM3 et/ou TIGIT ^{480,540-544}. Ces lymphocytes T épuisés, le plus souvent CD8, seraient corrélés à un pronostic péjoratif ^{542,543}. Les autres cellules cytotoxiques, les lymphocytes NK, pourraient être inhibées par la liaison de LLT1 (*lectin-like transcript 1*), exprimé par les cellules lymphomateuses, à leur récepteur CD161 ⁵⁴⁵.

Une population de lymphocytes T CD4 exprimant les molécules l'IC PD1 est observée au sein de la niche du FL ⁵⁴⁶, et pourrait correspondre aux lymphocytes Tfh impliqués dans la différenciation B physiologique ⁵⁴⁷. Ces Tfh de FL soutiendraient la tumeur par des interactions similaires aux synapses immunologiques avec les cellules tumorales ; la perturbation de ces interactions par l'idelalisib bloque la croissance tumorale ^{548,549}. De plus, l'expression de CD40L à la surface des Tfh induit via la liaison à CD40 l'expression des protéines anti-apoptotiques c-FLIP (*FLICE like inhibitory protein*) et BCL-XL par les cellules tumorales, les protégeant ainsi de l'apoptose ⁵²⁹. Comme dans le DLBCL, la perte de l'interaction HVEM-BTLA est impliquée dans la lymphomagenèse du FL. Les mutations d'HVEM dans la cellule tumorale et la sous-expression de BTLA par les Tfh sont d'ailleurs des altérations mutuellement exclusives dans le FL, ce qui suggère un rôle majeur de la perte de cette interaction inhibitrice dans cette pathologie ³⁴⁵. En comparaison aux lymphocytes Tfh physiologiques, ces Tfh de FL surexpriment IL-4, IL-2, IFN γ , et TNF α ⁵³³. Ces différentes cytokines vont stimuler les lymphocytes B tumoraux ; l'IL4 en particulier participera à leur activation via la voie de signalisation STAT6 ^{550,551}. Les lymphocytes Tfh participent également à la polarisation des CAF de FL, via leur production de TNF et LT, et la surexpression d'IL-4. Cette expression d'IL-4, dépendante de la voie NOTCH et d'ICAM1, serait elle-même induite par les CAF, dans un dialogue bidirectionnel Tfh-CAF favorisant la niche de soutien riche en IL-4 du FL ^{517,530,552}. La production d'IFN γ par les lymphocytes Tfh induira également l'expression d'IDO par les CAF et les cellules endothéliales lymphoïdes (LEC – *lymphoid endothelial cells*) de FL ^{527,528}. Via la production d'IL-4, les Tfh auraient aussi un effet sur la polarisation des TAM de FL, notamment en induisant l'expression de DC-SIGN qui interviendra dans l'activation chronique du BCR ⁴³⁴.

En produisant du CCL22, et en exprimant ICOSL et CD70, les lymphocytes B tumoraux vont recruter et activer des lymphocytes Treg exprimant les IC PD1, TIM3, ICOS, ou encore TIGIT ^{544,553-555}. Les Treg de localisation folliculaire sont volontiers nommés Tfr, ou lymphocytes T régulateurs folliculaires ; de phénotype CD25^{pos}CXCR5^{pos}PD1^{pos}, ils partagent des marqueurs de Treg et de Tfh ⁵³³. Les lymphocytes Tfr sont impliqués en conditions physiologiques dans le contrôle des Tfh et de la sélection des lymphocytes B du GC ^{556,557}. Dans le FL, le rôle pro- ou anti-tumoral des Treg et Tfr est ambigu, comme cela est souligné par l'absence de consensus sur leur valeur pronostique, ce qui pourrait aussi être lié aux descriptions phénotypiques inconstantes ^{447,526,558-560}. Ils pourraient compromettre la réponse anti-tumorale en inhibant les

lymphocytes T effecteurs ^{553,561}, mais aussi limiter la croissance tumorale en inhibant les Tfh et les cellules B tumorales ^{533,553}.

Comme dans le DLBCL, le rôle pronostique des TAM dans le FL est discuté et pourrait dépendre des marqueurs utilisés et des traitements mis en œuvre. Il a toutefois été démontré que les TAM de FL soutiennent les cellules tumorales par différents mécanismes. Les monocytes sont recrutés au TME du FL via CCL2 produit par les CAF, puis se différencient en macrophages ⁵¹⁶. Différentes cytokines du TME de FL vont influencer la polarisation des TAM. L'IFN γ et CD40L, exprimés par les Tfh, vont notamment induire l'expression d'IL15 par les TAM, et sa transprésentation aux B de FL, favorisant la croissance tumorale ⁵⁶². L'IL-4, dont le TME de FL est riche ⁵⁵⁰, va induire l'expression de DC-SIGN à la surface des macrophages ⁵⁶³. Cette lectine, en se liant au BCR N-glycosylé des lymphocytes B tumoraux, entraînera son activation chronique et favorisera la survie des cellules tumorales ^{434,435}. Enfin, le signal *don't eat me* CD47 est surexprimé par les lymphocytes B de FL ; sa liaison avec le SIRP α porté par les TAM inhibera la phagocytose des cellules tumorales ⁴⁸⁴.

Des TAN sont recrutés à la tumeur via l'IL-8 sécrétée par les CAF de FL ⁴⁸⁷. Dans un dialogue bidirectionnel, les TAN vont activer et favoriser le phénotype stromal lymphoïde inflammatoire des CAF via la voie NF- κ B, et leur survie sera favorisée par la production d'IL-8 par les CAF ⁴⁸⁷. Au-delà de cet effet pro-tumoral indirect, les TAN soutiennent directement les lymphocytes B de FL via une signalisation BAFF/APRIL ⁴⁸⁷. En outre, les TAN de FL pourraient protéger les cellules tumorales des thérapies anti-cancéreuses via des interactions cellules-cellules médiées par CD11b et ICAM1, exprimés respectivement par les TAN et les B tumoraux ⁵⁶⁴.

Le compartiment vasculaire présente quelques altérations dans le FL. Si la densité des microvaisseaux semble similaire dans un ganglion réactionnel et un ganglion de FL, les follicules néoplasiques montrent un enrichissement en cellules endothéliales positives pour l'intégrine α v β 3, ce qui pourrait suggérer l'activation de voies de signalisation angiogéniques spécifiques ⁵⁰³. La densité des vaisseaux lymphatiques serait elle diminuée ⁵²⁰. L'exploration du compartiment non hématopoïétique par scRNASeq montre une proportion augmentée de cellules endothéliales sanguines (BEC – *blood endothelial cells*) associée à une plus grande diversité de sous-populations artérielles, et une proportion diminuée de LEC ⁵²⁰. Différents gènes impliqués dans l'adhésion et la migration cellulaire, ainsi que dans la néoangiogenèse, sont surexprimés par différentes sous-populations artérielles dans le FL, ce qui pourrait suggérer un processus actif de néoangiogenèse et l'implication des cellules endothéliales dans le recrutement de cellules immunitaires du TME ⁵²⁰.

Les cellules malignes de FL dépendent d'une niche tumorale de soutien leur fournissant les signaux et facteurs de croissance nécessaires à leur survie et leur prolifération. De nombreuses

populations cellulaires, immunitaires ou stromales, médiant de multiples mécanismes pro-tumoraux et/ou d'échappement à la réponse immune anti-tumorale, ont pu être mises en évidence dans cette pathologie (Figure 16).

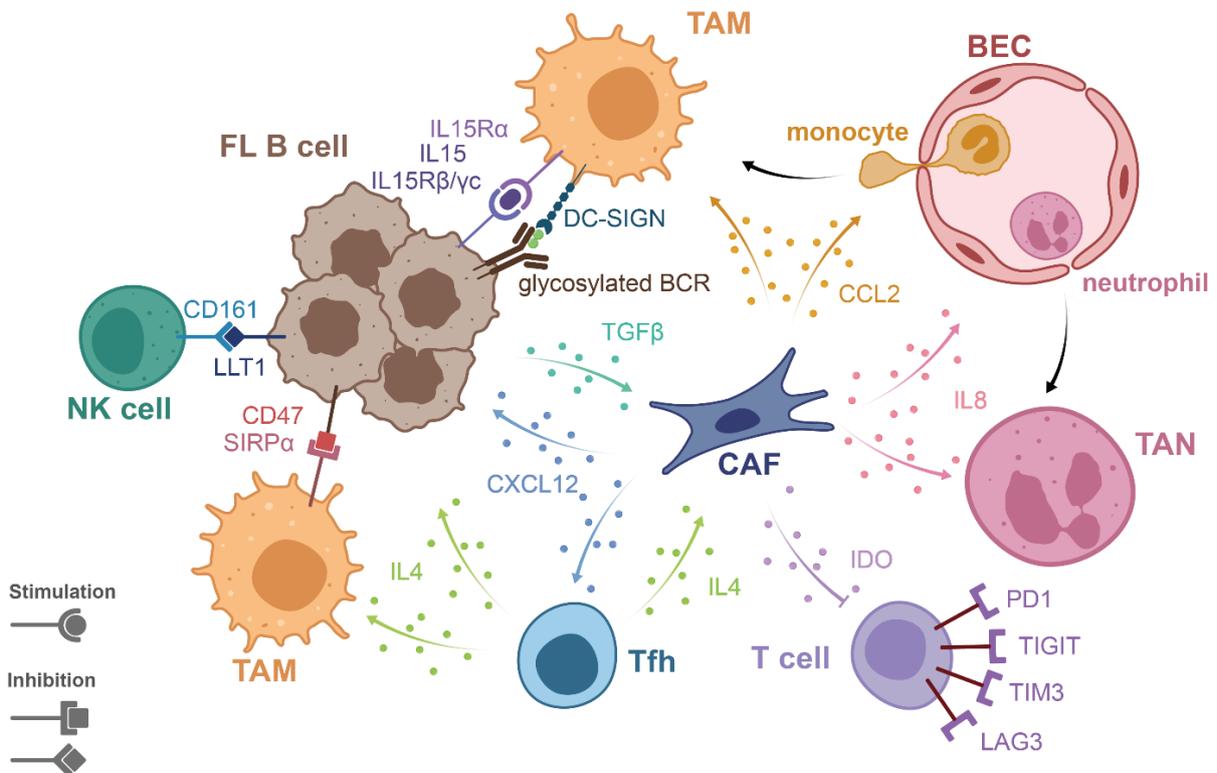


Figure 16 | **Niche tumorale du lymphome folliculaire**

Les différents acteurs de la niche tumorale du FL soutiennent la tumeur par de multiples mécanismes pro-tumoraux directs ou indirects. Le dialogue bidirectionnel entre les lymphocytes B tumoraux de FL et les cellules immunitaires ou stromales favorisent le recrutement et la polarisation des cellules de soutien pro-tumorales. Ces cellules de soutien interagissent également entre elles pour contribuer à la formation de la niche du FL.

La niche tumorale joue un rôle majeur dans la physiopathologie et le pronostic du FL et du DLBCL, mais sa description reste parcellaire. En particulier, les rôles et l'hétérogénéité des TAM de lymphomes B au sein de la niche tumorale sont méconnus, alors même qu'ils occupent une place essentielle dans la réponse aux thérapeutiques actuelles, et qu'ils sont des pivots des niches tumorales dans les cancers solides. Les approches de type scRNASeq ont commencé à dévoiler toute la complexité des niches de FL et de DLBCL, mais elles se limitent à ce jour à la description des compartiments lymphocytaires T et B, stromal et endothélial ^{520,565-567}.

3 Les macrophages dans les ganglions sains et de lymphome B

Si les TAM constituent la population cellulaire la plus abondante du TME dans la plupart des cancers solides, ce qui explique qu'ils soient intensivement étudiés, ils présentent également un intérêt certain dans les lymphomes B. Le rôle pronostique des TAM de DLBCL et de FL est connu depuis de nombreuses années ^{263,444}, mais les études sont parfois contradictoires en fonction de la définition phénotypique et des traitements utilisés, ce qui souligne la nécessité de mieux définir et déchiffrer cette population. De plus, les macrophages ganglionnaires, leur contrepartie physiologique, ainsi que leur niche, restent mal connus chez l'humain.

3.1 Hétérogénéité et niche des macrophages ganglionnaires

3.1.1 Architecture et organisation générale du ganglion

Les organes lymphoïdes secondaires (OLS) regroupent les ganglions lymphatiques (LN – *lymph node*), la rate, et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT– *mucosa associated lymphoid tissue*), dont les amygdales et les plaques de Peyer. Ce sont des points de contrôle immunitaire de l'organisme, ils sont essentiels à une réponse immune efficace au plus près de la menace immunogène (organisme étranger ou auto-antigènes anormaux dans le cancer). Environ 450 ganglions lymphatiques sont dispersés dans l'organisme humain et sont le théâtre d'un intense trafic cellulaire jouant un rôle crucial dans la réponse immune adaptative : ce sont les lieux de rencontre des rares lymphocytes naïfs spécifiques de l'antigène avec les cellules dendritiques (DC) ⁵⁶⁸. En plus de leur rôle de carrefour de l'immunité, lieu d'interaction des lymphocytes T et B circulants arrivant par voie sanguine et des antigènes amenés par la lymphe et présentés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), les LN ont aussi un rôle de filtration des particules, micro-organismes, antigènes solubles et débris apportés par la lymphe, assuré par les macrophages des sinus ⁵⁶⁹.

Les ganglions lymphatiques sont répartis dans l'ensemble de l'organisme, disposés en amas ou en chaînes sur la circulation lymphatique. S'ils peuvent présenter quelques variations anatomiques et fonctionnelles en fonction de leur localisation et de la région drainée ⁵⁷⁰, ils partagent une même architecture et organisation générale (Figure 17). Les LN sont des organes réniformes dont la taille peut varier physiologiquement de 5 à 20mm de diamètre environ, suivant l'existence d'une réponse immune et son degré d'activation. Ils sont composés de 95% de leucocytes et de 5% de cellules stromales ⁵⁷¹. Bien que minoritaires, ces cellules stromales lymphoïdes jouent un rôle essentiel à la fois dans l'organogenèse – via la production d'une matrice extracellulaire spécifique et le recrutement des différentes cellules de l'immunité – et dans le maintien de l'architecture du LN ainsi que dans la plasticité nécessaire à la réponse immune.

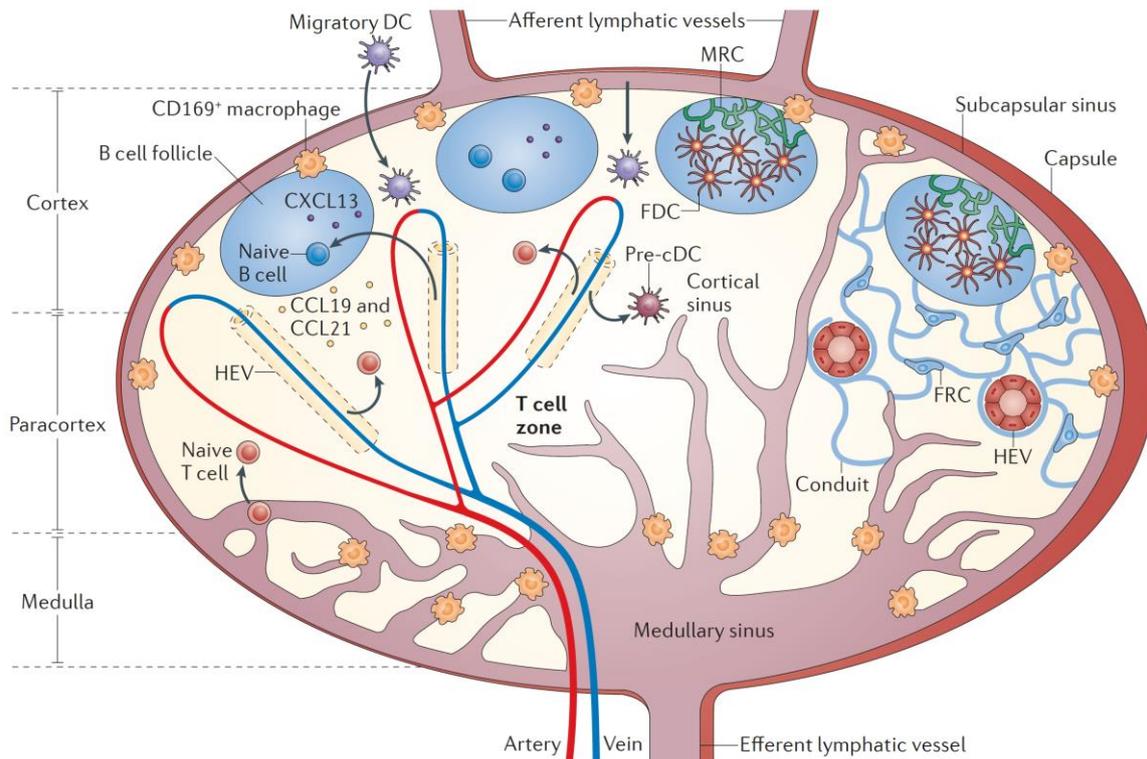


Figure 17 | **Organisation générale et trafic cellulaire dans le ganglion lymphatique**

Les ganglions lymphatiques sont des structures encapsulées réniformes divisées en trois régions : le cortex, le paracortex, et la médulla. Les lymphocytes naïfs pénètrent dans le ganglion via les veinules à endothélium épais (HEV - *high endothelial veinules*) ou les vaisseaux lymphatiques afférents, et le quittent via les sinus corticaux, les sinus médullaires puis le vaisseau lymphatique efférent au niveau de la médulla. Les cellules dendritiques (DC) entrent dans le ganglion via les vaisseaux lymphatiques afférents et le sinus sous-capsulaire (DC migratoires provenant des tissus périphériques) ou via les HEV (DC inflammatoires, dérivées de monocytes). Elles peuvent aussi résider dans le ganglion à l'état immature et capter *in situ* les antigènes apportés par la lymphe. Le cortex contient une forte densité de lymphocytes B organisés en follicules, où ils sont notamment associés à des cellules folliculaires dendritiques (FDC). Le paracortex est riche en lymphocytes T réunis dans les zones T, où ils sont notamment associés aux cellules fibroblastiques réticulaires (FRC) qui forment un réseau de fibres permettant la migration des lymphocytes et des DC. D'après Girard et al., 2012⁵⁶⁸.

Le LN est structuré par une trame conjonctive produite par les cellules fibroblastiques réticulaires (FRC) servant de support aux nombreuses cellules immunitaires en transit. Une capsule fibreuse entoure le ganglion, interrompue par les vaisseaux lymphatiques afférents, dont les valvules orientent le flux lymphatique vers le sinus sous-capsulaire. Des sinus transverses (ou trabéculaires), décrits chez l'humain mais pas chez la souris, partent du sinus sous-cortical pour rejoindre les sinus médullaires, qui forment un réseau de larges canaux lymphatiques interconnectés convergeant en un vaisseau efférent au niveau du hile ganglionnaire. Les sinus corticaux (ou para-corticaux) sont borgnes, naissent dans le para-cortex et rejoignent également les sinus médullaires⁵⁷². Les sinus lymphatiques sont tapissés de cellules endothéliales spécialisées, les cellules endothéliales lymphoïdes (LEC), y compris au niveau des piliers de

réticuline qui les traversent⁵⁷². Cette trame réticulinique fournit un support aux macrophages des sinus ganglionnaires, situés au niveau des sinus sous-capsulaire et médullaires, qui assurent la filtration de la lymphe afférente et y captent antigènes et complexes immuns pour les présenter aux lymphocytes B⁵⁷³⁻⁵⁷⁷. Des DC sont également positionnées le long des sinus lymphatiques, et pourraient initier des réponses cellulaires T rapides en présentant des antigènes aux lymphocytes T naïfs⁵⁷⁸. Les sinus lymphatiques cheminent au sein de cloisons conjonctives incomplètes partant de la capsule et délimitant des lobules. Cette charpente conjonctive se prolonge d'un fin réseau de fibres de réticuline structurant l'ensemble du ganglion, particulièrement dense dans le cortex à l'exception des follicules, et fournissant un support pour le déplacement des lymphocytes. La vascularisation est assurée par une ou plusieurs artères pénétrant le hile ganglionnaire et se divisant au niveau de la médulla pour donner naissance à un riche réseau capillaire irrigant l'ensemble du LN. Le système artériel est le principal point d'entrée des lymphocytes, qui rejoignent le parenchyme ganglionnaire en traversant les parois de vaisseaux spécialisés, les veinules à endothélium épais (HEV). Ces HEV se draineront dans des veines qui convergeront et quitteront le LN au niveau du hile.

Le parenchyme ganglionnaire est constitué de trois régions histologiques depuis le sinus sous-capsulaire jusqu'au hile : le cortex ou zone corticale externe, le para-cortex ou zone para-corticale – ou plus simplement zone T, et la médulla ou zone médullaire.

La zone corticale externe est occupée par les follicules lymphoïdes, lieu de prolifération et de différenciation des lymphocytes B, séparés par des zones T inter-folliculaires. On distingue les follicules primaires, petits amas cellulaires ne comportant pas de centre germinatif et principalement composés de lymphocytes T, cellules stromales et macrophages, et les follicules secondaires, apparaissant au cours de la réponse immune et comportant un GC. En périphérie du GC se trouve la zone du manteau, occupée par les lymphocytes B n'ayant pas rencontré leur antigène spécifique, cellules présentes dès le stade du follicule primaire. Au sein du GC on distingue la zone sombre riche en centroblastes subissant une prolifération intense et l'hypermutation somatique, et la zone claire regroupant les centrocytes subissant une sélection d'affinité orchestrée par les FDC et les Tfh. Les lymphocytes B sélectionnés se différencieront en plasmocytes et en lymphocytes B mémoire et quitteront le ganglion principalement par les sinus corticaux^{572,574,579}. Les zones inter-folliculaires sont très hétérogènes sur le plan cellulaire ; elles contiennent nombre de lymphocytes B et T, des DC, et des macrophages. Elles sont un lieu privilégié pour l'influx de DC vers le ganglion depuis la lymphe afférente⁵⁸⁰.

La zone para-corticale est constituée d'un tissu lymphoïde relativement diffus structuré par les FRC et composé principalement de lymphocytes T et de DC. C'est le principal point d'entrée

des lymphocytes circulants dans le ganglion, via les HEV. C'est aussi le site d'interaction et d'activation des lymphocytes T par les DC matures, et d'interaction entre les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes B via les synapses immunologiques. Lors d'une réponse immune, la zone T peut s'étendre dans la médulla. La zone T n'est pas homogène : les lymphocytes T CD8 seraient plus nombreux au centre du paracortex, associés aux DC de type 1 (cDC1) spécialisées dans la présentation croisée des antigènes via le CMH I ; alors que les lymphocytes T CD4 seraient retrouvés principalement en périphérie, à proximité des DC de type 2 (cDC2) présentant les antigènes via le CMH II ^{581,582}. Les lymphocytes T activés partiront dans la circulation générale principalement via les sinus corticaux, la lymphe efférente puis le canal thoracique, en direction des sites périphériques pour y exercer leurs fonctions effectrices ^{572,574,583,584}.

Au niveau de la zone médullaire, la charpente réticulinique est plutôt lâche et forme des cordons cellulaires composés en majorité de plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines et de macrophages ⁵⁶⁹. Les anticorps sécrétés par les plasmocytes rejoindront la circulation générale via la lymphe efférente, qui est aussi une voie de sortie des cellules immunitaires ⁵⁸⁵. Les trois fonctions les mieux définies de la médulla sont : i) la phagocytose et l'élimination des pathogènes et particules antigéniques apportés par la lymphe, assurées par les macrophages du sinus médullaire ; ii) le support trophique aux plasmocytes à courte durée de vie, assuré par les macrophages des cordons médullaires ; iii) la fourniture d'une voie de sortie vers la lymphe efférente pour les cellules immunitaires et les anticorps. La médulla contient aussi des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) productrices d'IFN α aux fonctions anti-virales ⁵⁸⁶.

À la recherche de leur antigène, les lymphocytes T et B naïfs atteignent le ganglion principalement par les HEV. L'induction de la réponse humorale nécessite une coopération entre les lymphocytes T et B ayant rencontré leur antigène spécifique. À la frontière T-B, au niveau de la zone inter-folliculaire, les lymphocytes B vont interagir avec des lymphocytes T CD4 – qui auront été activés par des cDC2 – en leur présentant l'antigène via le CMH II. Cette interaction va initier le développement du centre germinatif et des lymphocytes Tfh, en induisant l'expression des marqueurs de Tfh PD1 et CXCR5 par les lymphocytes T CD4. Ces cellules pré-Tfh vont alors migrer dans le follicule où elles termineront leur différenciation en lymphocytes Tfh matures ^{587,588}. La réaction du GC, décrite plus haut, peut alors commencer et aboutira à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et en lymphocytes B mémoire. Des lymphocytes Treg sont également situées à la frontière T-B, où ils inhiberont les lymphocytes T effecteurs autoréactifs ⁵⁸⁹. Les lymphocytes qui n'ont pas rencontré leur antigène quitteront le ganglion en quelques heures via les sinus corticaux et rejoindront la circulation lymphatique puis la circulation sanguine. La sortie des lymphocytes du ganglion est régulée par l'expression de récepteurs à la sphingosine-1-phosphate (S1P, dont la concentration est plus faible dans les OLS

que dans le sang et la lymphe), qui est diminuée lorsqu'ils sont activés, entraînant leur rétention dans les OLS ^{590,591}.

3.1.2 Les populations de macrophages résidents du ganglion

À l'instar des différents macrophages résidents des tissus (TRM), les macrophages ganglionnaires assurent différentes fonctions spécialisées essentielles à l'homéostasie du ganglion et interviennent également dans la réponse immune (Figure 18).

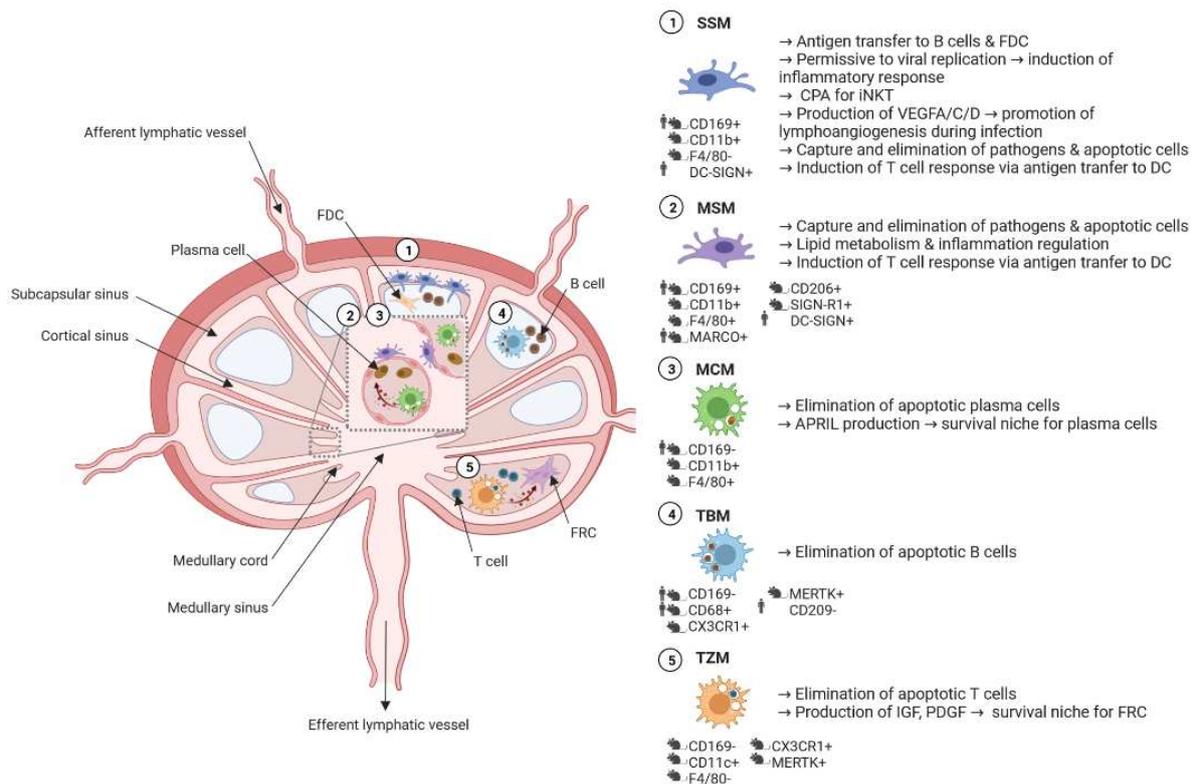


Figure 18 | **Macrophages résidents du ganglion lymphatique**

Différentes populations de macrophages aux fonctions spécialisées, en lien avec leur localisation, sont retrouvées dans le ganglion. Les macrophages du sinus sous-capsulaire (SSM) capturent les complexes immuns et pathogènes circulants dans la lymphe et présentent des antigènes aux lymphocytes B situés dans les follicules. Les macrophages du sinus médullaire (MSM) éliminent les pathogènes et débris apportés par la lymphe pour éviter leur dissémination systémique. Les macrophages à corps tingibles (TBM) phagocytent les nombreux lymphocytes B apoptotiques. Les macrophages des cordons médullaires (MCM) élimineraient les plasmocytes dégénérésents et fourniraient des facteurs de croissance aux plasmablastes et plasmocytes des cordons médullaires. Les macrophages de la zone T (TZM) phagocyteraient les lymphocytes T apoptotiques ^{569,592}.

Les macrophages du ganglion humain sain sont principalement décrits comme étant CD68^{pos} en immunohistochimie et HLA-DR^{pos}CD11c^{pos}CD14^{pos} en cytométrie de flux, par opposition aux DC HLA-DR^{pos}CD11c^{pos}CD14^{neg}. Cinq principaux sous-types de TRM du LN sont classiquement décrits en situation physiologique : deux populations de macrophages associés aux sinus lymphatiques que sont les macrophages du sinus sous-capsulaire (SSM – *subscapular sinus macrophages*) et les macrophages du sinus médullaire (MSM – *medullary sinus macrophages*), et trois populations de

macrophages parenchymateux représentés par les macrophages à corps tingibles (TBM – *tingible body macrophages*), les macrophages des cordons médullaires (MCM – *medullary cord macrophages*) et les macrophages de la zone T (TZM – *T zone macrophages*) ; ces deux dernières populations étant décrites chez la souris mais pas formellement chez l'humain ^{569,592}.

3.1.2.1 Macrophages des sinus lymphatiques

Les macrophages ganglionnaires peuvent être séparés en deux catégories présentant des traits fonctionnels communs découlant de leur localisation : au contact direct de la lymphe ou dans le parenchyme. Ainsi, les macrophages des sinus lymphatiques, baignés dans la lymphe et exprimant de multiples récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR – *pattern recognition receptors*), agissent comme du papier tue-mouche (« *flypaper* ») capable de capturer et éliminer les pathogènes afin d'éviter leur dissémination dans l'organisme ^{575,593,594}. Ils partagent également l'expression de la sialoadhésine CD169/SIGLEC-1, qui permet aux macrophages d'interagir avec des ligands riches en acides sialiques présents sur les DC CD8 α ^{pos} et de promouvoir indirectement l'initiation d'une réponse T CD8^{pos} effectrice via un transfert d'antigène à ces DC ^{593,595}. Les macrophages des sinus pourraient donc jouer un rôle majeur dans l'initiation d'une réponse antivirale rapide et efficace via un dialogue avec les DC positionnées à proximité des sinus lymphatiques ⁵⁷⁸. De plus, les macrophages CD169^{pos} ganglionnaires seraient la première ligne de défense anti-tumorale, via leurs capacités de capture des cellules tumorales apoptotiques et débris cellulaires transportés par la lymphe et de présentation croisée aux lymphocytes T CD8. La déplétion des macrophages CD169^{pos} dans un modèle murin compromet la réponse anti-tumorale ⁵⁹⁶. Les macrophages du sinus sous-capsulaire (SSM) et les macrophages du sinus médullaire (MSM) sont stratégiquement positionnés pour assurer ces fonctions, mais au-delà de la nuance topographique et de ce trait phénotypique, ils se distinguent par leur phénotype et leurs capacités de capture et d'élimination des particules transportées par la lymphe. Les sinus corticaux, peuplés de lymphocytes quittant le ganglion, contiennent peu ou pas de macrophages ⁵⁷⁴, mais des macrophages CD68^{pos} ont été décrits dans les sinus trabéculaires du ganglion humain ⁵⁹⁷, et pourraient présenter des propriétés similaires aux SSM et MSM.

Macrophages du sinus sous-capsulaire (SSM)

Les SSM se situent au niveau de la face parenchymateuse du sinus sous-capsulaire, à l'extérieur des follicules B au sein desquels ils peuvent envoyer des prolongements cytoplasmiques. Sur le plan phénotypique, ils sont CD169^{pos}F4/80^{neg}CD11b^{pos}CX3CR1^{pos} chez la souris ⁵⁶⁹. Chez l'humain, une expression de CD169 a été mise en évidence sur des macrophages ganglionnaires situés en sous-capsulaire au niveau périfolliculaire, et qui pourraient correspondre au SSM ⁵⁹⁸. Les SSM exprimeraient chez l'humain, contrairement à la souris,

CD209/DC-SIGN^{597,599}. Les SSM expriment également ICAM1 et VCAM1⁵⁷⁵, qui pourraient être impliqués dans leur interaction avec les lymphocytes B.

Les SSM facilitent l'activation des lymphocytes B en transférant vers le follicule des antigènes sous forme native, des virus, et des complexes immuns à destination des lymphocytes B et des FDC^{573,575-577}. Il a d'ailleurs été montré que des altérations de ce réseau de macrophages obère la réponse B^{575,600}. De plus, les SSM sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) pour des lymphocytes naïfs : ils peuvent activer les lymphocytes NKT de type I ou NKT invariants (iNKT – *invariant natural killer T*), permettant l'induction d'une réponse immune rapide⁶⁰¹. Les SSM peuvent capturer des particules circulants dans la lymphe, mais leurs capacités d'internalisation et de dégradation semblent inférieures à celles des MSM⁵⁶⁹. Cela pourrait être lié à une susceptibilité différente aux infections virales. En effet, les SSM semblent particulièrement permissifs à la réplication virale, ce qui leur permettrait de promouvoir une réponse inflammatoire essentielle au recrutement de cellules effectrices (dont des pDC productrices d'IFN de type I et des lymphocytes T effecteurs) et à la prévention de la dissémination du virus^{575,602,603}.

La caractérisation des SSM reste compliquée, même chez la souris, en raison des difficultés à isoler cette population et de l'absence de marqueurs phénotypiques spécifiques⁵⁶⁹.

Macrophages du sinus médullaire (MSM)

Les MSM baignent dans la lymphe, positionnés au niveau des parois des sinus médullaires ou dans la lumière, accrochés aux piliers de réticuline⁵⁶⁹. Ils sont chez la souris CD169^{pos}F4/80^{pos}CD11b^{pos}CX3CR1^{neg}MARCO^{pos}SIGN-R1^{pos}CD206^{pos}Lyve1^{pos}⁵⁶⁹. Le récepteur éboueur (*scavenger*) MARCO, SIGN-R1/CD209b (orthologue fonctionnel du CD209/DC-SIGN) et le récepteur du mannose CD206/MR sont tous trois des récepteurs de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). Chez l'humain, les différences phénotypiques entre SSM et MSM ne sont pas encore claires. Comme les SSM, les MSM humains exprimeraient CD209/DC-SIGN⁵⁹⁷. DC-SIGN peut, tout comme MARCO et LYVE1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1*), être exprimé à la fois par les macrophages et par l'endothélium pavant les sinus du ganglion humain^{597,604}.

Les MSM sont des phagocytes très actifs qui capturent et détruisent les cellules apoptotiques, diverses particules et les pathogènes drainés des sites d'infection pour éviter leur dissémination systémique. Leur aspect morphologique – ils présentent de nombreuses vacuoles hétérogènes et de larges lysosomes – et leurs capacités d'internalisation d'antigènes marqués en attestent⁵⁶⁹. Dans les heures suivants l'injection d'antigène marqué, le principal site d'accumulation au sein du LN est la médulla. Bien que la distinction entre sinus et cordons médullaires n'ait pas toujours été opérée dans ces études, les principaux acteurs de cette rétention seraient bien les MSM⁵⁶⁹. À l'instar d'autres TRM, les MSM pourraient aussi jouer un rôle dans la régulation du transport et

du métabolisme des lipides. Les ganglions mésentériques, en particulier, sont exposés à de grandes quantités de chylomicrons issus de la digestion des graisses. L'implication de macrophages ganglionnaires mésentériques dans la détection des lipides, leur stockage et la régulation de l'inflammation a été montré chez la souris ⁶⁰⁵. Bien qu'ils soient exposés aux antigènes circulants dans le flux lymphatique, les capacités de CPA des MSM n'ont guère été explorées.

3.1.2.2 Macrophages du parenchyme ganglionnaire

Le parenchyme ganglionnaire contient également différentes populations de macrophages spécialisés, notamment au sein de structures qui émergent ou s'expandent lors d'une réponse immune. Les macrophages des cordons médullaires (MCM) dans la médulla, les macrophages à corps tingibles (TBM) au sein des follicules B dans le cortex, et les macrophages de la zone T (TZM) récemment décrits dans le para-cortex sont associés à différentes populations cellulaires au sein de niche distinctes et présentent des propriétés spécifiques. Contrairement aux macrophages des sinus lymphatiques, les macrophages du parenchyme ganglionnaire n'expriment pas CD169.

Macrophages des cordons médullaires (MCM)

Si les MSM constituent la population macrophagique la plus abondante dans la médulla, une autre population de macrophages peuple le parenchyme médullaire, les MCM. Les cordons médullaires sont des structures occupées par de nombreux plasmocytes et plasmablastes, des macrophages appelés MCM, quelques lymphocytes et DC, et contiennent souvent également un vaisseau sanguin. Si la médulla est assez réduite en l'absence d'immunisation, elle peut s'élargir et les cordons médullaires se développer pour accueillir les nombreux plasmocytes à courte durée de vie qui la coloniseront lors du pic de la réaction plasmocytaire ⁵⁶⁹. Sur le plan phénotypique, les MCM murins sont CD169^{neg}F4/80^{pos}CD11^{pos}CX3CR1^{neg} ⁵⁹². Outre l'expression du CD169, d'autres caractéristiques distinguent les MCM des MSM : leur aspect morphologique, les enzymes qu'ils produisent – bien que leurs fonctions ne soient pas connues – et la nature des cellules apoptotiques qu'ils phagocytent. Ainsi, les MCM contiennent des vacuoles d'aspect homogène et de petits lysosomes, des plasmocytes dégénératifs, et présentent une importante activité estérase non spécifique et une faible activité phosphatase acide. Ces caractéristiques contrastent avec l'aspect morphologique des MSM, qui phagocytent plutôt des cellules apoptotiques de type polynucléaires comme les éosinophiles et présentent une faible activité estérase non spécifique et une forte activité phosphatase acide ⁶⁰⁶.

Au-delà de leur fonction d'élimination des plasmocytes apoptotiques, les MCM formeraient une niche de soutien trophique aux plasmablastes et plasmocytes, en proliférant après une immunisation et en produisant notamment APRIL, un facteur de survie pour les plasmocytes^{569,607}.

Macrophages à corps tingibles (TBM)

L'appellation macrophages à corps tingibles fait écho à leur morphologie caractéristique due aux nombreux lymphocytes B apoptotiques plus ou moins dégradés contenus dans les vacuoles de ces macrophages ⁶⁰⁸. Les TBM se situent dans la zone corticale, au niveau des centres germinatifs des ganglions réactionnels, où ils éliminent les B apoptotiques non sélectionnés par efférocytose. Les TBM sont CD169^{neg}CD68^{pos}CX3CR1^{pos}MERTK^{pos} chez la souris. Leur capacité de phagocytose reposerait en grande partie sur le récepteur MERTK, dont l'ablation provoque une accumulation de B apoptotiques dans le GC et des symptômes d'auto-immunité. Chez l'humain, comme chez la souris, ils n'exprimeraient ni CD169 ni CD209 ⁵⁶⁹.

Macrophages de la zone T (TZM)

Un cinquième sous-type de macrophages ganglionnaires, les TZM, a été décrit récemment chez la souris ⁶⁰⁹. Son existence et sa caractérisation chez l'humain restent à définir. Ces macrophages sont CD169^{neg}F4/80^{neg}CX3CR1^{pos}MERTK^{pos}CD64^{pos}. Les TZM forment un réseau de cellules interdigitées rappelant les cellules dendritiques sur le plan morphologique, avec lesquelles ils partagent également l'expression de CD11c et du CMH II. Toutefois, contrairement aux DC, les TZM présentent de large vacuoles, sont incapables d'activer des lymphocytes T naïfs, et expriment les marqueurs canoniques de macrophages MERTK ou CD64/FcγRI ⁶⁰⁹.

Ces phagocytes éliminent les cellules apoptotiques sans déclencher l'activation des lymphocytes T ; ils présentent un profil transcriptomique anti-inflammatoire. Dans le ganglion quiescent les TZM maintiennent l'intégrité tissulaire en phagocytant les cellules apoptotiques présentes dans la zone T, comme des DC ou des lymphocytes T. Cette fonction d'élimination des cellules apoptotiques et des débris cellulaires permettant d'éviter une auto-réactivité est partagée par de nombreux TRM. Lors de la phase de contraction de la réponse immune, les TZM éliminent les lymphocytes T effecteurs apoptotiques ⁶⁰⁹.

3.1.2.3 Ontogénie des macrophages ganglionnaires

Les TRM sont des cellules à longue durée de vie, dérivées initialement de progéniteurs hématopoïétiques du lécithocèle et de monocytes issus du foie fœtal ou de la moelle osseuse. La contribution des monocytes au maintien des populations de TRM, qui peuvent aussi s'auto-renouveler, varie fortement d'un tissu à l'autre ³³. L'ontogénie des macrophages ganglionnaires n'est pas complètement élucidée, mais ils proviendraient principalement de la moelle osseuse ⁵⁹². En effet, la formation des ganglions lymphatiques est un évènement relativement tardif au cours de l'embryogenèse, et l'architecture définitive des LN n'est acquise qu'après la naissance. Il a ainsi été montré que les TZM sont issus d'une première vague de progéniteurs myéloïdes embryonnaires, suivie d'un recrutement de monocytes circulants qui vont coloniser le ganglion après la naissance et constituer la majeure partie des TZM ⁶⁰⁹. Si les TZM sont lentement

renouvelés par l'apport de monocytes circulants à l'état basal, c'est leur prolifération au cours de la réponse immune qui va maintenir leur densité dans la zone T au sein du ganglion en expansion ⁶⁰⁹. De manière similaire, les SSM sont initialement issus de progéniteurs hématopoïétiques du lécithocèle, puis remplacés en post-natal par des monocytes provenant de la MO, qui prolifèrent *in situ*. À l'état basal la contribution de la MO est limitée, mais le contingent de SSM est renouvelé par des monocytes lorsqu'il est atteint par une infection ⁶¹⁰. On ignore dans quelle mesure les monocytes participent au maintien de la population de macrophages des sinus ganglionnaires en conditions normales, mais la disparition de ces derniers entraîne leur remplacement via le recrutement et la différenciation de monocytes circulants ^{596,611}. Les TBM et les MCM peuplent des structures émergent lors de la réponse immune, et sont donc probablement dérivés de précurseurs locaux ou circulants. Les TBM, qui partagent nombre de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec les TZM, pourraient être en partie issus de cette population ⁵⁹².

Les macrophages résidents du ganglion jouent de multiples rôles essentiels dépendant de leur localisation et de leur spécialisation fonctionnelle : sentinelles et coordinateurs de la réponse immunitaire, phagocytes éliminant pathogènes et débris cellulaires, effecteurs trophiques.

3.1.3 Une relation étroite avec des cellules stromales spécialisées

En fonction de leur localisation, les différents sous-types de macrophages seront associés préférentiellement à différents types de cellules stromales et endothéliales ; par exemple les TZM seront associés aux FRC au sein de la zone T, et les TBM aux FDC dans le centre germinatif ^{592,612}. Le concept de la niche des macrophages propose un modèle dans lequel les macrophages dépendent de niches microanatomiques leur fournissant un support d'ancrage et des facteurs de survie, niches qu'ils vont soutenir en retour dans un dialogue bidirectionnel ^{7,34}. Dans le ganglion, les différentes populations de macrophages pourraient interagir avec différentes populations de cellules stromales ou endothéliales au sein d'une niche spécifique ⁵⁹².

3.1.3.1 Cellules stromales ganglionnaires

Au-delà de leur rôle structurel, les cellules stromales ganglionnaires organisent le ganglion en participant à la mise en place de niches fonctionnelles intervenant dans la réponse immunitaire (Figure 19). Les cellules stromales lymphoïdes matures se caractérisent par l'expression de la podoplanine (PDPN, également appelée glycoprotéine 38 ou Gp38) et leur négativité pour les marqueurs des lignées hématopoïétique, endothéliale et épithéliale (respectivement CD45, CD31, et EpCAM) ⁶¹³.

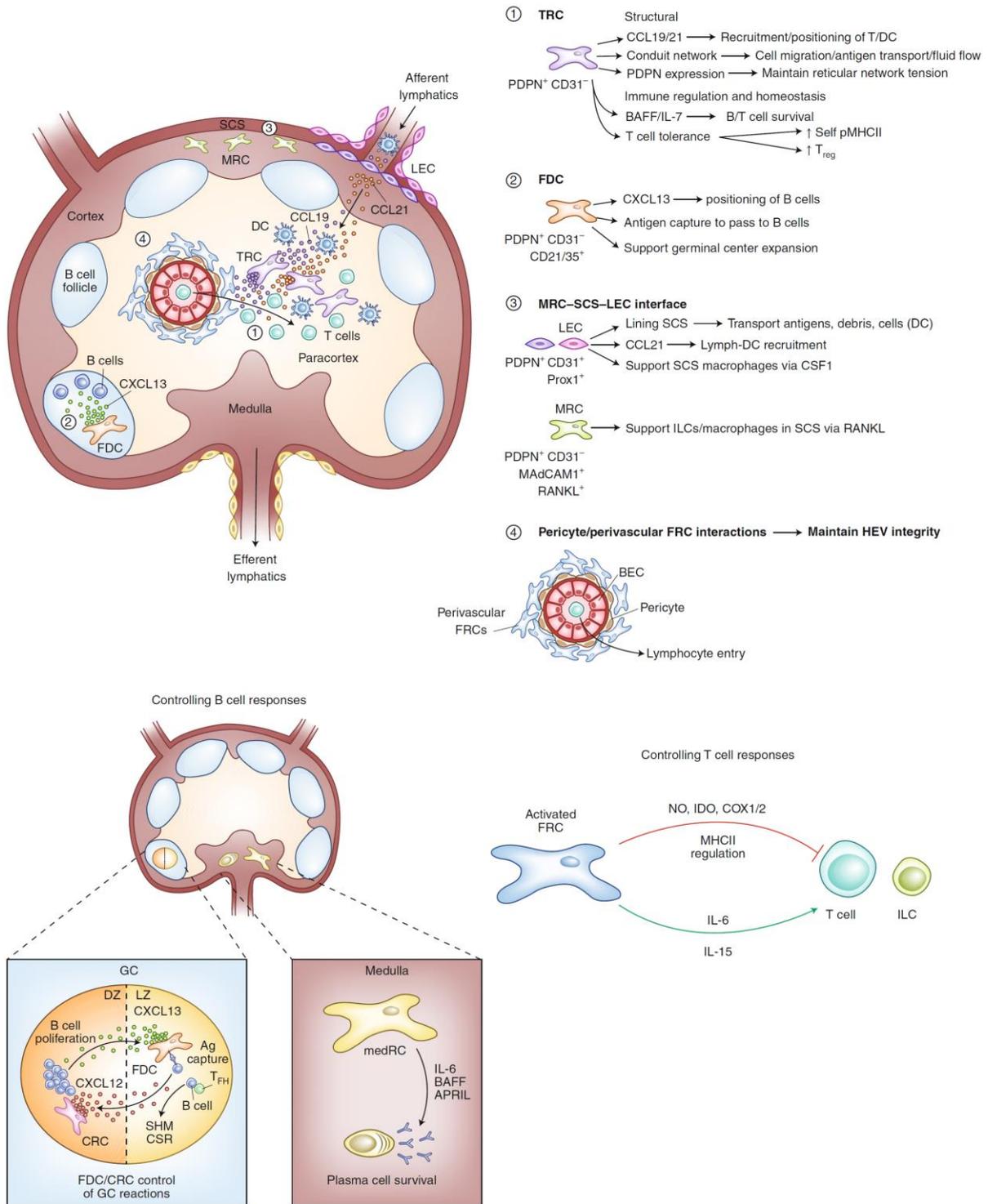


Figure 19 | Hétérogénéité et rôles des populations stromales lymphoïdes des ganglions

Différents sous-types de cellules stromales et endothéliales occupent des zones spécifiques dans le ganglion lymphatique (LN) et assurent des fonctions distinctes indispensables au maintien de l'intégrité et à la fonctionnalité du LN (haut).

1) Les cellules réticulées de la zone T (TRC - *T zone reticular cells*), c'est-à-dire les cellules fibroblastiques réticulaires (FRC - *fibroblastic reticular cells*) situées dans le parenchyme paracortical, ont un rôle structurel et régulateur de la réponse immune. Les TRC élaborent le réseau réticulaire maintenant l'architecture du ganglion et formant des conduits facilitant la migration des cellules de l'immunité. Les TRC expriment CCL19 et CCL21, chimiokines permettant le recrutement

des lymphocytes T et des DC depuis les circulations sanguines et lymphatiques et leur persistance en zone T. Les TRC soutiennent également les lymphocytes T et B via la production de facteurs de survie comme IL-7 ou BAFF, et participent à la tolérance T en présentant des antigènes du soi via le CMH de classe II, induisant des lymphocytes T régulateurs (Treg). 2) Les cellules folliculaires dendritiques (FDC – *follicular dendritic cells*) résident au sein des follicules B et sécrètent la chimiokine CXCL13 médiant le recrutement des lymphocytes B. En cas de réponse immune, les FDC présentent des antigènes aux lymphocytes B et facilitent l'expansion du follicule nécessaire à la formation du centre germinatif (GC). 3) Sur le pourtour du ganglion au niveau du sinus sous-capsulaire, se situent les cellules endothéliales lymphoïdes (LEC – *lymphoid endothelial cells*) qui pavent les sinus, et les cellules marginales réticulaires (MRC – *marginal reticular cells*) qui résident dans le parenchyme sous-jacent. Les LEC facilitent le passage vers le parenchyme des antigènes et des cellules immunitaires provenant de la lymphe afférente. Au niveau du plancher du sinus, les LEC expriment CCL21 pour promouvoir l'entrée des cellules dendritiques (DC) dans le cortex. Les LEC soutiennent également l'homéostasie des macrophages du sinus sous-capsulaire (SSM – *subscapular sinus macrophages*) en produisant le facteur de croissance M-CSF/CSF1. Les MRC soutiennent également les macrophages, mais aussi les inducteurs du tissu lymphoïde, un sous-type de cellules lymphoïdes innées (ILC – *innate lymphoid cells*), en exprimant RANKL. 4) Les veinules à endothélium épais (HEV – *high endothelial venules*), des cellules endothéliales sanguines (BEC – *blood endothelial cells*) spécialisées, expriment des molécules d'adhésion facilitant l'entrée des lymphocytes circulants dans le LN. Des péricytes et des FRC périvasculaires entourent les HEV ; ces cellules participent au maintien de l'intégrité vasculaire et sécrètent des chimiokines favorisant la migration des lymphocytes vers le parenchyme.

Les cellules stromales ganglionnaires jouent un rôle-clé dans la réponse immune adaptative, en intervenant dans la régulation des réponses B et T (bas).

Des cellules stromales distinctes vont contribuer à la réponse humorale. Les cellules réticulaires exprimant CXCL12 (CRC – *CXCL12-expressing reticular cell*) et les FDC participent à la maturation d'affinité des lymphocytes B en coordonnant leur circulation entre les zones sombre (DZ – *dark zone*) et claire (LZ – *light zone*) du centre germinatif via l'expression de chimiokines. Dans la zone sombre, les lymphocytes B prolifèrent et subissent l'hypermutation somatique (SHM) ; ils expriment CXCR4, récepteur de CXCL12 produit par les CRC. En réduisant leur expression de CXCR4 et en exprimant CXCR5, les lymphocytes vont migrer vers la zone claire où les FDC produisent CXCL13, ligand de CXCR5. Dans la zone claire, où les lymphocytes B subissent la commutation isotypique (CSR – *class-switch recombination*), les FDC participent à la sélection des lymphocytes B présentant les BCR les plus affins en capturant et en leur présentant des antigènes. Les lymphocytes B peuvent alors retourner proliférer dans la zone sombre, et ce circuit se poursuit jusqu'à la sortie du GC. Dans la médulla, les cellules réticulaires médullaires (MedRC – *medullary reticular cells*) participent à la niche de soutien des plasmocytes en sécrétant les cytokines IL-6, BAFF et APRIL. Lors d'une réponse immune, les FRC activées peuvent à la fois promouvoir et limiter la réponse T. Les FRC sécrètent des cytokines comme IL-6 et IL-15 qui vont soutenir l'activité et la fonctionnalité des lymphocytes T et des ILC lors d'une réponse immune. A contrario, les FRC peuvent produire des molécules inhibitrices comme le monoxyde d'azote (NO), les enzymes indoléamine 2-3 dioxygénase 1 (IDO) et cyclooxygénases 1 et 2 (COX1, COX2) en réponse à des signaux inflammatoires comme l'IFN γ . D'après Krishnamurty & Turley, 2020⁶¹⁴.

On distingue classiquement parmi les cellules stromales lymphoïdes PDPN^{pos}CD31^{neg} les cellules dendritiques folliculaires (FDC – *follicular dendritic cells*) PDPN^{pos}CD31^{neg}CD21^{pos}CD35^{pos} sécrétrices de CXCL13 et localisées dans les follicules B en zone claire du GC, les cellules fibroblastiques réticulaires (FRC – *fibroblastic reticular cells*) PDPN^{pos}CD31^{neg}CD21^{neg}CD35^{neg} sécrétrices de CCL19 et CCL21 de localisation extra-folliculaire, dans la zone T, et les cellules marginales réticulaires (MRC – *marginal reticular cells*), PDPN^{pos}CD31^{neg}RANKL^{pos} et localisées en bordure des follicules dans la région sous-capsulaire.

Cette classification est toutefois remise en cause par les stratégies récentes d'imagerie et de séquençage, en particulier les études scRNASeq qui ont mis en évidence l'hétérogénéité des cellules stromales lymphoïdes chez la souris, et tout récemment chez l'humain ^{520,615}. Ainsi, chez la souris, une nouvelle population stromale a été identifiée dans le GC, au sein de la zone sombre ⁶¹⁶. Ces cellules réticulaires exprimant CXCL12 (CRC - *CXCL12-expressing reticular cells*) sont également appelées FDC de la zone sombre (DZ FDC - *dark zone FDC*) par opposition aux FDC de la zone claire (LZ FDC - *light zone FDC*) ⁶¹⁶⁻⁶¹⁸. Différentes sous-populations de FRC, dont les caractéristiques fonctionnelles varient en regard de leur localisation, ont également été identifiées. Un premier niveau de résolution distingue les cellules réticulaires de la zone T (TRC - *T zone reticular cells*), FRC les plus nombreuses et les mieux décrites, des cellules réticulaires médullaires (MedRC - *medullary reticular cells*) ^{613,615,619}. Les TRC elles-mêmes constituent une population hétérogène au sein de laquelle peuvent se distinguer cellules réticulaires bordant la zone T-B (TBRC - *T-B border reticular cells*), cellules réticulaires inter-folliculaires (IFRC - *interfollicular FRC*), ou encore les cellules réticulaires péri-vasculaires (PRC - *perivascular reticular cells*) ^{615,618,620}. D'autres sous-types de cellules stromales ont été décrites dans le ganglion de la souris, dont des péricytes et des cellules adventitielles PDPN^{neg}CD34^{pos} situés en péri-vasculaire et au niveau de la capsule ganglionnaire ^{614,615}. Dans les ganglions humains, une étude scRNASeq a identifié 12 clusters de cellules stromales non endothéliales, incluant les FDC, les TRC, les MRC, les péricytes, les cellules adventitielles de la capsule, mais aussi d'autres populations qui pourraient correspondre aux MedRC, aux TBRC, aux IFRC et aux PRC ⁵²⁰.

Cellules folliculaires dendritiques (FDC)

Les FDC, situées au sein de la zone claire des centres germinatifs des OLS, essentielles à la formation des GC ainsi qu'à la sélection des lymphocytes B de forte affinité, ont été identifiées en 1965. Elles se différencient à partir de précurseurs mésenchymateux exprimant le récepteur à la lymphotoxine β (LT β R - *lymphotoxin β receptor*), sous la dépendance de signaux TNF α , LT α et LT β ⁶²¹⁻⁶²⁶.

Les FDC sont PDPN^{pos}CD31^{neg}CD21^{pos}CD35^{pos}CD32^{pos}CD351^{pos}. L'expression de la PDPN, associée à la négativité du CD31, signe leur phénotype de cellules stromales lymphoïdes matures. Elles expriment également les récepteurs au complément CR1/CD35 et CR2/CD21, ainsi que les récepteurs aux IgG Fc γ RII/CD32 et aux IgA et IgM FCAMR/CD351, permettant la présentation d'antigènes aux lymphocytes B, indispensable à leur sélection. Les FDC expriment de hauts niveaux de CXCL13, chimiokine permettant le recrutement des lymphocytes B et Tfh CXCR5^{pos} ^{627,628}, ainsi que les molécules d'adhésion ICAM1/CD54 et VCAM1/CD106, qui participent à la stabilisation des interactions FDC - centrocytes au cours de la réaction du GC ⁶²⁹⁻⁶³¹.

Sur le plan fonctionnel, les FDC joue un rôle essentiel dans l'initiation et l'organisation de la réaction du GC, via un dialogue tripartite avec les lymphocytes B et Tfh. Les FDC sont la principale source de CXCL13, chimiokine induisant le recrutement des lymphocytes B et des Tfh CXCR5^{pos} nécessaire à l'initiation du GC. Le CXCL13 est également impliqué dans la circulation des lymphocytes B au cours de leur maturation entre les zones claires et sombres du GC, cette dernière étant riche en CXCL12. La balance entre chimiokines CXCL12 et CXCL13 déterminera le tropisme des lymphocytes B en fonction de leur expression des récepteurs CXCR4 et CXCR5^{245,632}. Les récepteurs au complément exprimés par les FDC permettent la capture de complexes immuns et ainsi la présentation prolongée d'antigènes sous forme native aux lymphocytes B, induisant une signalisation BCR nécessaire à la maturation d'affinité^{576,633-635}. Lors de la réaction du GC, la surexpression par les FDC d'ICAM1/CD54 et de VCAM1/CD106, ligands des intégrines LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen 1*) et VLA-4 (*very late antigen 4*) exprimés par les lymphocytes B, prévient l'apoptose de ces derniers et stabilise l'interaction FDC – centrocyte⁶²⁹⁻⁶³¹. La fonction anti-apoptotique des FDC serait également médiée par la production de ligands hedgehog et Notch^{636,637}. Bien qu'elles produisent divers facteurs de survie des lymphocytes B – comme IL-15, BAFF, HGF – les FDC n'interagiraient que trop brièvement avec les lymphocytes B pour leur assurer un soutien effectif *in vivo*⁶³⁸⁻⁶⁴¹. Cette fonction de soutien serait plutôt assurée par les lymphocytes Tfh, qui sélectionnent positivement les lymphocytes B les plus affins via la création d'une synapse immunologique^{635,642-644}. En revanche, les FDC pourraient promouvoir la phagocytose des lymphocytes B pré-apoptotiques par les macrophages à corps tingible en produisant MFGE8⁶⁴⁵. Les FDC matures expriment également TLR4, dont la stimulation par les phospholipides oxydés endogènes libérés par les cellules B apoptotiques induit la production de TGFβ, ce qui donne aux FDC la capacité de promouvoir l'activité d'AID et par conséquent les hypermutations somatiques (SHM) et la commutation isotypique (CSR) dans les lymphocytes B⁶⁴⁶⁻⁶⁴⁸. Par ailleurs, les FDC expriment différentes molécules immunosuppressives, comme CD200, IL411, PDL1 et PDL2, qui réguleraient l'activation et la prolifération T au sein du GC^{521,649}.

Cellules réticulaires exprimant le CXCL12 (CRC)

Les CRC, encore appelées FDC de la zone sombre, ont été identifiées récemment comme les cellules stromales lymphoïdes spécifiques de la zone sombre du GC^{616,617,650}. Elles se distinguent des FDC par l'absence d'expression des récepteurs au complément CD21 et CD35 ainsi que par leur morphologie et leur profil transcriptionnel, mais surtout par leur forte expression de CXCL12, qui leur confère leur nom^{615,616}. Les CRC sont par conséquent impliquées dans le recrutement initial des lymphocytes B centroblastiques CXCR4^{pos} au sein de la zone sombre où ils pourront proliférer, mais aussi dans leur circulation entre les zones sombre et claire du GC au cours de la maturation d'affinité^{616,650}.

Cellules fibroblastiques réticulaires (FRC)

Les FRC se situent dans la zone T et constituent un réseau réticulaire interconnecté qui forme la structure du ganglion et favorise la motilité des cellules immunitaires^{613,651}. Les FRC sont essentielles à l'organisation des follicules B et à la réponse adaptative, y compris humorale⁶⁵². Les deux facteurs clés impliqués dans la différenciation et le maintien des FRC, comme des autres cellules stromales lymphoïdes, sont la LT et le TNF^{653,654}.

Les FRC sont PDPN^{pos}CD31^{neg}CD21^{neg}CD35^{neg}. Elles expriment également les molécules d'adhésion ICAM1/CD54 et VCAM1/CD106, ainsi que le récepteur à la lymphotoxine β LT β R et PDGFRA. Les FRC produisent de nombreux composants de la MEC comme le collagène IV, la ténascine, la laminine, la fibronectine, et la fibrilline. Au-delà de leur aspect fibroblastique, elles partagent également certaines caractéristiques avec les myofibroblastes, comme l'expression d' α SMA et de la desmine et la capacité à contracter les fibres de collagène I^{571,655-657}.

Les FRC sont à l'origine du réseau de conduits – dynamique et modulé en conditions inflammatoires – permettant la migration des cellules et le transport des antigènes dans le ganglion, et assurant le maintien de la tension du réseau réticulaire⁶⁵⁸. Outre leur fonction structurelle, les FRC présentent de nombreuses fonctions de régulation immunitaire. Principale source des chimiokines CCL19 et CCL21, les FRC recrutent les lymphocytes T naïfs CCR7^{pos}, les DC matures CCR7^{pos}, mais aussi les lymphocytes B naïfs à la zone T^{571,584,627,659-661}. Les FRC produisent de l'IL-6 et de l'IL-7 qui soutiennent la survie des lymphocytes T^{656,662,663}. Les FRC sont aussi impliquées dans la tolérance et la résolution de la réponse immune via la régulation de l'activation et de la prolifération T CD4 et CD8. Ainsi, la co-culture de FRC et de lymphocytes T activés diminue la capacité de prolifération de ces derniers. Cet effet régulateur des FRC passe chez la souris par la production de monoxyde d'azote (NO) via une augmentation de l'activité de l'enzyme iNOS (iNOS – *inducible nitric oxide synthase*) induite par le TNF α et l'IFN γ sécrétés par les lymphocytes T activés^{527,664,665}. Chez l'humain,IDO, PGE2, et le TGF β seraient notamment impliqués⁶⁶⁶. Les FRC peuvent également induire la tolérance des lymphocytes T CD4 et promouvoir la prolifération de lymphocytes Treg FOXP3+ en leur présentant des complexes peptide-CMH II qu'elles auront acquis des DC^{663,667-669}. De plus, les FRC peuvent présenter des auto-antigènes via le CMH I, et contribuer à l'élimination des lymphocytes T auto-réactifs⁶⁷⁰⁻⁶⁷⁶. Le recrutement des lymphocytes B au ganglion puis leur migration du paracortex vers les follicules est médié par les chimiokines CCL19, CCL21 et CXCL12 produites par les FRC⁶²⁷. Les FRC, en particulier de localisation périfolliculaire, soutiendraient également la survie des lymphocytes B via la sécrétion de BAFF⁶⁵². La co-culture d'un modèle de FRC (cellules stromales mésenchymateuses stimulées par TNF α et LT α 1 β 2) et de lymphocytes B favorise la survie de ces derniers, un effet abrogé par l'IFN γ qui induit la production de l'enzyme IDO par les cellules

stromales⁵²⁸. Les FRC pourraient donc réguler l'activation B. Par ailleurs, les FRC sont directement impliquées dans la motilité des DC, via l'interaction de la podoplanine avec CLEC2 exprimé par les DC. Une atteinte de l'axe PDPN-CLEC2 entraîne la perturbation de la motilité des DC et par conséquent de la réponse T⁶⁷⁷. Les DC, ainsi que les lymphocytes, produisent de la lymphotoxine, qui induit une augmentation de l'expression de la PDPN par les FRC, favorisant l'adhérence cellulaire aux intégrines, la survie, et les interactions médiées par la PDPN^{678,679}. L'interaction FRC-DC favorise la production des facteurs de survie lymphocytaires tels que BAFF et IL-7 par les FRC⁶⁷⁸. L'axe PDPN-CLEC2 joue un rôle central dans la capacité du ganglion à s'expandre lors de la réponse immune, c'est cette interaction qui entraînera la réduction de la contractilité et l'élongation des FRC^{680,681}. Les FRC sont en outre les principales productrices du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF dans le ganglion lymphatique, ce qui suggère un rôle des FRC dans l'homéostasie vasculaire du LN^{682,683}. Cette production de VEGF est favorisée par les DC via la production d'IL1 β ⁶⁸².

La majorité des connaissances sur la fonctionnalité des FRC correspond aux propriétés des TRC, les FRC de la zone T. Des traits phénotypiques ou fonctionnels spécifiques sont attribués à d'autres types de FRC et sous-types de TRC. Ainsi, les TBRC, FRC situées en bordure du follicule à la frontière T-B, exprimeraient peu de CCL21 mais des niveaux élevés de CXCL12, BAFF et APRIL ; elles participent au recrutement des B vers le follicule et constituent une niche de prolifération pour les lymphocytes B matures^{615,684}. Une population de TRC GREM1^{pos} située à la frontière T-B a été identifiée chez l'humain comme chez la souris et serait nécessaire à l'obtention d'une réponse T optimale via l'activation des DC⁶⁸⁵. Toujours en périfolliculaire, une population de cellules stromales dormantes CD21^{pos}, capables de sécréter CXCL13 au contact de lymphocytes B activés, a été identifiée chez la souris. Ces cellules, située à l'état basal hors du follicule, seraient converties en cellules sécrétrices de CXCL13 lors de l'expansion du GC dans la zone T⁶⁸⁶. Les IFRC, en zone interfolliculaire, sécrètent la chimiokine CXCL9 permettant le recrutement de cellules myéloïdes en conditions inflammatoires^{618,687}. Des PRC PDPN^{pos}CD34^{pos}, cellules adventitielles situées en périvasculaire notamment autour des HEV, pourraient être des précurseurs des cellules stromales lymphoïdes. Cette notion reste toutefois sujette à discussion, puisque les péricytes, qui n'expriment pas la podoplanine, mais aussi des cellules stromales PDPN^{neg}CD31^{neg} α SMA^{pos}PDGFR β ^{pos} (appelées DN, *double negative*), ont été proposés comme précurseurs des FDC et FRC^{521,688-690}. Enfin, les MedRC structurent la niche plasmocytaire au niveau de la médulla. Les MedRC produisent la MEC spécifique aux cordons médullaires et expriment CXCL12, APRIL, IL-6 et BAFF, favorisant la migration des plasmocytes CXCR4^{pos} vers la médulla et contribuant, avec les macrophages des cordons médullaires, à leur niche de soutien⁶¹⁹.

Cellules marginales réticulaires (MRC)

Les MRC, situées dans le cortex sous le plancher du sinus sous-capsulaire et à l'extérieur des follicules B, ont été identifiées en 2008 ⁶⁹¹. Elles sont PDPN^{pos}CD31^{neg}RANKL^{pos}MAdCAM^{pos}. Les MRC expriment LTβR, CXCL13, ainsi qu'ICAM1 et VCAM1. Bien qu'elles en expriment le récepteur, la différenciation des MRC ne serait que partiellement dépendante de la lymphotoxine et des lymphocytes T et B ^{612,691}. Les MRC seraient directement issues des organisateurs du tissu lymphoïde (LTo – *lymphoid tissue organizers*) qui interviennent dans l'organogenèse des OLS ⁶⁹². Les MRC pourraient proliférer et se différencier en FDC au cours de la réponse immune et de la formation du GC ⁶⁹³.

Les MRC forment des conduits permettant le transport de petits antigènes solubles aux lymphocytes B et FDC dans le follicule ^{633,692,694}. Les MRC constituent une niche de soutien pour les cellules lymphoïdes innées ILC3 RORγt^{pos} et pour les macrophages du sinus sous-capsulaire ^{687,695-697}. Dans la rate, les MRC agiraient comme des phagocytes non professionnels des lymphocytes B apoptotiques ⁶⁹⁸.

3.1.3.2 Cellules endothéliales ganglionnaires

Les ganglions présentent la caractéristique structurelle d'être irrigués par des réseaux vasculaire et lymphatique hautement spécialisés, représentés par les veinules à endothélium épais (HEV) dans le paracortex et les vaisseaux et sinus lymphatiques dans le paracortex et la médulla.

Cellules endothéliales lymphatiques (LEC) du ganglion

Les sinus lymphatiques sont le théâtre d'une part importante des entrées et sorties des cellules et antigènes dans le ganglion. Les cellules endothéliales lymphoïdes (LEC) du LN sont des cellules spécialisées distinctes des LEC périphériques. Elles forment une barrière semi-perméable capable de réguler le transfert d'antigènes et de cellules entre la lymphe et le parenchyme ganglionnaire. Les LEC constituent une population hétérogène, dont les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles peuvent varier avec leur localisation au sein du LN, comme cela a été souligné par des études récentes chez la souris comme chez l'humain ^{520,572,699-702}. Les LEC pourraient même présenter des profils différents en fonction de la localisation du ganglion où elles résident ⁷⁰³.

Les LEC combinent marqueurs phénotypiques endothéliaux et lymphoïdes, elles sont CD45^{neg}PDPN^{pos}CD31^{pos}CD34^{pos}. Les LEC du LN expriment également VEGFR3, PROX1 et CD206 ^{704,705}. Elles produisent différents facteurs de croissance pour les lymphocytes T naïfs, les macrophages, les FRC et les cellules endothéliales vasculaires : IL-7, M-CSF/CSF1, PDGF, VEGF et angiopoïétines ^{663,706}. Les LEC de LN expriment également diverses lectines de type C, récepteurs éboueurs, récepteurs aux fragments Fc des Ig et TLR, qui pourraient être impliqués dans la capture

d'antigènes ^{663,706}. Il a été démontré que les LEC de LN peuvent agir comme des cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles ⁷⁰⁷. Les molécules du CMH II peuvent être produites par les LEC elles-mêmes ou transférées par les DC ^{669,701,706}. Les LEC expriment en revanche peu ou pas de molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation T, mais plutôt des molécules co-inhibitrices comme PDL1 ; elles seraient donc plutôt impliquées dans la régulation des lymphocytes T ^{701,708,709}. En outre, les LEC pourraient constituer un réservoir d'antigènes, en les capturant lors d'une infection, les stockant, et les libérant progressivement dans le parenchyme où la réponse immunitaire adaptative se met en place ^{710,711}. Les LEC interviennent dans le contrôle de la sortie des lymphocytes du LN via les sinus, en produisant notamment la sphingosine 1 phosphate (S1P) qui attire les lymphocytes S1PR1^{pos} vers la lymphe ⁵⁷².

On distingue au niveau du sinus sous-capsulaire deux populations de LEC : les LEC du plafond et les LEC du plancher. En exprimant CCRL1/ACKR4, le récepteur atypique de CCL19 et CCL21 qui va neutraliser CCL21, les LEC du plafond créent un gradient chimiokinique au sein du sinus, favorisant le recrutement des DC matures CCR7^{pos} vers le parenchyme ganglionnaire ⁷⁰⁵. De plus, les LEC du plancher expriment CCL21 et CCL1, ce qui facilite la migration des DC qui en expriment les récepteurs CCR7 et CCR8 ^{712,713}. Au niveau du plancher du sinus sous-capsulaire ainsi que dans le sinus médullaire, où elles sont associées aux macrophages des sinus ganglionnaires CD169^{pos}, les LEC expriment le récepteur LYVE1, le récepteur *scavenger* CD204/MSR1, ainsi que plusieurs chimiokines attirant les neutrophiles (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5) ^{568,700,701,705}. Au niveau du sinus sous-capsulaire, les LEC expriment CD169, tandis que dans les sinus corticaux et médullaires elles expriment l'endomucine chez la souris comme chez l'homme ⁷⁰⁰. Les LEC du sinus médullaire expriment CD209/DC-SIGN, qui pourrait jouer un rôle dans l'adhésion des neutrophiles qui expriment son ligand Lewis X/CD15. Par ce biais, les LEC participeraient donc indirectement à limiter la dissémination des pathogènes dans l'organisme ⁷⁰¹. Deux populations de LEC du sinus médullaire sont décrites. Les LEC MARCO^{pos} sont situées dans les sinus médullaires périfolliculaires et expriment des gènes associés aux macrophages, au complément et à la coagulation, alors que les LEC PTX3^{pos}, exprimant la pentraxine 3, se situent au niveau du hile et sont enrichies en gènes impliqués dans la sortie des lymphocytes ⁷⁰². D'autres sous-types de LEC du LN ont été décrites avec des localisations distinctes, dont des LEC de la face capsulaire au niveau de la médulla, et des LEC valvulaires, qui présentent même des phénotypes distincts suivant leur orientation par rapport au flux lymphatique ^{520,699,701,702}.

Cellules endothéliales des veinules à endothélium épais (HEC)

Comme toute structure vascularisée, les ganglions contiennent des vaisseaux pavés de cellules endothéliales vasculaires (BEC). Un endothélium de morphologie particulière constitué de cellules d'aspect rebondi, très différentes des cellules endothéliales d'aspect pavimenteux, a

été décrit dans le ganglion dès 1898 ^{714,715}. Ces veinules du paracortex, spécialisées dans le transfert des cellules immunitaires vers le parenchyme et principal site d'entrée des lymphocytes dans le ganglion, ont été appelées veinules à endothélium épais (HEV – *high endothelial venules*) en 1964 ⁷¹⁶. La haute taille des cellules endothéliales des HEV (HEC – *HEV endothelial cells*) pourrait leur permettre de limiter la fuite vasculaire en formant un système d' « écluses » autour des lymphocytes en transit dans les espaces intercellulaires ⁷¹⁴.

Les BEC sont PDPN^{neg}CD31^{pos}CD34^{pos}. Les HEC présentent des caractéristiques phénotypiques en lien avec leur rôle dans l'adhésion et la migration des lymphocytes. Ainsi, l'expression de glycanes 6-sulfo sialyl Lewis X (ornant les sialomucines membranaires), et de gènes associés à leur synthèse, permet de différencier les HEC des autres BEC ⁷¹⁷⁻⁷¹⁹. Les HEC expriment aussi abondamment la glycoprotéine nepmucin, l'IL-33, et hevin/SPARCL1 (*high endothelial venule protein/SPARC-like protein 1*).

L'entrée des lymphocytes via les HEV est initiée par les interactions entre la L-sélectine/CD62L à la surface des lymphocytes et les sialomucines en surface des HEC, comme CD34, nepmucin, endomucine ^{585,720,721}. Ces sialomucines sont hautement fucosylées et sialylées, notamment par le déterminant 6-sulfo sialyl Lewis X qui est essentiel à la liaison avec la L-sélectine ⁷¹⁷⁻⁷¹⁹. Après cette phase de roulement, les lymphocytes vont pouvoir adhérer à l'endothélium en activant des intégrines sous l'effet des chimiokines CCL21, CXCL12 et CXCL13, médiateurs essentiels de l'extravasation des lymphocytes T et B naïfs qui expriment leurs récepteurs CCR7, CXCR4 et CXCR5 (ce dernier n'étant pas exprimé par les T). Ces chimiokines sont exprimées par les cellules stromales lymphoïdes et transcytosées vers la lumière par les HEV ⁵⁸⁵. L'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ /LFA-1 joue un rôle majeur dans l'adhésion des lymphocytes T et B via sa liaison aux molécules d'adhésion ICAM1 et ICAM2 exprimées par les HEC ^{722,723}. Après leur adhésion, les lymphocytes peuvent se déplacer le long de la paroi endothéliale à la recherche d'un site de migration transendothéliale, puis peuvent s'accumuler transitoirement dans des « poches » intercellulaires, structures dynamiques qui pourraient participer à la morphologie particulière des HEV ^{724,725}. Outre les lymphocytes T et B naïfs, des lymphocytes T centraux mémoires et des lymphocytes Treg exprimant CCR7 et la L-sélectine peuvent migrer au parenchyme ganglionnaire en situation homéostatique en empruntant ces mêmes voies ^{585,726}. Les HEV contrôlent également l'entrée de pDC, de précurseurs de cDC et de lymphocytes NK, qui peuvent circuler dans les ganglions à l'état basal ⁷²⁷⁻⁷²⁹.

En conditions homéostatiques, les HEV sont présentes exclusivement dans les OLS, mais des vaisseaux présentant les caractéristiques structurelles, phénotypiques et fonctionnelles des HEV peuvent se développer au sein de SLT dans des tissus non lymphoïdes lors d'inflammation

chronique, notamment dans le cancer. Leur présence est alors associée à une importante infiltration lymphocytaire et un pronostic plutôt favorable ^{568,714,730}.

Les HEV associées aux tumeurs (TA-HEV – *tumor-associated HEV*) sont fréquemment situées dans des zones riches en lymphocytes T ou au sein des structures lymphoïdes tertiaires (TLS). Les TA-HEV jouent un rôle important dans le recrutement de lymphocytes à la tumeur, et par conséquent dans l'immunité anti-tumorale et la réponse à l'immunothérapie ^{714,731-733}. Leur abondance est d'ailleurs corrélée à un bon pronostic dans le cancer du sein et le mélanome, alors que la néoangiogenèse tumorale est habituellement associée à un pronostic défavorable ^{731,732}. Les conséquences physiopathologiques et pronostiques de l'angiogenèse dans le cancer pourraient dépendre du phénotype des cellules endothéliales.

3.1.3.3 Dialogue stroma/macrophages en situation physiologique

L'architecture ganglionnaire définit des régions distinctes peuplées de cellules macrophagiques, stromales, et endothéliales hautement spécialisées qui vont intervenir à différents niveaux dans la réponse immunitaire. Ces cellules forment des niches microanatomiques spécifiques au sein desquelles elles vont interagir ⁵⁹² (Figure 20).

Les cellules stromales et endothéliales constituent des niches de soutien des macrophages dans le ganglion, dont l'ensemble des acteurs et des mécanismes impliqués restent à élucider ⁵⁹². Le CSF1 est le facteur essentiel à la survie, prolifération, différenciation et fonctionnalité des macrophages. Il peut être sécrété ou membranaire ^{734,735}. La fractalkine/CX3CL1 se présente sous forme membranaire et promeut la survie de macrophages CX3CR1^{pos} dans différents tissus ^{736,737}. Au vu de leur localisation, les LEC pourraient fournir un soutien aux macrophages des sinus sous-capsulaire et médullaires. Les MRC pourraient également fournir une niche aux SSM. Des travaux chez la souris ont montré une importante activité du promoteur de CSF1 en périphérie de la zone corticale, mais sans que les cellules productrices soient identifiées ⁷³⁵. Les SSM nécessiteraient une signalisation CSF1-CSF1R pour leur maintien, ce qui ne semble pas être le cas pour les MSM ⁷³⁸. Des travaux récents ont permis de préciser le rôle des LEC dans le développement et le maintien des macrophages des sinus ^{610,695,696}. Les LEC constitueraient bien la principale source de CSF1 dans le ganglion et sont essentielles au développement embryonnaire des SSM au et à leur reconstitution après une infection ⁶¹⁰. L'expression de RANK par les LEC est également indispensable au développement et à la différenciation des SSM et MSM au cours de l'embryogenèse, ainsi qu'à la restauration de leurs populations après l'inflammation. Cette fonction de soutien des LEC passe par un dialogue tripartite avec les MRC, qui produisent RANKL/TNFSF11 pour activer les LEC ⁶⁹⁵. De plus, les SSM – qui expriment RANK et LTβR – dépendent directement des signalisations RANKL et LTαβ, qui seraient induites respectivement par les MRC et les lymphocytes B du GC, pour leur différenciation ^{695,696}. Dans la zone T, les TZM

sont arrimés au réseau formé par les FRC. Bien que les TZM soient CX3CR1^{pos} et que certaines FRC produisent CX3CL1, un rôle non redondant de ce facteur de croissance a été exclu chez des souris déficientes pour CX3CR1⁶⁰⁹. D'autres facteurs trophiques seraient impliqués dans le soutien des FRC aux TZM et restent à identifier. De la même manière, la survie des MCM et des TBM ne dépendrait pas de CSF1 mais d'autres facteurs, potentiellement produits respectivement par les MedRC et les FDC^{592,738}. Outre les macrophages résidents, les cellules stromales peuvent recruter et polariser des phagocytes mononucléés. Ainsi, les FRC situées dans les zones richement vascularisées de la zone T et de la médulla, à proximité des plasmablastes et plasmocytes, produisent du CCL2 responsable du recrutement de monocytes. Sous l'influence des FRC, ces monocytes vont réguler négativement la survie des plasmablastes et plasmocytes en produisant des espèces réactive de l'oxygène (ROS) de manière NOX2 (NADPH oxydase 2) dépendante⁷³⁹.

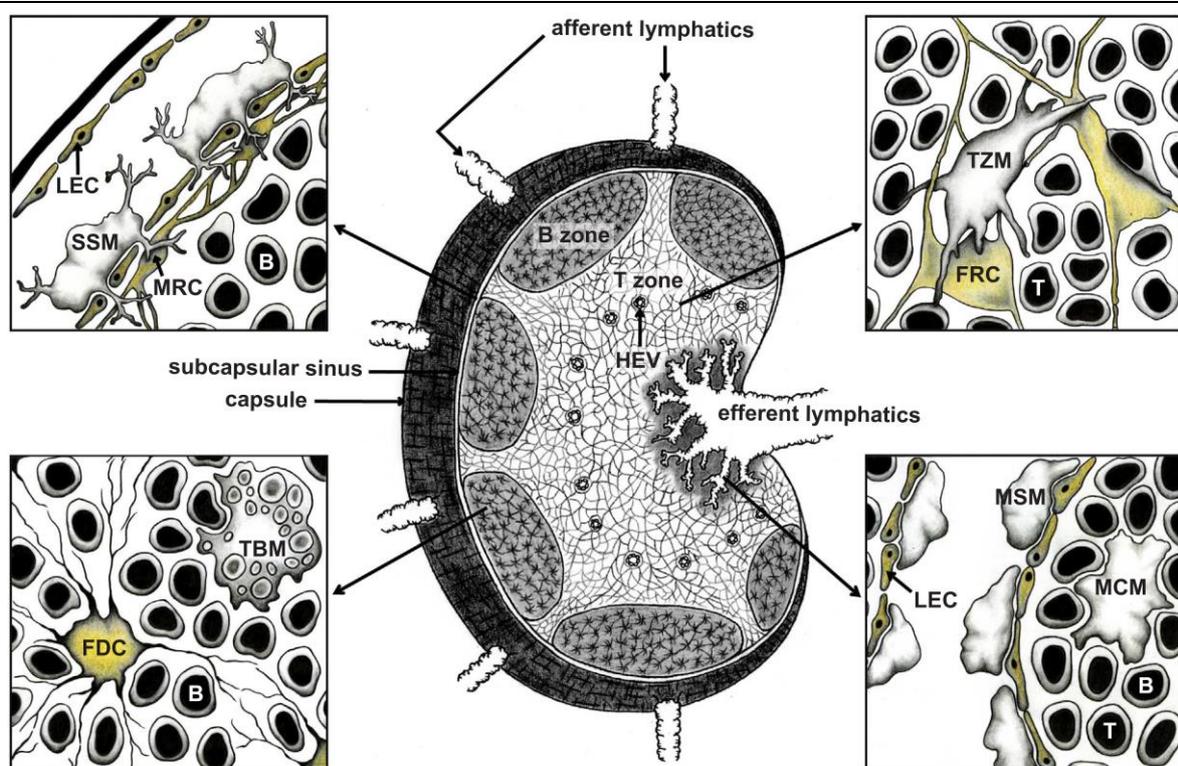


Figure 20 | Niches microanatomiques des macrophages ganglionnaires

Les macrophages du sinus sous-capsulaire (SSM – *subscapular sinus macrophages*) sont situés à proximité des cellules endothéliales lymphoïdes (LEC – *lymphoid endothelial cells*) et des cellules marginales réticulaires (MRC – *marginal reticular cells*), qui leur fourniront une niche de soutien via un dialogue tripartite. Au sein du centre germinatif riche en lymphocytes B, les macrophages à corps tingibles (TBM – *tingible body macrophages*) sont associés aux cellules folliculaires dendritiques (FDC – *follicular dendritic cells*). Les macrophages de la zone T (TZM – *T zone macrophages*) sont arrimés au réseau réticulaire formé par les cellules fibroblastiques réticulaires (FRC – *fibroblastic reticular cells*) et peuvent se situer à proximité des veinules à endothélium épais (HEV – *high endothelial veinules*). Les macrophages des sinus médullaires (MSM – *medullary sinus macrophages*) sont étroitement liés aux LEC tapissant les cordons médullaires, au sein desquels se situent les macrophages des cordons médullaires (MCM – *medullary cord macrophages*). D'après Bellomo et al., 2018⁵⁹².

Comme les autres TRM, les macrophages ganglionnaires participent à l'homéostasie tissulaire. Toutefois, du fait de leur localisation dans un organe orchestrant la réponse immune, c'est avant tout leurs fonctions immunitaires qui ont été étudiées, et leurs fonctions trophiques sont globalement moins connues⁵⁹². Pourtant, il semble bien que les macrophages ganglionnaires influencent la fonctionnalité des cellules stromales et endothéliales ganglionnaires. Ainsi, les TZM contrôlent la survie et favorise la prolifération des FRC, en produisant des facteurs de croissance de cellules stromales comme IGF-1 ou des membres de la famille des PDGF, et pourraient également réguler la contractilité des FRC conjointement avec les DC CLEC2^{pos}^{592,609}. Les TZM seraient de plus potentiellement impliqués, avec les DC, dans l'expansion vasculaire qui accompagne la croissance du ganglion au cours de la réponse immune, en stimulant la production de VEGF par les FRC^{592,683}. Les macrophages des sinus ganglionnaires pourraient être impliqués dans la régulation de la lymphangiogenèse à l'état basal et au cours de la réponse immune, en fournissant des facteurs trophiques aux LEC. En effet, des macrophages CD11b^{pos} situés au niveau du sinus sous-capsulaire produisent VEGFA, VEGFC, VEGFD lors d'une infection, et la déplétion des macrophages entraîne une diminution conséquente de la densité de vaisseaux lymphatiques dans le LN réactionnel⁷⁴⁰.

Dans le ganglion, un dialogue bidirectionnel entre cellules stromales et endothéliales d'une part, et macrophages d'autre part, permet la mise en place de niches spécifiques nécessaires au maintien et à la fonctionnalité de ces populations. Des perturbations de ces interactions pourraient survenir au sein de la niche tumorale des lymphomes B, et jouer un rôle dans la physiopathologie de ces tumeurs ganglionnaires.

3.2 Les macrophages associés aux lymphomes B

Les macrophages ont jusqu'ici été relativement peu étudiés dans le DLBCL et le FL. Néanmoins, différentes études ont mis en évidence l'intérêt pronostique et suggéré le rôle de ce compartiment tissulaire et de sa contrepartie circulante, les monocytes et MDSC, dans la physiopathologie de ces lymphomes B.

3.2.1 Aspects pronostiques et prédictifs

Du fait de leur localisation tissulaire, l'évaluation de l'intérêt pronostique des TAM de lymphome B nécessite une biopsie ganglionnaire. Le diagnostic du FL et du DLBCL reposant sur l'examen anatomo-pathologique de la biopsie tumorale, plusieurs études histologiques, mais aussi transcriptomiques, ont pu être menées à cette fin. Les monocytes et les M-MDSC, MNP circulants qui peuvent être des précurseurs de TAM, constituent des candidats biomarqueurs aisément accessibles et pourraient au moins partiellement être le reflet du compartiment myéloïde tissulaire.

3.2.1.1 Les monocytes et M-MDSC : biomarqueurs circulants et précurseurs des TAM ?

La valeur pronostique du compartiment myéloïde circulant dans le lymphome B est établie, bien que les marqueurs phénotypiques pertinents ne soient pas clairement définis et nécessitent davantage d'études approfondies ⁷⁴¹. Ainsi, une augmentation du taux de monocytes est associée à un pronostic défavorable dans le DLBCL et le FL ⁷⁴²⁻⁷⁴⁶. De manière similaire, la diminution du ratio lymphocyte/monocyte est corrélée à un mauvais pronostic dans le DLBCL ^{747,748}. Ces observations pourraient être en lien avec une augmentation des M-MDSC, les MDSC de type monocytique qui diffèrent peu des monocytes sur le plan phénotypique, comme cela a été proposé dans le DLBCL ^{742,749}. D'autres déséquilibres dans la répartition des différents sous-types de monocytes pourraient exister. En effet, si une augmentation des populations de monocytes classiques (cMo) et intermédiaires (intMo) et une diminution du nombre de monocytes non classiques (ncMo) est observée dans le DLBCL, l'accumulation de ncMo est associée à un pronostic adverse⁹⁷. Une augmentation du pourcentage de monocytes CD11b^{pos}CX3CR1^{pos} est également corrélée à un pronostic péjoratif dans le DLBCL ⁷⁵⁰.

La proportion de cellules CD14^{pos}HLA-DR^{lo/neg}, présentant un phénotype de type M-MDSC, est augmentée dans le sang périphérique des patients atteints de FL et de DLBCL, et corrélée à l'agressivité de la maladie et à un pronostic péjoratif ^{742,746,749,751-753}. Dans le DLBCL, cette augmentation du nombre de M-MDSC pourrait être évaluée à l'aide du marqueur S100A9 ⁷⁴¹.

Les monocytes et M-MDSC peuvent migrer aux tissus pour se différencier en macrophages. Dans les lymphomes B, les liens entre les compartiments myéloïdes circulant et tissulaire n'ont été que peu étudiés, mais il semble bien que ces deux populations puissent être corrélées et que les MNP circulants puissent migrer à la tumeur. Dans le DLBCL, la diminution du ratio lymphocyte/monocyte dans le sang est ainsi corrélée à l'infiltration de macrophages de type M2 CD163^{pos} *in situ* ⁷⁴⁷. Le taux de monocytes circulants y est également corrélé à l'expression intratumorale de CD68 et CD163 ⁷⁵⁴. Cette association est toutefois purement corrélative et ne présage pas de la capacité des monocytes à migrer à la tumeur. *In vitro*, des monocytes conditionnés par des lignées tumorales de DLBCL sont enclins à migrer sous l'effet de CCL5 et CXCL12. Ces monocytes présentent des phénotypes similaires aux ncMo circulants et aux macrophages infiltrant le DLBCL, et pourraient donc en être les précurseurs ⁹⁷. Les lymphocytes B tumoraux de DLBCL produiraient le CCL5 médiant le recrutement sélectif des monocytes à la tumeur ^{755,756}. Dans le FL, il a été démontré que les monocytes sont recrutés via la chimiokine CCL2 qui est produite par les CAF, avant de se différencier en TAM ⁵¹⁶.

Les monocytes, et plus particulièrement les cellules myéloïdes suppressives circulantes, sont des biomarqueurs pronostiques de FL et de DLBCL, et pourraient potentiellement constituer

également des biomarqueurs prédictifs. De plus, ils constituent très probablement au moins partiellement les précurseurs des TAM de lymphome B.

3.2.1.2 Caractère pronostique et prédictif des macrophages dans le lymphome B

Des études de profils d'expression génique ont mis en évidence des signatures pronostiques associées aux MNP dans les tissus tumoraux de DLBCL et de FL ^{263,444}, et plusieurs études ont montré un lien entre l'infiltration de macrophages CD68^{pos} et/ou CD163^{pos} et le pronostic de ces lymphomes B ^{446-448,450,451,747,747,754,757-766}. Ces différentes études montrent toutefois des résultats parfois contradictoires, pouvant varier en fonction des traitements (en particulier avant et après l'introduction du rituximab) et des marqueurs phénotypiques (notamment de type pan-macrophage ou M2) utilisés. Ces discordances illustrent la plasticité et le rôle ambivalent des TAM, ainsi que leur implication dans la réponse thérapeutique.

Dans l'ère pré-rituximab, une analyse de profils d'expression génique incluant 191 patients atteints de FL a défini deux signatures permettant de distinguer deux groupes de patients aux pronostics opposés. La première signature, enrichie en gènes associés aux lymphocytes T, est associée à un meilleur pronostic, tandis que la deuxième signature, enrichie en gènes associés aux macrophages et aux FDC, est associée à un pronostic défavorable ⁴⁴⁴. L'évaluation du nombre de TAM par un marquage CD68 en immunohistochimie (IHC) sur biopsie tumorale donne des résultats similaires ^{446,447}. Ce rôle pronostic défavorable des TAM a été remis en cause avec l'introduction du rituximab dans le traitement du FL, les TAM ont alors été décrits comme de bon pronostic ^{446,451}. Une étude portant sur deux cohortes de patients traités soit par un protocole R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) soit par une combinaison R-CVP (rituximab, cyclophosphamide, vincristine et prednisone) a montré que le nombre de TAM CD163^{pos} était associé à un bon pronostic dans le groupe R-CHOP mais à un mauvais pronostic dans le groupe R-CVP ⁴⁴⁸, soulignant l'implication des traitements dans le caractère pronostique des TAM et leur potentiel rôle prédictif. L'association de l'infiltration de TAM CD163^{pos} à un bon pronostic chez les patients atteints de FL traités par R-CHOP est toutefois discutée ⁴⁵⁰, d'autant plus que l'infiltration en TAM CD68^{pos}CD163^{pos} augmente avec le stade de la maladie ⁷⁶⁷. Le caractère pronostique des TAM dans le FL peut dépendre des marqueurs utilisés, mais également de leur localisation, et du microenvironnement tumoral global. Ainsi, l'infiltration de TAM CD68^{pos}PDL1^{pos} intrafolliculaires est associée à une transformation plus précoce du FL ⁷⁶⁸. Les TAM CD14^{pos}SIRP α ^{hi} sont eux associés à une survie inférieure ⁷⁶⁹. Des niveaux élevés de CSF1R, pouvant refléter le contenu en TAM, sont retrouvés dans les grades histologiques les plus élevés et indiquent un risque augmenté de transformation du FL ⁷⁷⁰. L'augmentation de TAM exprimant SIRP α et/ou CSFR1 sont de plus prédictifs de la réponse au lénalidomide associé au rituximab ⁷⁷¹. A contrario, une faible infiltration de cellules immunitaires, correspondant à un

microenvironnement tumoral « froid », est associée à une progression plus rapide du FL sous immunochimiothérapie, même si le nombre de TAM CD68^{pos}PDL2^{pos} est faible ⁷⁷².

L'intérêt pronostique des TAM dans le DLBCL a été souligné, comme dans le FL, par des analyses de profils d'expression génique. Les signatures stromal-1 (enrichie en gènes associés à la MEC et aux macrophages) et stromal-2 (enrichie en gènes associés à l'angiogenèse) définissent deux groupes de patients présentant respectivement un meilleur et un moins bon pronostic, qu'ils soient traités par chimio- ou immunochimiothérapie ²⁶³. Si les TAM semblent être globalement liés à un bon pronostic dans cette étude, le contenu en macrophages CD68^{pos} (évalué en IHC ou au niveau transcriptomique) serait corrélé à un bon pronostic en cas d'adjonction de rituximab mais serait plutôt de pronostic péjoratif chez les patients traités par chimiothérapie seule ^{757,763,764}. Un taux élevé de TAM CD163^{pos} ou un ratio CD163/CD68 élevé, reflétant une polarisation de type M2, pourrait être associé à un pronostic défavorable chez les patients traités par R-CHOP ^{747,754,758,760,763,765}. Cependant, le statut pronostique de l'infiltration de TAM exprimant CD68 et/ou CD163 reste sujet à débat à l'ère du rituximab, les différentes études réalisées n'étant pas toujours concordantes ^{474,747,754,758-766}. Ces apparentes contradictions pourraient dépendre des marqueurs et anticorps utilisés pour l'IHC, des méthodes de comptage (manuelles ou automatisées, taille des sections), des seuils choisis, et bien entendu des traitements reçus par les patients ^{773,774}. Une récente méta-analyse présente cependant le ratio de TAM CD163/CD68 comme le facteur pronostic le plus discriminant dans le DLBCL et le FL ⁷⁷⁵. Outre les classiques CD68 et CD163, d'autres marqueurs de TAM ont également été étudiés dans le DLBCL. Comme dans le FL, une infiltration de TAM SIRP α^{hi} est associée à un pronostic adverse dans le DLBCL ⁷⁷⁶. L'expression de SPARC dans le microenvironnement tumoral est corrélée à une survie prolongée des patients atteints de DLBCL de type ABC, mais les TAM pourraient ne pas être les seules cellules exprimant cette protéine ⁷⁶². Le caractère pronostique des TAM de DLBCL pourrait dépendre du microenvironnement global. En effet, une étude récente ne montre pas de rôle pronostique du nombre de macrophages dans le DLBCL de façon globale, mais met en évidence deux sous-groupes de patients présentant un TME « chaud », infiltré par de nombreux lymphocytes T, avec des pronostics opposés. Parmi ces patients, ceux présentant un ratio T/TAM élevé ont un pronostic plus favorable que ceux présentant un ratio plus faible. De plus, les patients présentant un TME infiltré et une forte proportion de TAM CD163^{pos}PDL1^{pos}TIM3^{pos} ont un pronostic défavorable ⁷⁷⁷. Pour autant, les TAM PDL1^{pos} ne seraient pas associés à un pronostic péjoratif ⁴⁸³.

En définitive, si le rôle pronostique des TAM est indéniable dans le FL comme dans le DLBCL, il reste imparfaitement défini et dépend des approches utilisées et des traitements administrés aux patients. Cela souligne l'intérêt de mieux comprendre les rôles des TAM dans la physiopathologie et dans la réponse aux traitements des lymphomes B.

3.2.2 Aspects physiopathologiques

3.2.2.1 Compartiment circulant

Si le rôle pronostique des M-MDSC est établi dans les lymphomes B, les mécanismes immunosuppresseurs mis en jeu dans ces pathologies ne sont pas clairement élucidés^{741,778}. Puisque la caractérisation des MDSC repose classiquement sur des tests fonctionnels, il existe toutefois quelques données sur leur fonctionnalité dans les lymphomes B. Dans le modèle murin de lymphome B agressif A20, les MDSC agissent comme des APC tolérogènes capables d'induire des lymphocytes T CD4 régulateurs en leur présentant des antigènes tumoraux et en produisant de l'arginase 1 (Arg1)⁴⁸⁶. De plus, elles inhibent la prolifération des lymphocytes T CD8 via la production d'Arg1 et de NO⁴⁸⁶. Ces travaux ne distinguent néanmoins pas les M-MDSC des PMN-MDSC, et les effets fonctionnels décrits pourraient donc ne pas dépendre des M-MDSC. Le rôle d'Arg1 dans l'immunosuppression médiée spécifiquement par les M-MDSC a été mis en évidence dans ce même modèle A20, où une augmentation de l'expression du microARN miR-30a conduit à une diminution de l'ARN messager SOCS3 et à l'activation de la voie kinase Janus/STAT3⁷⁷⁹. De la même manière, les monocytes de patients atteints de DLBCL ou de FL inhibent la prolifération des lymphocytes T *in vitro*⁷⁵². Cet effet immunosuppresseur est au moins partiellement médié par les M-MDSC^{749,753,780}. Les mécanismes impliqués pourraient inclure la production d'IL-10 par les M-MDSC^{749,781}, mais l'IL-10 sérique pourrait aussi être produit par les cellules lymphomateuses et contribuer à l'augmentation du nombre de M-MDSC⁷⁸⁰. Le rôle de l'ARG1 dans l'activité immunosuppressive des M-MDSC de patients atteints de lymphome B est débattu^{749,751,752}. L'expression de S100A12 et de PD-L1 par les M-MDSC a été montrée dans le DLBCL⁷⁴⁹. Enfin, des monocytes CD163^{pos}PD-L1^{pos} sont retrouvés dans le sang de patients atteints de DLBCL, et pourraient notamment contribuer à inhiber les lymphocytes NK circulants⁷⁸².

Dans le FL et le DLBCL, les M-MDSC participent à l'immunosuppression systémique et pourraient être impliquées dans l'immunosuppression *in situ* en migrant au ganglion tumoral.

3.2.2.2 Soutien direct aux cellules malignes de lymphome B *in situ*

Une des fonctions anti-tumorales essentielle des TAM est la phagocytose des cellules malignes. Différents mécanismes permettent aux cellules tumorales d'échapper à la phagocytose, dont le plus connu est probablement l'expression du signal *don't eat me* CD47. Dans le DLBCL comme dans le FL, les lymphocytes B tumoraux expriment davantage CD47 que leur contrepartie normale, et un haut niveau d'expression est corrélé à un pronostic défavorable chez les patients traités par R-CHOP^{484,776}. La liaison du CD47 avec SIRPα exprimé par les TAM inhibe la phagocytose des cellules tumorales. Il a été montré qu'une forte expression de SIRPα par les TAM de DLBCL et de FL est également associée à un pronostic adverse^{769,776}. Les TAM SIRPα^{hi} de FL seraient plus mobiles, immunosuppresseurs, et présenteraient des capacités de phagocytose

conservées par rapport aux TAM SIRP α^{neg} ⁷⁶⁹. Les cellules malignes de FL seraient donc préservées de la phagocytose soit via l'expression de CD47 soit par l'incapacité des TAM à les phagocyter. Un autre signal *don't eat me*, le CD24, peut être exprimé par les cellules tumorales et se lier à Siglec-10 pouvant être exprimé par les TAM. Dans le DLBCL, les niveaux d'expression de CD24 et CD47 sont inversement corrélés ²²⁸, ce qui suggère l'existence de différents mécanismes anti-phagocytaires mutuellement exclusifs, restant à explorer.

La phagocytose de cellules lymphomateuses apoptotiques pourrait modifier le phénotype de TAM de FL et DLBCL. comme cela a été dans un modèle murin de lymphome de Burkitt, où les TAM acquièrent alors un phénotype de type M2 et sont impliqués dans l'élimination sélective des lymphocytes B tumoraux apoptotiques, favorisent la croissance tumorale et sont associés à un pronostic défavorable ⁷⁸³. *In vitro*, les TAM de DLBCL soutiennent la survie et la prolifération des lymphocytes B tumoraux, au moins via la production de BAFF et APRIL ⁷⁵⁶. Les lymphocytes B tumoraux de FL sont dépendants d'une niche tumorale leur fournissant des signaux de survie. Les TAM participent à cette niche via différents mécanismes. L'expression et la transpréentation d'IL-15 aux B tumoraux par les TAM de FL favorise la prolifération tumorale ⁵⁶². De plus, les TAM de FL surexpriment en surface DC-SIGN, qui entraîne une activation chronique du BCR N-glycosylé des lymphocytes B de FL, nécessaire à leur survie ^{434,435}. Cette activation chronique et non spécifique est de faible intensité et n'entraîne pas d'internalisation du BCR ⁴³⁵, mais elle obère la capacité de l'IgM de surface à répondre à un signal ultérieur, en particulier induit par la liaison d'un antigène, maintenant le lymphocyte B tumoral dans un état de paralysie partielle ⁷⁸⁴. Ce même mécanisme de soutien de TAM DC-SIGN^{pos} aux lymphocytes B tumoraux porteurs d'une IgM de surface N-glycosylée a été décrit chez 50% des patients atteints de DLBCL de type GC mais est absent dans le DLBCL de type ABC ⁷⁸⁵. Au sein du groupe DLBCL de type GC, les tumeurs présentant ces caractéristiques seraient plus agressives ⁷⁸⁵.

3.2.2.3 Activités protumorales indirectes *in situ*

Les TAM de FL et de DLBCL ont peu été étudiés sur le plan fonctionnel. Toutefois, les propriétés immunosuppressives des TAM issus de patients atteints de FL et de DLBCL ont été récemment établies ^{769,782}. Dans le FL, les TAM CD14^{pos}SIRP α^{hi} , dont l'abondance est corrélée à un pronostic péjoratif, inhibent la prolifération T ⁷⁶⁹. Leur capacité de migration et leur expression de CD14 suggère leur origine monocyttaire et leur recrutement récent à la tumeur. Dans le DLBCL, il a été démontré que des TAM PDL1^{pos}PDL2^{pos} inhibent l'activité de lymphocytes NK PD1^{pos}, et que cet effet immunosuppressif peut être levé par le blocage de PD1. Néanmoins, ce mécanisme semble plus prononcé dans le lymphome de Hodgkin, ce qui pourrait en partie expliquer la meilleure efficacité des thérapies de blocage des points de contrôle dans cette pathologie ⁷⁸². Il a également été proposé que des TAM CD163^{pos}PDL1^{pos}TIM3^{pos} présentent des propriétés immunosuppressives dans le DLBCL, où leur présence dans les tumeurs infiltrées par des

lymphocytes T grève le pronostic. Ces TAM PDL1^{pos} se situent préférentiellement à proximité des lymphocytes T, qu'ils pourraient inhiber par des interactions via les points de contrôle immunitaires, mais cela reste à démontrer formellement sur le plan fonctionnel ⁷⁷⁷. Les cellules stromales de FL recrutent via CCL2 et polarisent les monocytes, leur faisant acquérir un phénotype de TAM sous-exprimant TNF et surexprimant IL-10, VEGFA, et PGF, ce qui leur conférerait des propriétés immunosuppressives et pro-angiogéniques ⁵¹⁶. Il a en effet été montré dans cette pathologie qu'une infiltration de TAM CD163^{pos} était corrélée à une augmentation de la microvascularisation dans la zone interfolliculaire et à un mauvais pronostic ⁷⁸⁶. Le rôle des TAM dans la promotion de la néoangiogenèse dans le lymphome B est discuté dans le DLBCL, où l'augmentation de la microvascularisation est corrélée aux mastocytes mais pas aux TAM CD68^{pos} ⁷⁶¹. En revanche, dans un modèle murin de xéno-greffe de DLBCL, des TAM de type M2 présentent des propriétés pro-angiogéniques et de remodelage matriciel via la production de légumine, dont l'inhibition obère l'angiogenèse, la production de collagène et la croissance tumorale ⁴⁸⁵. De plus, les TAM CD163^{pos} de DLBCL expriment VEGFA au niveau transcriptomique ⁷⁵⁵. L'utilisation de marqueurs de TAM choisis pourrait permettre de mieux évaluer l'implication des TAM de lymphomes B dans la néoangiogenèse.

Des travaux récents ont abordé l'hétérogénéité des TAM de FL et de DLBCL par des approches à l'échelle de la cellule unique, mettant en relief la diversité de ces cellules et de leurs potentielles fonctions anti-tumorales ^{755,787}. Une approche par cytométrie de masse a permis de mettre en évidence six populations de macrophages coexistant, avec des proportions variables, au sein des ganglions de patients atteints de FL, DLBCL, lymphome de Hodgkin, et les donneurs sains ⁷⁸⁷. Dans cette étude, les TAM de FL se distinguent par une forte expression du récepteur au mannose CD206, marqueur M1, de la molécule de co-stimulation CD86, marqueur M2, mais aussi de PDL1. Les TAM de DLBCL présente de hauts niveaux d'expression du récepteur *scavenger* et marqueur M2 CD163, ainsi que du récepteur au fragment Fc des IgG et marqueur M1 CD64. Ils expriment également fortement CCR2 et le marqueur emblématique de M-MDSC S100A9 ^{741,788}, ce qui pourrait être lié à leur recrutement récent à la tumeur. Sur le plan transcriptomique, la plupart des TAM de DLBCL présentent des signatures non canoniques, combinant des gènes associés aux macrophages de type M1 et M2 ⁷⁵⁵. *In fine*, ces données soulignent la nécessité de multiplier les marqueurs de macrophages et l'intérêt des approches à l'échelle de la cellule unique pour étudier les TAM de lymphomes B à la recherche de pistes pronostiques et fonctionnelles.

3.2.3 Implication des macrophages de lymphomes B en thérapeutique

À l'instar des TAM de tumeurs solides, les TAM de lymphomes B peuvent jouer des rôles contradictoires dans la réponse au traitement : ils peuvent agir comme auxiliaires thérapeutiques

ou bien être impliqués dans la résistance au traitement. Les TAM peuvent aussi être ciblés par les thérapeutiques anti-cancéreuses.

Le rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20 ciblant les lymphocytes B, a révolutionné la prise en charge des patients atteints de FL et de DLBCL. Son introduction a changé le rôle pronostique des TAM dans ces pathologies : ils ont troqué un statut plutôt péjoratif pour un statut favorable. Cela est probablement lié au rôle des macrophages dans l'ADCP des cellules tumorales ciblées par le rituximab. En effet, après sa liaison au CD20 des lymphocytes B, le rituximab ne s'internalise pas et exerce son action thérapeutique via trois grands mécanismes : l'induction d'une signalisation intracellulaire induisant la mort cellulaire, l'activation du complément, l'ADCP et l'ADCC ⁷⁸⁹. La contribution de ces mécanismes à l'efficacité *in vivo* du rituximab est débattue, mais il a été montré que les macrophages étaient indispensables à l'élimination des cellules lymphomateuses ciblées par le rituximab via leurs récepteurs aux fragments Fc des anticorps, les FcγR ^{790,791}. De plus, les polymorphismes des FcγR modulant leur affinité aux sous-classes d'IgG affectent l'efficacité du rituximab⁷⁹². Ces constatations ont conduit à tester l'association d'un traitement par GM-CSF au rituximab, afin d'augmenter le nombre de TAM, notamment chez les patients présentant des tumeurs peu riches en TAM, avec des résultats prometteurs restant à confirmer ⁷⁹³. Si la présence de TAM paraît donc nécessaire à l'efficacité du traitement, leur statut d'activation pourrait également jouer un rôle. Ainsi, *in vitro*, les macrophages de type M2 sont deux à trois fois plus efficaces que les macrophages de type M1 pour phagocyter les cibles opsonisées par le rituximab, possiblement en lien avec leur forte expression de CD32a/FcγRIIa ⁷⁹⁴. De la même manière, les TAM de FL CD14^{pos}SIRPα^{hi} sont plus enclins à phagocyter les cellules tumorales que les TAM CD14^{neg}SIRPα^{lo} et CD14^{neg}SIRPα^{neg} sous l'action combinée du rituximab et d'un SIRPα-Fc ⁷⁶⁹. Des traitements ciblant les TAM pourraient potentialiser l'effet du rituximab dans le FL et le DLBCL.

Un anticorps ciblant un autre épitope du CD20 et glycosylé, l'obinutuzumab, a été développé dans le but de présenter moins de toxicité liée à l'activation du complément et une plus grande ADCC et ADCP par rapport au rituximab ^{795,796}. Bien qu'il semble plus efficace que le rituximab, prolongeant la survie sans progression des patients atteints de FL, il présente d'importants effets secondaires possiblement liées à l'ADCC augmentée ³⁷⁴. *In vitro*, l'obinutuzumab présente en effet plus d'affinité pour CD16a/FcγRIIIa, et les macrophages montrent des capacités d'ADCP et d'ADCC supérieures avec cet anticorps par rapport à d'autres anti-CD20 ⁷⁹⁷. Comme pour le rituximab, des thérapies adjuvantes permettant de moduler l'activation des TAM ou de lever des freins à la phagocytose des cellules malignes pourraient être intéressantes. Ainsi, dans des modèles précliniques de lymphomes B, l'utilisation d'un anticorps bispécifique ciblant CD20 et CD47 en association avec l'obinutuzumab augmente l'ADCP des TAM ⁷⁹⁸, et la combinaison obinutuzumab – agoniste TLR7 favorise l'ADCP et la survie ⁷⁹⁹.

Le traitement de choix du FL et du DLBCL est actuellement le protocole R-CHOP, associant le rituximab à une chimiothérapie combinant cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine (Oncovin) et prednisone. La chimiothérapie peut influencer et être influencée par les TAM, et certains de ces effets ont été décrits dans le FL et le DLBCL. L'efficacité du cyclophosphamide à haute dose dans un modèle murin de xénogreffe de DLBCL double-hit repose sur l'induction de macrophages « superphagocytaires » capables d'éliminer les cellules tumorales en présence d'alemtuzumab, un anti-CD52, un effet qui n'est pas retrouvé avec la doxorubicine. Le cyclophosphamide induit un stress du réticulum endoplasmique à l'origine de la production de VEGFA par les cellules tumorales, qui va médier un recrutement massif de TAM CD36^{pos} présentant des capacités de phagocytose augmentées ⁸⁰⁰. L'activité de la doxorubicine reposerait au moins partiellement sur les TAM. En effet, l'efficacité de la doxorubicine, qui épargne les macrophages mais atteint la majorité des lymphocytes, serait liée à une augmentation de l'immunogénicité de la tumeur et à l'activation des TAM dans un modèle murin de lymphome B ^{801,802}. La synergie de la doxorubicine et de la vincristine induit l'expression de chimiokines pro-inflammatoires, notamment IL-1b, IL-6, CXCL1, par les macrophages, via l'activation de l'inflammasome NLRP3 ⁸⁰³. Cette modulation du phénotype des TAM pourrait être impliquée dans les effets indésirables de la chimiothérapie, mais aussi dans la réponse au traitement.

Les FL de bas grade peuvent être traités par radiothérapie. La radiothérapie va induire la dégradation de l'ADN des cellules lymphomateuses et le relargage de DAMP qui pourront être reconnus par les macrophages et les activer. Il a été montré par des études de profils d'expression génique avant et après traitement que les faibles doses d'irradiation utilisées dans le FL induisent chez les patients un phénotype anti-tumoral des TAM, avec l'expression de gènes associés à l'activation et la phagocytose comme TLR4, STAT1, C1QA/B, et APOE, sans qu'un nombre augmenté de TAM soit retrouvé en IHC ⁸⁰⁴.

Les traitements innovants testés avec plus ou moins de succès dans le FL et le DLBCL peuvent mettre en jeu les TAM. Le lénalidomide, qui pourrait remplacer la chimiothérapie dans le FL et le DLBCL, est un agent immunomodulateur aux mécanismes d'action encore incomplètement élucidés, notamment son impact sur les TAM. Il a été montré dans le myélome multiple que le lénalidomide, associé au rituximab, favorise l'ADCC et l'ADCP des TAM via la régulation de la voie de la vitamine D ⁸⁰⁵. Dans un modèle murin de DLBCL, le lénalidomide augmente les capacités d'élimination des cellules tumorales opsonisées par le rituximab par les TAM ⁸⁰⁶. Les inhibiteurs de BTK ont été testés dans les lymphomes B pour contrer l'activation constitutive du BCR impliquée dans la tumorigenèse. Ces molécules ont également un effet direct sur les TAM, dont elles inhibent *in vitro* la sécrétion de chimiokines pro-tumorales et pro-angiogéniques comme CXCL12, CXCL13, CCL19, et VEGF. Par conséquent, le surnageant de TAM traités par ibrutinib compromet les capacités d'adhésion, d'invasion et de migration de lignées de DLBCL, ainsi que la

formation de structures vasculaires par les cellules endothéliales⁸⁰⁷. Par ailleurs, il a été montré que les MDSC humaines et murines expriment la BTK, et peuvent être inhibées par l'ibrutinib⁸⁰⁸. L'implication de ce mécanisme d'action de l'ibrutinib dans les lymphomes B reste à démontrer. L'ibrutinib pourrait aussi inhiber la production de CSF1 et d'IL-10 par les cellules lymphomateuses, compromettant le recrutement et la polarisation de TAM de type M2 soutenant la tumeur, comme cela a été montré dans le lymphome du manteau⁸⁰⁹. Les inhibiteurs de la PI3K, une autre voie constitutivement activée dans ces lymphomes, ont montré des résultats prometteurs dans le FL, plus mitigés dans le DLBCL. Il a été montré dans des modèles murins que la signalisation PI3K γ , via CEBPB (*CCAAT/enhancer-binding protein beta*), inhibe la fonction phagocytaire des TAM²¹¹. Par conséquent, l'inhibition de la PI3K γ provoque un switch de la polarisation des TAM de type M2 vers un phénotype M1, ce qui a été confirmé dans plusieurs modèles précliniques de lymphome B^{810,811}. Bien que l'expression constitutive de BCL2 soit emblématique du FL, les inhibiteurs de BCL2 ont montré une efficacité limitée dans cette pathologie, tout comme dans le DLBCL. Cela pourrait être lié à un effet protecteur du microenvironnement, et notamment des TAM, vis-à-vis de la dépendance à BCL2. Ainsi, *in vitro*, la co-culture de cellules tumorales de FL avec des macrophages augmente leur dépendance à BFL1 (*BCL-2-related protein A1*) et limite leur sensibilité au venetoclax. De manière intéressante, l'ajout d'idelalisib diminue l'expression de BFL1 par les cellules malignes de FL et restaure l'efficacité du venetoclax⁵⁴⁸. Le venetoclax pourrait en outre potentialiser l'effet des anticorps ciblant les antigènes tumoraux CD20, CD19 ou CD38 en augmentant l'ADCP des macrophages⁸¹². Les traitements actuellement testés dans le FL et le DLBCL influencent le phénotype des TAM, soulignant l'intérêt de mieux connaître les mécanismes pro- et anti-tumoraux médiés par ces derniers.

Les TAM de lymphomes B sont aussi des cibles thérapeutiques. Le blocage de l'interaction CD47-SIRP α , qui inhibe la phagocytose des cellules tumorales par les TAM, est une voie thérapeutique prometteuse dans de nombreuses tumeurs solides, mais aussi dans les lymphomes B. *In vitro*, la combinaison du rituximab et d'un anti-CD47 ou d'un SIRP α -Fc potentialise l'effet anti-tumoral induit par ces deux traitements isolément, en augmentant la phagocytose de cellules malignes de FL par les TAM, en particulier les TAM SIRP α^{hi} hautement phagocytaires^{484,769}. Les anticorps anti-CD47 ont montré leur efficacité en association avec le rituximab dans des modèles précliniques de FL, où leur effet est indépendant du complément et des lymphocytes NK, mais dépendant des macrophages⁴⁸⁴. Des résultats encourageants ont également été obtenus chez l'humain dans le FL et le DLBCL pour les anticorps anti-CD47 et différentes protéines de fusion ciblant l'interaction^{301,813,814}. Au vu des expressions inversement corrélées des signaux inhibiteurs de phagocytose CD47 et CD24 dans le DLBCL, il pourrait être utile de proposer des traitements bloquant ces interactions inhibitrices à des patients sélectionnés²²⁸. Pour finir, les macrophages

peuvent également être modifiés génétiquement pour exprimer des CAR ciblant la tumeur. Des macrophages induits à partir de cellules souches pluripotentes et exprimant un CAR ciblant CD19, appelé CAR-I Mac, ont ainsi été développés ; ils acquièrent des fonctions de type M1 lors de la liaison à leur cible et présentent des capacités de phagocytose des cellules tumorales augmentées.

Les TAM sont des acteurs majeurs de la niche du FL et du DLBCL, mais ils restent encore relativement méconnus. Les technologies récentes qui permettent d'étudier le microenvironnement tumoral à l'échelle de la cellule unique sur le plan phénotypique (CyTOF) et transcriptomique (scRNASeq) sont un atout précieux pour décrypter l'hétérogénéité des TAM de lymphomes B, leurs interactions avec les autres acteurs du TME, et identifier de nouvelles pistes thérapeutiques.

Objectifs

L'implication majeure des macrophages dans le pronostic, la physiopathologie, et le traitement des lymphomes B est reconnue. Néanmoins, aucune étude n'a encore évalué l'hétérogénéité de ce compartiment dans le lymphome B diffus à grandes cellules et le lymphome folliculaire sur les versants phénotypique et transcriptomique, et les contours phénotypiques de cette population restent flous. De plus, les dérégulations du dialogue entre ces TAM et les cellules stromales et endothéliales ne sont guère connues dans le lymphome B, alors même que leurs contreparties normales cohabitent et dialoguent au sein de différentes niches dans les ganglions lymphatiques.

L'objectif de ce travail de thèse est d'abord de cartographier l'hétérogénéité des phagocytes mononucléés (monocytes, cellules dendritiques, macrophages) dans les organes lymphoïdes secondaires réactionnels et de lymphome B (DLBCL et FL), et d'établir les relations avec l'hétérogénéité des compartiments stromal et endothélial. Il s'agit ensuite d'identifier les voies dérégulées dans les MNP de lymphome B et leur impact sur le dialogue avec la niche stromale et endothéliale.

Dans ce but, des outils d'étude de haute résolution à l'échelle de la cellule unique ont été employés : la cytométrie de masse et le scRNASeq. Un important travail d'optimisation a permis la mise au point d'un panel CyTOF dédié aux compartiments myéloïde et stromal, compatible avec la dissociation mécano-enzymatique nécessaire à l'étude de ces cellules. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans une revue méthodologique (Résultats 1). Par la suite, la situation conjoncturelle liée à la pandémie de Covid-19 entraînant une interruption des expérimentations a été mise à profit pour écrire un article *perspective* (Annexe 1) et tester un certain nombre d'outils bio-informatiques pour l'analyse multidimensionnelle des données de CyTOF. Ce travail a permis l'établissement d'un *pipeline* d'analyse qui a été appliqué à des données obtenues à l'aide du panel CyTOF myéloïde/stroma, ainsi qu'à un deuxième panel lymphoïde mis en place en parallèle du premier, et générées dans le cadre d'une étude ancillaire d'une étude menée sur la Covid-19 par les réanimateurs rennais (Annexe 2). Ce *pipeline* d'analyse de données CyTOF a ensuite été appliqué, avec quelques ajustements, à mon travail de thèse (Résultats 2).

Résultats 1 – Phénotypage haute résolution des cellules suppressives d'origine myéloïde et macrophages associés aux tumeurs de tissu humain par cytométrie de masse

High-Dimensional Phenotyping of Human Myeloid-Derived Suppressor Cells/Tumor-Associated Macrophages in Tissue by Mass Cytometry

Juliette Ferrant, Simon Le Gallou, Guillaume Manson, Steve Genebrier, Frederic Mourcin, Karin Tarte, et Mikael Roussel, *Methods in Molecular Biology*, 2021

Résumé : Les cellules myéloïdes régulatrices (MDSC) et les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont des cellules hétérogènes qui partagent des marqueurs myéloïdes et ne sont pas faciles à distinguer dans les tumeurs humaines en raison de l'absence de marqueurs spécifiques. Ces cellules sont un acteur majeur du microenvironnement tumoral et sont impliquées dans le pronostic et la physiopathologie de nombreuses tumeurs. Nous présentons ici un protocole permettant de caractériser ces cellules par cytométrie de masse (CyTOF).



Chapter 6

High-Dimensional Phenotyping of Human Myeloid-Derived Suppressor Cells/Tumor-Associated Macrophages in Tissue by Mass Cytometry

Juliette Ferrant, Simon Le Gallou, Guillaume Manson, Steve Genebrier, Frederic Mourcin, Karin Tarte, and Mikael Roussel

Abstract

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and tumor-associated macrophages (TAMs) are heterogeneous cells that share myeloid markers and are not easily distinguishable in human tumors due to their lack of specific markers. These cells are a major player in the tumor microenvironment and are involved in the prognosis and physiopathology of various tumors. Here is presented a scheme to decipher these cells by mass cytometry.

Key words Mass cytometry, Tumor-associated macrophages, Myeloid-derived suppressor cells, Tissue

1 Introduction

In most solid cancers—including melanoma, renal, lung, liver, or prostate cancer—the abundance of circulating myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) is correlated with tumor stage and volume, and disease prognosis [1–3]. In B cell lymphomas, an increase in circulating MDSCs is also correlated with a poor prognosis [4–7].

In mice tumors, MDSCs and tumor-associated macrophages (TAMs) coexist and MDSCs have been shown to differentiate into TAMs [8–10]. In human tissue, because of the lack of specific markers, the delineation between MDSCs and TAMs is inconsistent [11]. TAM phenotype and function have not been fully defined yet within the human B cell lymphoma microenvironment [12], and their heterogeneity has been explored with low-resolution approaches, using few markers (mostly CD68 and/or CD163 expression evaluated by immunohistochemistry) [12, 13].

High-resolution approaches such as mass cytometry (also known as cytometry by time-of-flight, or CyTOF) enhance the understanding of cellular diversity and function. CyTOF allows

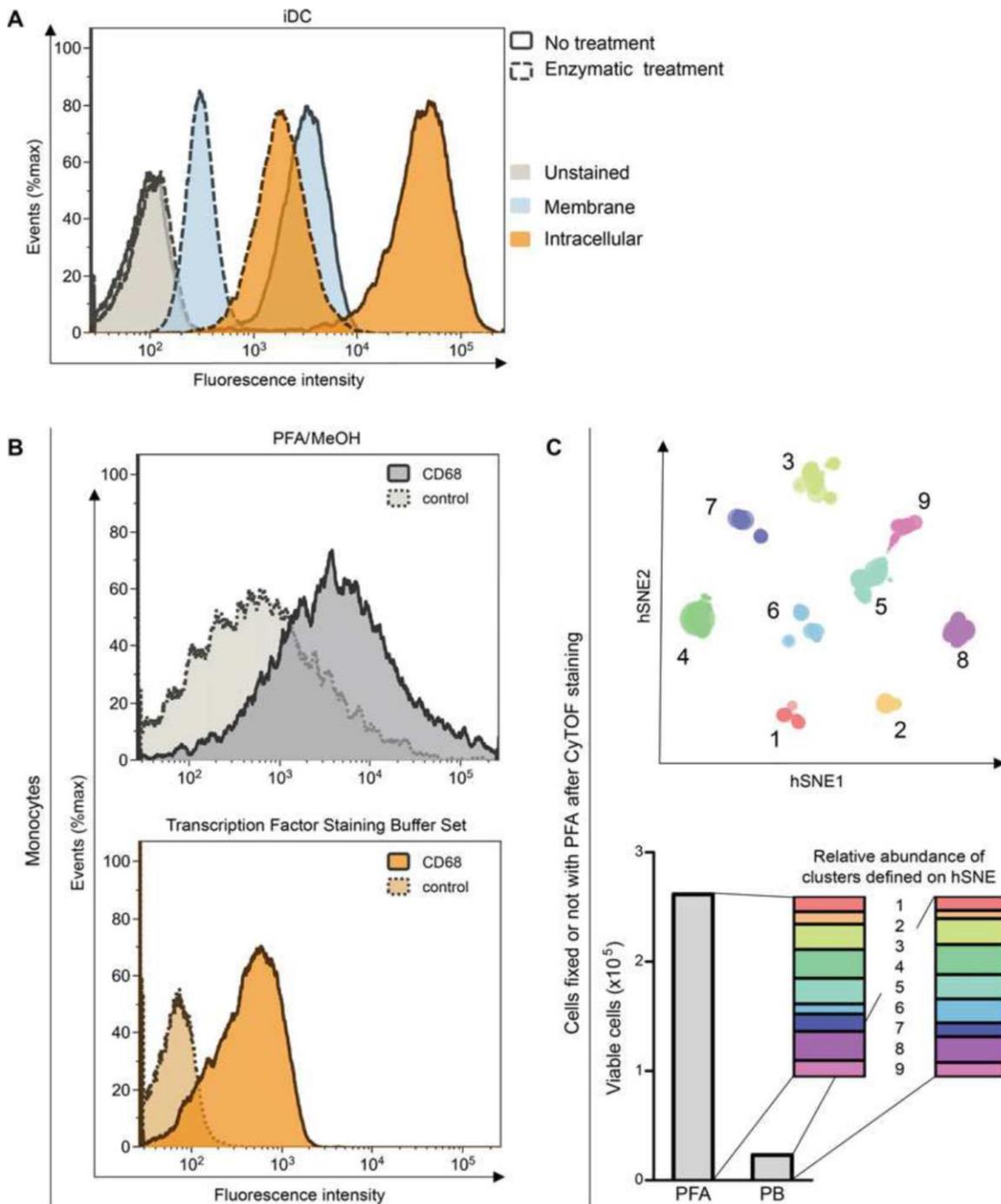


Fig. 1 Optimization steps are necessary to set up a tissular CyTOF panel. (a) Enzymatic dissociation is required to analyze myeloid cells from tissues; potential modulation of antigen expression can be prevented by cytoplasmic staining. To illustrate the relevance of intracellular staining for markers expressed on cell membrane, immature dendritic cells (iDCs) were treated (dashed line) or not (plain line) for 40 min in enzymatic dissociation buffer. Then cells were stained with a primary anti-CD209 mass antibody followed by a secondary fluorescent antibody, acquisition was performed on LSR X20 (Becton Dickinson). Membrane staining (light blue, plain line) overlaps with unstained cells after enzymatic dissociation (light blue, dashed line). The expression can be restored by intracellular staining (orange, dashed line). (b) Signal-to-noise ratio

the analysis of around 40 protein expression at the single cell level, thus enabling the exploration of the highly heterogeneous myeloid compartment. Recently, myeloid cell populations (including dendritic cells, monocytes, and TAMs) were deciphered by mass cytometry in human healthy and tumor tissues from renal and lung carcinomas [14–18]. Additionally, a monocyte subset ($CD14^{pos}CD16^{neg}HLA-DR^{high}$) identified by mass cytometry was predictive of the response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma [19]. Using mass cytometry to characterize B cell lymphoma tumors and nonmalignant human tissues, we recently identified phenotypically distinct intra-tumor macrophage subsets based on abnormal marker expression profiles. Interestingly, these discrete myeloid cell subsets were associated with lymphoma tumor types [20].

Here we provide a protocol to characterize myeloid cells, including MDSCs and TAMs, from lymph nodes and tonsils. We particularly focus on (1) the specificity of the tissue dissociation technique for an optimal recovery of viable myeloid cells (Fig. 1a) and (2) the optimization of the fixation and permeabilization protocol (Fig. 1b, c). Finally, reactive secondary lymphoid organs and lymphoma tissues were analyzed by mass cytometry to characterize the myeloid compartment phenotype (Fig. 2).

2 Material

2.1 Tissue Preparation

1. Depletion buffer: 1% Human serum albumin (HSA), 5 mM $MgCl_2$, 6.7 mg/mL sodium citrate in phosphate-buffered saline (PBS).
2. FcR blocking solution: 12.5 $\mu g/mL$ Tegeline[®] in depletion buffer (*see Note 1*).
3. Dissociation buffer: 10 U/mL DNase, 200 U/mL collagenase IV (Worthington Biochemical), 1.6 U/mL neutral protease (Worthington Biochemical), 5 mM $MgCl_2$, 1% Penicillin/Streptomycin in RPMI-1640.

Fig. 1 (continued) can be increased by modifying the fixation/permeabilization protocol. Monocytes were stained intracellularly with an anti-CD68 mass antibody followed by a secondary fluorescent antibody using two different staining protocols: PFA/methanol or Transcription Factor Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec), acquisition was performed on LSR X20 (Becton Dickinson). We observed less background and better signal-to-noise ratio with the Transcription Factor Staining Buffer Set. (c) Recovery of viable cells can be increased by modifying the fixation/permeabilization protocol. A mix of different myeloid control cell types was stained with a CyTOF panel using the Transcription Factor Staining Buffer Set, then split into two equal fractions before nucleic acid staining and final fixation with 2% PFA or with Permeabilization buffer $1 \times$ (PB) (Miltenyi Biotec). A hSNE algorithm (top) was performed with Cytosplore on 23,100 viable cells (cisplatin^{neg}) for each condition, nine clusters were identified. More viable cells were recovered with PFA whereas cluster abundance was not modified (bottom)

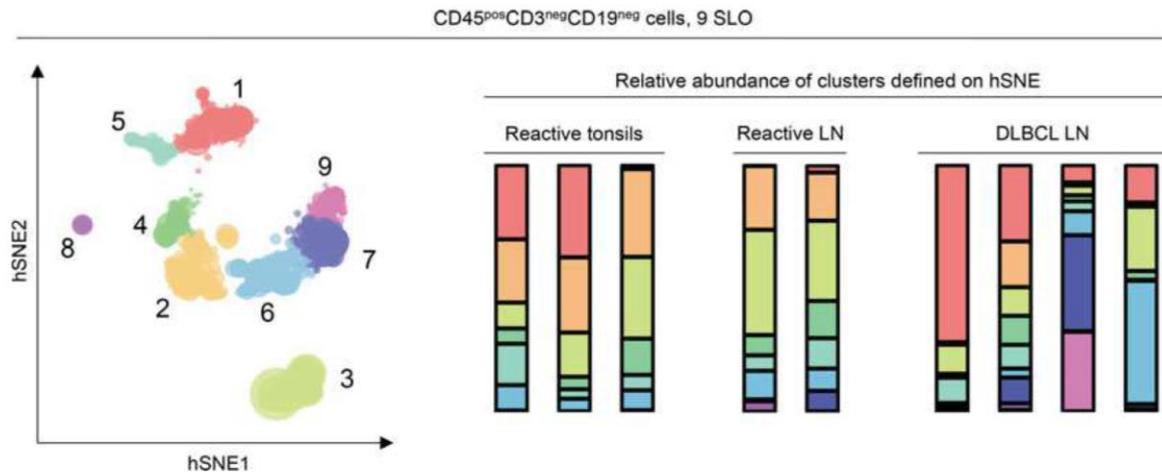


Fig. 2 High level of myeloid cell heterogeneity is detected by mass cytometry. Nine secondary lymphoid organs (SLO) from nine different donors (three reactive tonsils, two reactive lymph nodes [reactive LN], four diffuse large B cell lymphomas [DLBCL LN]) were dissociated and stained with a dedicated TAM/MDSC CyTOF panel of 37 parameters. Nine clusters were identified after hSNE (Cytosplore) performed on viable cells, CD45^{pos}, CD3^{neg}, and CD19^{neg} cells (left). The abundance of the nine clusters was assessed for each sample (right). CyTOF analysis allows the exploration of the heterogeneity of the myeloid compartment and the identification of different TAM/MDSC subpopulations, whose distribution varies depending on the organs and pathological contexts

4. GentleMACS™ dissociator (Miltenyi Biotec).
5. GentleMACS™ C tubes (Miltenyi Biotec).
6. Dry bath incubator Eppendorf ThermoMixer®.
7. Dynabeads™ anti-CD3 (Invitrogen).
8. Dynabeads™ anti-CD19 (Invitrogen).
9. DynaMag™ Magnet for depletion with magnetic beads (Invitrogen).
10. Nutating platform mixer.

2.2 Antibody Staining and Mass Cytometry

1. Metal isotope-conjugated antibodies (*see Note 2*).
2. PBS.
3. RPMI-1640 Medium.
4. Room temperature medium: RPMI-1640, 10% fetal calf serum (FCS).
5. Staining buffer (SB): 0.5% Bovine serum albumin (BSA) in PBS, filter-sterilized before use.
6. 1 mM Cisplatin Cell-ID™ (Fluidigm).
7. 500 μM Cell-ID™ Intercalator-Ir (Fluidigm)
8. DNA intercalator solution: 2.5% Paraformaldehyde (PFA), 1:3200 Cell-ID™ Intercalator-Ir in PBS.

9. Transcription Factor Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec).
10. Ultrapure water.
11. CoolCell[®] cooling device (Biocision).
12. CyTOF Calibration Beads (Fluidigm).
13. Mass cytometer (Helios[™], Fluidigm).
14. 100 µm Cell strainer.
15. Polypropylene FACS tube.

3 Methods

3.1 Tissue Preparation

3.1.1 Tissue Dissociation and FcR Blocking

1. Mince tissue samples into small fragments of about 2–3 mm³ (*see Note 3*).
2. Incubate tissue fragments in dissociation buffer (15 mL for 1 g of tissue) at 37 °C for 5 min.
3. Transfer to GentleMACS[™] C tube and mechanically disperse with GentleMACS[™] Dissociator using pre-installed program B.01 (31 s).
4. Transfer to an appropriate tube and incubate at 37 °C in an Eppendorf ThermoMixer[®] at 350 rpm for 40 min.
5. Strain with a 100 µm cell strainer.
6. Wash with depletion buffer and centrifuge for 5 min at 600 × *g* (*see Note 4*).
7. Discard supernatant.
8. Resuspend cells in 500 µL of FcR blocking solution.
9. Keep on ice for 5 min before proceeding to myeloid enrichment.

3.1.2 Myeloid Enrichment

1. Resuspend the beads in the vial by vortexing >30s.
2. According to manufacturer's recommendations, transfer the desired volume of beads (25 µL of Dynabeads[™] anti-CD3 for 1 × 10⁷ cells and 25 µL of Dynabeads[™] anti-CD19 for 2.5 × 10⁷ cells, *see Note 5*) to a new 50-mL tube.
3. Add the same amount of depletion buffer on beads and place the tube on the magnet for 1 min.
4. Discard supernatant.
5. Remove the tube from the magnet and resuspend the washed beads with the same volume of depletion buffer as the initial volume of beads.
6. Transfer washed beads with the cells previously obtained from tissue dissociation and adjust concentration to 1 × 10⁷ cells/mL by adding depletion buffer (*see Note 6*).

7. Incubate for 30 min at 4 °C with constant rocking on a nutating platform mixer.
8. Place the tube on the magnet for 2 min and then transfer supernatant to a new 50 mL Falcon tube.
9. Place this tube on the magnet for 2 additional minutes and then transfer supernatant to a new 50 mL Falcon tube.
10. Centrifuge at $600 \times g$ for 5 min and discard supernatant (*see Note 5*).
11. Resuspend in RPMI at 2×10^6 cells/mL and proceed to mass cytometry staining.

3.2 Antibody Staining

3.2.1 Prepare Staining Cocktails and Staining Reagents

1. Prepare Fixation/permeabilization Solution and Permeabilization Buffer $1 \times$ from the Transcription Factor Staining Buffer Set according to manufacturer's recommendations.
2. Prepare the appropriate quantity of surface staining cocktail in SB for the number of samples to be stained, plus 10% overage for pipetting errors. Each antibody should be previously titrated and diluted to a concentration of $100 \times$. Samples will be stained in a final volume of 100 μ L, for up to approximately 5×10^6 cells. Considering a residual volume of 40 μ L per sample tube, the antibody cocktail should be completed with SB to a final volume of 60 μ L.
3. Prepare the appropriate quantity of intracellular/intranuclear staining cocktail (*see Note 7*) in Permeabilization Buffer $1 \times$ for the number of samples to be stained, plus 10% overage for pipetting errors. Each antibody should be previously titrated and diluted to a concentration of $100 \times$. Samples will be stained in a final volume of 100 μ L, for up to approximately 5×10^6 cells. Considering a residual volume of 40 μ L per sample tube, the antibody cocktail should be completed with Permeabilization Buffer $1 \times$ to a final volume of 60 μ L.

3.2.2 Dead Cell Identification

1. Transfer the cell suspension (2×10^6 cells/mL in RPMI) to a new polypropylene FACS tube.
2. Add Cisplatin Cell-ID™ to the cell suspension for a final concentration of 0.5 μ M.
3. Vortex to mix.
4. Incubate for 5 min at room temperature.
5. Wash cells with room temperature medium.
6. Centrifuge for 5 min at $600 \times g$.
7. Invert the tube to discard supernatant, place the inverted tube on absorbent paper to remove excess liquid, and resuspend the cells in the residual volume.

- 3.2.3 *Surface Staining*
1. Add 60 μL of surface staining cocktail per tube (final volume of 100 μL).
 2. Vortex to mix.
 3. Stain for 30 min at room temperature.
 4. Wash cells with 4 mL SB.
 5. Centrifuge for 5 min at $600 \times g$.
 6. Invert the tube to discard supernatant, place the inverted tube on absorbent paper to remove excess liquid, and resuspend the cells in the residual volume.
- 3.2.4 *Cell Fixation*
1. Resuspend and fix the cells by adding the Fixation/permeabilization Solution to a final concentration of 1×10^6 cells/mL, with a maximum of 4 mL per FACS tube for up to 1×10^7 cells.
 2. Incubate for 30 min at 4 °C.
 3. Wash cells with 4 mL SB.
 4. Centrifuge for 5 min at $900 \times g$.
 5. Invert the tube to discard supernatant, place the inverted tube on absorbent paper to remove excess liquid, and resuspend the cells in the residual volume.
- 3.2.5 *Cell Permeabilization*
1. Permeabilize by adding 4 mL of Permeabilization Buffer 1 \times .
 2. Centrifuge for 5 min at $900 \times g$.
 3. Invert the tube to discard supernatant, place the inverted tube on absorbent paper to remove excess liquid, and resuspend the cells in the residual volume.
- 3.2.6 *Intracellular and Intranuclear Staining (If Required)*
1. Add 60 μL of intracellular/intranuclear staining cocktail per tube (final volume of 100 μL).
 2. Vortex to mix.
 3. Incubate for 30 min at 4 °C.
 4. Wash cells with 4 mL of Permeabilization Buffer 1 \times .
 5. Centrifuge for 5 min at $900 \times g$.
 6. Invert the tube to discard supernatant, place the inverted tube on absorbent paper to remove excess liquid, and resuspend the cells in the residual volume.
 7. Wash with 4 mL of SB.
 8. Centrifuge for 5 min at $900 \times g$.
 9. Invert the tube to discard supernatant, place the inverted tube on absorbent paper to remove excess liquid, and resuspend the cells in the residual volume.

64 Juliette Ferrant et al.

3.2.7 Staining of the Cells in DNA Intercalator Solution

1. Add 160 μL of DNA intercalator solution (*see Note 8*).
2. Vortex to mix.
3. Transfer cell suspension to cryovials (*see Note 9*).
4. Incubate overnight at 4 °C.
5. Transfer cryovials at -80 °C into a CoolCell[®] device (Biocision).
6. The next day, samples can be removed from the CoolCell[®] device and kept for weeks at -80 °C.

3.3 Running Samples on CyTOF and Data Analysis

1. Thaw samples.
2. Run samples on a CyTOF cytometer according to the manufacturer's protocol.
3. Analyze data (*see Note 10*).

4 Notes

1. Pre-conjugated antibodies can be bought from Fluidigm or antibodies from any supplier can be self-conjugated using the Fluidigm Maxpar conjugation kit.
2. Tegeline[®] is a pool of human intravenous polyclonal immunoglobulin isolated by fractionation.
3. Tissue fragments can be processed directly or cryopreserved before dissociation. If cryopreserved tissue samples are used, small tissue fragments can be transferred into cryovials containing cell cryopreservation media such as Cryostor CS10 (Sigma) and then stored in liquid nitrogen.
4. If fresh samples are processed, an erythrocyte lysis step can be added.
5. The volume of anti-CD19 beads should be doubled (i.e., 50 μL for 2.5×10^7 cells) for secondary lymphoid organs (SLO), which contain more than 10% B cells. Depending on the number of cells obtained after one step of anti-CD3 anti-CD19 depletion, a second step of depletion may be necessary.
6. If the total volume of the cell suspension is greater than 12.5 mL, the suspension should be split into several 50-mL falcon tubes for optimal agitation.
7. An enzymatic dissociation can lead to the modulation of some antigen expression; using intracellular staining can prevent this issue (*see Fig. 1a*). Using the Transcription Factor Buffer Set allows better intracellular staining for intracellular target epitopes (*see Fig. 1b*), as well as intranuclear staining in the same step.

8. With a residual volume of 40 μL , the final volume for the nucleic acid staining will be 200 μL . The cells will thus be fixed in a final concentration of 2% PFA, 1:4000 Cell-ID™ Intercalator-Ir (0.125 μM). This second fixation with PFA allows a better viable cells recovery (*see* Fig. 1c).
9. After staining, cells can be run on CyTOF or cryopreserved for further analysis.
10. High-dimensional analysis include various tools for data normalization and cleaning, dimension reduction, visualization, and cluster identification. These algorithms, scripts, or software are embedded in workflows reviewed in the following references [21–25]. As an example, we used hSNE (Hierarchical Stochastic Neighbor Embedding) from Cytosplore in Figs. 1 and 2 [26].

Acknowledgments

Juliette Ferrant is recipient of a fellowship from the FHU CAMIn (Federation Hospitalo-Universitaire Cancer Microenvironnement et Innovation). Guillaume Manson and Steve Genebrier were funded by a Master 2 fellowship from the Fondation ARC. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE15-0015 StroMAC) and Fondation ARC (PGA1 RF20190208534).

References

1. Greten TF, Manns MP, Korangy F (2011) Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol* 11:802–807. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.01.003>
2. Youn J-I, Kumar V, Collazo M et al (2013) Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat Immunol* 14:211–220. <https://doi.org/10.1038/ni.2526>
3. Montero AJ, Diaz-Montero CM, Kyriakopoulos CE et al (2012) Myeloid-derived suppressor cells in Cancer patients: a clinical perspective. *J Immunother* 35:107–115. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318242169f>
4. Marini O, Spina C, Mimiola E et al (2016) Identification of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in the peripheral blood of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients. *Oncotarget* 7:27676–27688. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8507>
5. Azzaoui I, Uhel F, Rossille D et al (2016) T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 128:1081–1092. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-662783>
6. Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA et al (2011) Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/– monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 117:872–881. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-283820>
7. Jitschin R, Braun M, Büttner M et al (2014) CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood* 124:750–760. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-546416>
8. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI (2016) The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 37:208–220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
9. Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, Bronte V (2015) Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest*

- 125:3365–3376. <https://doi.org/10.1172/JCI80006>
10. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A et al (2017) Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 14:399–416. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.217>
 11. Roussel M, Ferrell PB, Greenplate AR et al (2017) Mass cytometry deep phenotyping of human mononuclear phagocytes and myeloid-derived suppressor cells from human blood and bone marrow. *J Leukoc Biol* 102:437–447. <https://doi.org/10.1189/jlb.5MA1116-457R>
 12. Fowler NH, Cheah CY, Gascoyne RD et al (2016) Role of the tumor microenvironment in mature B-cell lymphoid malignancies. *Haematologica* 101:531–540. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.139493>
 13. Roussel M, Irish JM, Ménard C et al (2017) Regulatory myeloid cells: an underexplored continent in B-cell lymphomas. *Cancer Immunol Immunother* 66:1103–1111. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2036-5>
 14. Alcántara-Hernández M, Leylek R, Wagar LE et al (2017) High-dimensional phenotypic mapping of human dendritic cells reveals inter-individual variation and tissue specialization. *Immunity* 47:1037–1050.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.001>
 15. See P, Dutertre C-A, Chen J et al (2017) Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356:eaag3009. <https://doi.org/10.1126/science.aag3009>
 16. Sander J, Schmidt SV, Cirovic B et al (2017) Cellular differentiation of human monocytes is regulated by time-dependent Interleukin-4 signaling and the transcriptional regulator NCOR2. *Immunity* 47:1051–1066.e12. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.024>
 17. Chevrier S, Levine JH, Zanutelli VRT et al (2017) An immune atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Cell* 169:736–738.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.016>
 18. Lavin Y, Kobayashi S, Leader A et al (2017) Innate immune landscape in early lung adenocarcinoma by paired single-cell analyses. *Cell* 169:750–757.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.014>
 19. Krieg C, Nowicka M, Guglietta S et al (2018) High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Med* 9:2579–2514. <https://doi.org/10.1038/nm.4466>
 20. Roussel M, Lhomme F, Roe CE et al (2020) Mass cytometry defines distinct immune profile in germinal center B-cell lymphomas. *Cancer Immunol Immunother* 69:407–420. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02464-z>
 21. Nowicka M, Krieg C, Weber LM et al (2017) CyTOF workflow: differential discovery in high-throughput high-dimensional cytometry datasets. *F1000Res* 6:748–755. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11622.1>
 22. Diggins KE, Ferrell PB, Irish JM (2015) Methods for discovery and characterization of cell subsets in high dimensional mass cytometry data. *Methods* 82:55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.008>
 23. Kimball AK, Oko LM, Bullock BL et al (2018) A beginner's guide to analyzing and visualizing mass cytometry data. *J Immunol* 200:3–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701494>
 24. Liu X, Song W, Wong BY et al (2019) A comparison framework and guideline of clustering methods for mass cytometry data. *Genome Biol* 20:297. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1917-7>
 25. Finotello F, Rieder D, Hackl H, Trajanoski Z (2019) Next-generation computational tools for interrogating cancer immunity. *Nat Rev Genet* 20:724–746. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0166-7>
 26. van Unen V, Höllt T, Pezzotti N et al (2017) Visual analysis of mass cytometry data by hierarchical stochastic neighbour embedding reveals rare cell types. *Nat Commun* 8:1740. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01689-9>

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

Single-cell profiling identifies clinically relevant interactions between tumor associated macrophages and blood endothelial cells in diffuse large B cell lymphoma

Juliette Ferrant, Simon Le Gallou, Francine Padonou, Simon Léonard, Celine Pangault, Anne Barthel, Vincent Launay, Guillaume Manson, Benedicte Hoarau, Laurent Deleurme, Celine Monvoisin, Sylvain Baulande, Nathalie Van Acker, Camille Laurent, Francisco Llamas-Gutierrez, Henri-Alexandre Michaud, Nathalie Bonnefoy, Thierry Pecot, Karin Tarte, et Mikael Roussel, *In preparation*, 2022

Résumé : Le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), agressif, et le lymphome folliculaire (FL), indolent, sont les deux lymphomes les plus fréquents. Le microenvironnement tumoral (TME) immun et non immun joue un rôle de soutien essentiel dans ces maladies. Bien que leur implication dans le pronostic et la pathogénie des lymphomes B soit reconnu depuis plusieurs années, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) n'ont pas encore été caractérisés à l'échelle de la cellule unique dans le DLBCL et le FL. Nous explorons ici l'hétérogénéité des phagocytes mononucléés (MNP) et leur co-régulation potentielle avec le compartiment stromal et endothélial dans les ganglions lymphatiques des lymphomes B, en comparaison à des organes lymphoïdes secondaires réactionnels, par cytométrie de masse, scRNASeq et des approches *in silico*. Nous mettons en évidence une co-régulation entre les TAM et les cellules endothéliales sanguines (BEC) dans les lymphomes. Nous identifions une interaction spécifique entre les BEC exprimant ANXA1 et les monocytes/macrophages exprimant FPR1/2 dans le DLBCL, confirmée *in situ* par immunofluorescence multiplex et imagerie par cytométrie de masse. Ce dialogue est associé à un pronostic défavorable et à un TME immunosuppressif dans le DLBCL, et pourrait constituer une cible thérapeutique.

Single-cell profiling identifies clinically relevant interactions between tumor associated macrophages and blood endothelial cells in diffuse large B cell lymphoma

Juliette Ferrant,^{1,2} Simon Le Gallou,^{1,2,16} Francine Padonou,^{1,16} Simon Léonard,¹ Ilénia Papa,¹ Céline Pangault,^{1,3} Anne Barthel,⁴ Vincent Launay,⁵ Guillaume Manson,⁶ Bénédicte Hoareau,⁷ Laurent Deleurme,⁸ Céline Monvoisin,¹ Benoit Albaut,^{9,10} Nathalie Van Acker,¹¹ Camille Laurent,¹¹ Francisco Llamas-Gutierrez,¹² Henri-Alexandre Michaud,¹³ Nathalie Bonnefoy,¹³ Thierry Pécot,¹⁴ Karin Tarte,^{1,2,15,*} and Mikael Roussel^{1,2,3,17,*}

¹Unité Mixte de Recherche UMR1236, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM, Université Rennes 1, Etablissement Français du Sang Bretagne, Equipe labellisée Ligue, LabEx IGO, F-35000, Rennes, France

²Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, SITI, Pôle Biologie, F-35033, Rennes, France

³Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Laboratoire d'Hématologie, Pôle Biologie, F-35033, Rennes, France

⁴Centre Hospitalier de Bretagne Sud, Laboratoire de biologie médicale, F-56100, Lorient, France

⁵Centre Hospitalier de Saint Briec, Service d'Hématologie, F-22000, Saint Briec, France

⁶Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Service d'Hématologie, F-35033, Rennes, France

⁷Sorbonne Université, Faculté de Médecine, UMS037, PASS, Plateforme de Cytométrie de la Pitié-Salpêtrière CyPS, F-75013 Paris

⁸UMS Biosit, Flow Cytometry Facility H2P2, Université Rennes 1, INSERM, CNRS, F-35000, Rennes, France

⁹Institut Curie, PSL University, ICGex Next-Generation Sequencing Platform, F-75005, Paris, France

¹⁰Institut Curie, PSL University, Single Cell Initiative, F-75005, Paris, France

¹¹Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Imag'IN Platform IUCT, et INSERM UMR1037, F-31059, Toulouse, France

¹²Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, F-35033, Rennes, France

¹³IRCM, Université de Montpellier, INSERM, ICM, Plateforme de Cytométrie et d'Imagerie de Masse, F-34000, Montpellier, France

¹⁴Univ Rennes, CNRS, INSERM, Biosit UAR 3480 US_S 01, F-35000 Rennes, France

¹⁵Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Laboratoire d'Immunologie, Pôle Biologie, F-35033, Rennes, France

¹⁶These authors contributed equally

¹⁷Lead contact

*Correspondence to: mikael.roussel@univ-rennes1.fr (M.R.), karin.tarte@univ-rennes1.fr (K.T.)

Summary

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL) are the two most common B-cell lymphomas and are characterized by a dynamic crosstalk between tumor B cells and a heterogeneous tumor-supportive microenvironment, including immune, endothelial, and stromal components. Although their impact on the pathogenesis and prognosis of B-cell lymphoma has been acknowledged for years, tumor-associated macrophages (TAM) have not been extensively explored in DLBCL and FL. Herein, we investigate mononuclear phagocytes (MNP) heterogeneity at the single cell level and their potential co-regulation with the stromal and endothelial compartments in B-cell lymphoma lymph nodes compared to reactive secondary lymphoid organs, using a combination of mass cytometry, single cell RNA sequencing, and *in silico* approaches. We reveal a co-regulation between TAM and blood endothelial cells (BEC) in lymphoma. Moreover, we identify a specific interaction between Annexin A1 (ANXA1)-expressing BEC and formyl-peptide receptors (FPR1/2)-expressing monocytes/macrophages in DLBCL, which we confirm *in situ* by multiplex immunofluorescence and imaging mass cytometry. This crosstalk is associated to an immunosuppressive tumor microenvironment and an adverse prognosis in DLBCL.

INTRODUCTION

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL) are the two most common lymphomas, both deriving from germinal center (GC) B cells and characterized by aggressive versus indolent clinical course, respectively.¹ Composition and organization of the immune and non-immune tumor microenvironment (TME) have been progressively identified as crucial in supporting FL and DLBCL tumor growth and resistance to treatment.²⁻⁵ Landscape of tumor-infiltrating T-cells and stromal cells has been explored at the single cell level in DLBCL and FL⁶⁻⁹ but the heterogeneity of the myeloid compartment still remains essentially uncharacterized, mainly due to the technical limitations of the classically used non-enzymatic lymph node (LN) dissociation approaches.

Conversely, the mononuclear phagocyte (MNP) compartment, encompassing macrophages, monocytes, and dendritic cells (DC), has hence been recently thoroughly explored in patients with solid cancers by single cell approaches, such as single cell RNA sequencing (scRNASeq) and mass cytometry (or cytometry by time-of-flight, CyTOF).¹⁰ More specifically, accumulation and phenotypic alterations of tumor-associated macrophages (TAM) have been associated with prognosis, resistance to therapy, and relapse in numerous solid tumors.^{11,12} TAM can display direct pro-tumoral activities and provide also indirect support to the tumor through a bi-directional crosstalk with other immune cells, essentially resulting in immunosuppression; and non-immune cells, including cancer-associated fibroblasts (CAF) and endothelial cells.¹³ In FL and DLBCL, several studies have shown an association between CD68^{pos} and/or CD163^{pos} macrophage infiltration and tumor prognosis, with sometimes contradictory results depending on the treatment schedule and likely the “low resolution” of the TAM phenotype, partly missing their functional heterogeneity.¹⁴⁻²⁰ These discrepancies illustrate the ambivalent role of TAM, which can display pro-tumoral but also anti-tumoral properties in B-cell lymphomas, contributing in particular to the efficacy of immunochemotherapy based on anti-CD20 antibodies through antibody-dependent cell phagocytosis (ADCP). TAM display immunosuppressive functions in DLBCL via expression of PD-L1,²¹⁻²³ and have low tumor phagocytosis activities in DLBCL and FL due to their overexpression of the phagocytosis-inhibitory receptor SIRP α .²⁴ Furthermore, FL TAM directly promote FL B cell growth through trans-presentation of IL-15.²⁵ FL TAM also express CD209/DC-SIGN which binds oligomannose residues occupying N-glycosylation sites introduced within variable regions of FL BCR (and less frequently DLBCL), leading to antigen-independent BCR-dependent B cell activation.²⁶⁻²⁸ FL

stromal cells overexpressed CCL2, thus recruiting monocytes that further differentiate into pro-angiogenic and immunosuppressive TAM.²⁹ The TAM pro-angiogenic properties were also demonstrated in a xenograft model of DLBCL.³⁰ In normal lymph node (LN), highly specialised macrophages, stromal, and endothelial cells, involved at different levels in the immune response, interact within distinct niches.³¹ Recently, the crosstalk between blood vessel permeability, production of CCL2 by lymphoid stromal cells, and recruitment of monocytes into lymph nodes (LN) has been shown to regulate the behavior of normal B cells.³² However, the dialogue between TAM and stromal or endothelial cells in FL and DLBCL, and how it could impact lymphomagenesis has not been fully explored.

In the current study, we aimed at exploring the co-evolution of MNP, stromal, and endothelial heterogeneity within FL and DLBCL LN through a combination of mass cytometry, scRNAseq, and *in silico* approaches. We identified a coregulation between TAM and blood endothelial cell (BEC) activation status in lymphoma notably relying on the deregulation of the ANXA1/FPR1-2 axis. This predicted interaction was validated *in situ* by multiplex immunofluorescence (mIF) and imaging mass cytometry (IMC) and was associated with an adverse prognosis in DLBCL, identifying a new clinically relevant MNP-BEC loop in this disease.

RESULTS

Mononuclear phagocyte, stromal cell, and endothelial cell landscape differ across normal and B-cell lymphoma lymphoid tissues

MNP and stromal cells are often described as engaged in a bidirectional pro-tumoral crosstalk in solid tumors but are still poorly known in B-cell lymphoma. To fill this gap, we explored LN from FL and DLBCL at both the phenotypic and transcriptomic levels and compared them with their physiological counterpart reactive secondary lymphoid organs (rSLO), including reactive lymph nodes (rLN) and reactive tonsils (rTonsil) (Table 1 and Figure S1A). Firstly, we mechanically dissociated tissue fragments from 24 SLO samples, including DLBCL (n=6), FL (n=9), rLN (n=3), and rTonsil (n=6), as previously described.³³ Following T- and B-cell depletion, cells were stained with a dedicated CyTOF panel (Key resources table and Figure S1B). After pre-processing to exclude dead cells, doublets, and contaminating CD3^{pos} and CD19^{pos} cells, we obtained 594,946 CD45^{neg} viable cells (n = 79,955 for DLBCL, n = 105,344 for FL, n = 86,839 for rLN, and n = 322,808 for rTonsil) and 658,206 CD45^{pos} HLA-DR^{pos} MNP (n = 138,374 for DLBCL, n = 152,000 for FL, n = 236,902 for rLN, and n = 130,930 for rTonsil). CD45^{neg} and CD45^{pos} HLA-

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

DR^{pos} cells were analyzed separately with the same pipeline including dimension reduction by UMAP, flowSOM clustering, and manual annotation of the clusters (Figure S1C).

CD45^{pos} HLA-DR^{pos} cells were separated in 13 clusters, including a CD123^{pos} pDC and 10 MNP clusters (Figure 1A). The 2 other clusters, named CD11b^{hi} cluster and CD209^{hi} cluster, comprised a small number of events (respectively 2,409 and 584 cells), were not identified as MNP, and were thus excluded from further analysis. Among the 10 MNP clusters we found i) 2 DC clusters (respectively named cDC [CCR2^{lo} SIRP α ^{hi} HLA-DR^{hi} CD11c^{dim}] and moDC [CCR2^{pos} SIRP α ^{hi} HLA-DR^{hi} CD11c^{pos}], ii) a CCR2^{pos} CD14^{pos} monocyte/macrophage (moMac) cluster, iii) a CCR2^{pos} CD14^{neg} CD11b^{lo} cluster that we could not identify as either monocyte/macrophage or monocyte/DC and thus named moMac/DC, and finally iv) 6 macrophage clusters (named Mac-CD169, Mac-CD209, Mac-PDL1, Mac-CD34, Mac-S100A9, and Mac-RANKL). Of note, the ratio between the sum of all monocyte and macrophage clusters (Mo&Mac metacluster) and the sum of DC clusters (DC metacluster) was enriched in lymphoma compared to rSLO ($p < 0.001$) (Figure 1B). Mac-CD209, Mac-CD34, Mac-S100A9, moMac, and moMac/DC were significantly enriched in lymphomas ($p < 0.05$) and almost absent in healthy tissues (Figures 1A and S1D).

Ten clusters of stromal and endothelial cells were identified within CD45^{neg} cells (Figure 1C). Among these 10 clusters, we found i) a CD31^{neg} PDPN^{pos} CD21^{pos} follicular dendritic cell (FDC) cluster, ii) 2 CD31^{neg} PDPN^{pos} CD49a^{pos} follicular reticular cell (FRC) clusters (FRC-NOS [not otherwise specified] and FRC-CD34 [that could also include pericytes and adventitial cells]), iii) 2 CD31^{neg} PDPN^{neg} CD49a^{pos} double negative (DN) clusters distinguished by CD36 expression (DN-NOS and DN-CD36), iv) a CD31^{pos} PDPN^{pos} lymphoid endothelial cell (LEC) cluster, and v) 4 CD31^{pos} CD34^{pos} PDPN^{neg} blood endothelial cell (BEC) clusters (BEC-NOS, BEC-CD36, BEC-S100A9, and BEC-CD31^{lo}). Finally, a CD31^{neg} PDPN^{pos} CD49a^{lo} S100A9^{pos} cluster was present only in rTonsil and labelled as epithelial cells. Among BEC, BEC-CD36, and BEC-S100A9 were significantly enriched in lymphoma samples ($p < 0.001$) compared to rSLO (Figure 1D). Altogether this mapping of non-lymphocyte cells within SLO highlights co-amplification of specific subsets of macrophages and BEC in B-cell lymphomas.

Mononuclear phagocytes and blood endothelial cells are co-regulated in SLO

We next evaluated whether MNP, stromal, and endothelial cells were co-regulated in SLO. To this aim, we combined on a hierarchical clustering both cluster abundances and mean metal intensities (MMI) (Figure S2A). Parameters showing statistical differences (Kruskal-Wallis $p <$

0.05) between sample types (FL, DLBCL, rLN, and rTonsil) (Figures S2A and 2B) were further used for sample re-clustering. Tonsil samples were clustered together and closely related to another cluster that include all rLN samples, 1 out of 9 FL and 1 out of 6 DLBCL samples (Figure 2A). A third cluster included exclusively FL samples (6 out of 9) and the last cluster included 5 DLBCL and 2 FL samples. rTonsils showed a high abundance of lymphoid stromal cells including FRC and FDC. Although rather heterogeneous, DLBCL samples displayed either i) an upregulation of CD54 on the DN-CD36 cluster, ii) an increase in the Mac-PDL1 percentage, and/or iii) an upregulation of CD36 on the BEC-CD36 cluster associated with an increase of FRC-CD34 and BEC-CD36 percentages. We noticed an upregulation of HLA-DR on the BEC clusters, also found in FL samples. In addition, FL samples were characterized by i) an upregulation of the TAM marker CD206 on several MNP clusters, ii) an increase of S100A9 or CD33/SIGLEC-3, involved in the inhibition of phagocytosis on MNP,³⁴ iii) a high expression of CD31 and CD54 on BEC (Figure 2A). Altogether, BEC were activated in both FL and DLBCL compared to rSLO. To better evaluate how the parameters of interest could be co-regulated in SLO, we built a correlation matrix based on all LN samples (Figure 2B). Various BEC subsets, mostly overexpressing HLA-DR or CD31, were significantly co-regulated with CD33, S100A9, and CD206 expression on MNP subsets or with the abundance of Mac-S100A9 and Mac-PDL1. Altogether, these observations indicate that monocytes/macrophages and BEC are co-regulated in SLO with a co-amplification/co-activation in B-cell lymphoma compared to rSLO.

Mononuclear phagocyte landscape in reactive SLO and lymphoma as revealed by scRNASeq

We then used scRNAseq to better explore lymphoma MNP heterogeneity from 13 samples (3 DLBCL, 4 FL, 3 rLN, and 3 rTonsil) at the transcriptomic level (Table 1). After sample preparation (mechano-enzymatic dissociation followed by T- and B-cell depletion), MNP were FACS-sorted (Figure S1A). All samples were already included in the CyTOF analysis except for one rTonsil (Table 1). We sorted and pooled CD45^{pos} CD3^{neg} CD19^{neg} HLA-DR^{pos} CD11c^{pos} and CD45^{pos} CD3^{neg} CD19^{neg} HLA-DR^{pos} CD11c^{neg} CD123^{neg} cells in order to eliminate pDC without losing any MNP subset (Figure S3A). A CITE-Seq analysis using CD14 and CD36 antibodies was used to better discriminate monocytes and macrophages from DC. After filtering and integration (Figure S3B), we obtained 13,229 cells (n = 2,225 DLBCL, n = 2,436 FL, n = 3,769 rLN, and n = 4,799 rTonsil) grouped into 17 clusters (Figure S3C). Among these 17 clusters, we selected the 7 clusters of MNP (moMac, Mac-C1Q, SIGLEC6-cDC, CLEC9A-cDC1, LAMP3-cDC, cDC2, MNDA-cDC2,

altogether: 8,691 cells [n = 1,154 DLBCL, n = 1,444 FL, n = 3,091 rLN, and n = 3,002 rTonsil]) and performed a new integration, dimension reduction by UMAP, followed by a clustering (Figure 3A). Twelve clusters were identified and annotated, including one consisting of dying cells (117 cells, enriched in mitochondrial genes) excluded from further analysis. We identified i) 6 clusters of cDC including CLEC9A-cDC1, LAMP3-cDC, SIGLEC6-cDC (these last 2 subsets of cDC being recently described in several scRNASeq studies)³⁵⁻⁴⁰ and 3 subsets of CLEC10A^{pos} CD1C^{pos} cDC2 (MND4-cDC2, CD1E-cDC2, and CREM-cDC2), ii) 1 cluster of macrophages (Mac-C1Q), and iii) 4 monocyte/macrophage clusters (CD14-moMac, S100-moMac, CD16-moMac, and IL1b-moMac) (Figures 3B and 3C). Similar to what we observed in the CyTOF data, the ratio between Mo&Mac and DC metaclusters was increased in lymphoma compared to rSLO (Figure 3D). CD14-moMac and S100-moMac were *CD16^{lo} SOD2^{hi}* and were distinguishable from each other by the expression of *S100A8*, *S100A9*, *VCAN*, and *CEBPB*. Since S100-moMac showed high expression of *S100A8/9*, *VCAN*, and *CEBPB*, they could correspond to MDSC/TAM-like monocytes (Figures 3B and 3C).^{10,41} CD16-moMac were *CD14^{neg}* and expressed *FCGR3A/CD16* as well as high levels of *MAFB* and *CD68*, and are likely non-classical monocytes (ncMo)-like Mo&Mac. The IL1b-moMac cluster displayed high levels of the pro-inflammatory *IL1B* gene, as well as *FOS* and *JUN* that are involved in many cellular processes including cell differentiation, and could be inflammation-driven. Finally, only the Mac-C1Q macrophage cluster was significantly enriched in DLBCL (Figures 3E and S3D) and expressed high levels of *CD68*, of the 3 subunits of the complement subcomponent C1q: *C1QA*, *C1QB*, and *C1QC*, and of the matrix metalloproteinase *MMP9*, involved in extracellular matrix remodelling, angiogenesis, and neovascularization.

Monocyte and macrophage deregulation at the transcriptomic level is disease specific

Due to the low abundance of cDC in the lymphoma samples and our previous results showing a correlation between monocytes/macrophages and BEC, we then focused on the transcriptomic deregulation in the cells included in the Mo&Mac metacluster (including CD14-moMac, S100-moMac, CD16-moMac, IL1b-moMac, Mac-C1Q) (Figure 3C). To avoid bias in the differential expression analysis due to the limited number of samples, we performed iterative analyses with all samples but one and retained only the 651 (out of 1,937) genes statistically differentially expressed after this bootstrap analysis. We then filtered 393 genes of interest based on a fold change $|FC| > 1.5$ and an expression by more than 30% of cells in at least one of

the conditions tested (Table S1). As reported for stromal cells, Mo&Mac transcriptomic signature was different between rTonsils and rLN (Figure S4A). We thus focused our analysis on lymphomas and rLN samples. DLBCL was characterized by a high number of genes differently expressed when compared to FL and rLN (respectively 174 and 268 genes), whereas less genes distinguished FL and rLN (33 genes) (Figure 4A). We defined a signature of 73 upregulated genes specific of Mo&Mac from DLBCL, which includes i) hallmark macrophage/TAM genes (*CD14*, *CD163*, *FCGR1A/B*) and non-classical monocyte marker (*FCGR3A/CD16*), ii) gene involved in immune suppression (*IL4I1*), and iii) genes from the S100 family (*S100A8*, *S100A9*) and interferon (IFN) response genes (*IFITM1*, *IFITM3*, *IFI30*, *STAT1*, and the chemokines *CXCL9* and *CXCL10*) (Table S1). Other genes were found upregulated in macrophages from DLBCL vs either FL (26 genes, including *C1QB/C*) or rLN (47 genes, including *S100A4/6/11/12* from the S100 family, the neutrophil-attractant chemokine *CXCL8*, the macrophage transcription factor *MAFB*, and the macrophage/TAM marker *VCAN*). We also performed the differential expression analyses separately on each cluster previously described (Table S2). No gene was deregulated in the CD16-moMac subset, which could be linked to the low number of cells. Altogether, Mo&Mac clusters from DLBCL were enriched in genes involved in immune suppression (*IDO1*, *CD274*) and in IFN signalling (*IFI6*, *TRIM22*, *IFITM2*) (Table S2). Genes downregulated in FL and DLBCL compared to rLN were often hallmark DC genes and/or involved in antigen presentation (including *CD74* and *MHCII* genes such as *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DPB1*). Only 2 genes (*CALHM6* and *IFITM3*) were specifically downregulated in FL, both involved in response to IFN, possibly reflecting a relative non-inflammatory environment in FL, at least compared to the reactive and aggressive lymphoma settings. Among the 14 upregulated genes in FL compared to rLN, we found 3 genes from the S100 family (*S100A6/8/9*) and the M-ficolin gene (*FCN1*). We then performed an analysis of the deregulated pathways between DLBCL, FL, and rLN, with g:profiler, followed by an enrichment map analysis with Cytoscape⁴² (Figure 4B). Several pathways were upregulated in DLBCL (highlighted in purple) and were involved in chemotaxis, pattern recognition receptor (PRR) signalling, immune response regulation, and IFN signalling pathway. Another group of pathways (highlighted in yellow) involved in translation was downregulated in DLBCL compared to the other two conditions. Finally, two clusters of pathways were downregulated in both DLBCL and FL compared to rLN, involved in antigen presentation to T cell via MHC class II (highlighted in green).

Then, we used the PISCES R package⁴³ on our scRNAseq dataset to infer protein activity. As previously done with the differentially expressed genes, we filtered significantly dysregulated inferred proteins, either in Mo&Mac metacluster (Table S3) or in each individual cluster (Table S4). We observed a strong DLBCL Mo&Mac signature including macrophage/TAM markers (MAFB, PPARG) and IFN response (STAT1, STAT2, IRF1, IRF9) (Figures S4B and S4C). The MDSC marker STAT3 was among the few inferred proteins upregulated in FL compared to rLN, as well as in DLBCL vs rLN. Overall, monocyte and macrophage transcriptome shows a significant deregulation in DLBCL, compared to both rLN and FL, whereas FL MNP niche shares features with both reactive and DLBCL LN.

Interactome and *in situ* analyses identify BEC and Mo&Mac crosstalk in DLBCL

We next sought to extend our previous observations of co-amplification of macrophage and BEC subsets in B-cell lymphomas, by predicting *in silico* potential receptor-ligand interactions. CellPhoneDB was used to predict receptor-ligand interactions between macrophages and BEC in normal vs lymphoma (DLBCL or FL) conditions.⁴⁴ We first defined Mo&Mac genes of interest by combining genes previously defined in Tables S1, S2, S3, and S4 (i.e. genes that were up- or down-regulated either in DLBCL or in FL compared to rLN, and obtained by scRNAseq or corresponding to the inferred proteins; both either from Mo&Mac metacluster or from one of the clusters). We took advantage of already published scRNASeq data of BEC from the E μ -Myc mouse model of aggressive lymphoma compared to control mice.⁴⁵ Seven statistically significant interactions were identified between ligands expressed by BEC and receptors expressed by Mo&Mac, in either the lymphoma context, the reactive context, or both (Figure 5A). Lymphoma BEC were predicted to interact with Mo&Mac from DLBCL via AnnexinA1 (ANXA1) binding to the formyl-peptide receptors FPR1 or FPR2, an interaction not found in reactive context. Accordingly, ANXA1 was upregulated in lymphoma BEC (Figure 5A) whereas FPR1 and FPR2 were found upregulated in DLBCL Mo&Mac metacluster and in most subclusters including the Mac-C1Q and CD14-moMac clusters (Figures 5A, 5B, and S5A). Conversely, CXCL12-CXCR4 and ICAM1-AREG interactions seemed to be lost in DLBCL as compared to reactive context (Figure 5A). No predicted lymphoma-specific interaction was found in the reverse analysis (i.e. ligands expressed on Mo&Mac and receptors on BEC) (Figure S5B). Regarding the Mo&Mac genes deregulated in FL, no specific interaction was found between BEC and Mo&Mac (data not shown). We confirmed the putative interaction between BEC and

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

Mo&Mac metacluster in DLBCL via ANXA1 binding to FPR1 or FPR2 by using the NicheNet algorithm⁴⁶ (Figure S5C). On bulk RNASeq in Eμ-Myc vs control mice,⁴⁷ ANXA1 was overexpressed only by BEC and not by LEC, FRC, and DN, whereas FPR1 was not overexpressed on these cells and FPR2 was overexpressed on BEC and DN (Figure S5D). ANXA1, FPR1, and FPR2 were not differentially expressed by T and B cells in a scRNASeq dataset from human DLBCL and rLN samples⁹ (Figure S5E), and ANXA1 was not differentially expressed by Mo&Mac in our own scRNASeq dataset (Figure S5F), therefore supporting ANXA1-FPR1/FPR2 interaction as a specific actor of BEC and Mo&Mac crosstalk in DLBCL. We confirmed this interaction *in situ* with FPR1-expressing CD68^{pos} macrophages found in close contact with ANXA1-expressing CD31^{pos} endothelial cells in DLBCL (Figure 5C), a pattern not found in rLN (Figure S5G).

To confirm the spatial relationship between macrophages and BEC in DLBCL, we performed an imaging mass cytometry (IMC) analysis on DLBCL (n=4; 10 ROI [Region Of Interest]; total area 7.1 mm²), FL (n=3; 5 ROI; total area 5.6 mm²), and rLN (n=3; 6 ROI; total area 6.5 mm²) (Table 1). In our scRNAseq data, S100A9 was among the top 10 genes correlated with both FPR1 and FPR2 (Table S5, Figure S5H) and FPR1 and FPR2 were coexpressed with S100A9 (Figure 5D), making S100A9 a good surrogate marker of FPR1/FPR2-expressing macrophages in DLBCL. Blood vessels were defined as CD31^{pos} PDPN^{neg} anatomical structures (Figures 5E and S6). On whole ROI, blood vessel area was higher in rLN and both CD68^{pos} and CD163^{pos} macrophages were enriched in DLBCL (p < 0.01) (Figure S6). To evaluate BEC/Mo&Mac interaction, we defined neighbourhood zones of 25 μm around the blood vessels and quantified CD68, CD163, and S100A9 cells located in this vicinity area (Figures 5E). Whole CD68^{pos} macrophages (p < 0.01) but also macrophage subsets expressing S100A9 and/or CD163 (p < 0.05) were enriched in the 25 μm area of blood vessels in DLBCL compared to FL.

Finally, we analysed the clinical impact of ANXA1, FPR1, and FPR2 expression in a cohort of DLBCL samples.⁴⁸ Log-rank test showed a statistically significant association between high FPR1 and ANXA1, and high FPR2 and ANXA1 expression and a shorter overall survival (p = 5.6 x10⁻⁴ and p = 1.4 x10⁻⁴, respectively) (Figure 5F). Patients FPR1^{hi} and ANXA1^{hi} or FPR2^{hi} and ANXA1^{hi} showed an enrichment in immunosuppressive genes (CD274, IL10, IDO2, C1QA, S100A8, S100A9, CD163). These results suggest that Mo&Mac and BEC engage in a specific interaction involving the receptors FPR1 and FPR2 and their ligand ANXA1 in DLBCL, an interaction that may contribute to local immunosuppression and be linked to the prognosis of this aggressive lymphoma.

DISCUSSION

MNP play pleiotropic roles in cancer pathogenesis, prognosis, and treatment. Their heterogeneity has been recently unraveled in large scRNAseq studies including numerous tumor tissues.^{10,36,49} However, these human tumor MNP atlases include very few lymphoma-derived cells obtained from poorly characterized lymphoma samples, precluding any conclusion on the lymphoma MNP landscape. Conversely, scRNAseq studies designed to specifically explore malignant B cells and their TME in FL or DLBCL do not include MNP, due to the use of purely mechanical dissociation approaches.^{6,8,9} In the current work, using a validated mechano-enzymatic dissociation and gating strategy,³³ we provided a thorough characterization of human MNP in normal and malignant SLO making it possible to highlight their phenotypic and functional heterogeneity as well as their capacity to interact with other cell components of the TME, in particular BEC.

This approach allowed us to identify several Mo&Mac populations similar to those previously described in solid cancers, including CD14-moMac and CD16-moMac, resembling classical and non-classical tumor-infiltrating monocytes, and Mac-C1Q, previously proposed as long-term resident macrophages enriched in liver tumors.³⁶ Our IL1b-moMac cluster displayed a profile of the previously described inflammatory cytokine-enriched TAM subset. Finally, S100-moMac expressed high amounts of *VCAN*, and *CREBBP*, but also *VEGFA*, and were previously identified as pro-angiogenic TAM subsets.¹⁰ Comparison between lymphoma and rSLO highlighted that DLBCL Mo&Mac are over-represented in tumor tissues, showing a specific transcriptomic profile, associated with an increase of immunosuppressive genes, including *CD274/PD-L1*, *IDO1*, and *LILRB1/LILRB2*, interferon-stimulated genes (ISG), and S100 genes. An immunosuppressive phenotype of DLBCL TAM has already been proposed, characterized by an upregulation of PD-L1, identified as a prognostic marker of the disease.^{22,23,50} Similarly, IDO1 expression and activity were also correlated with DLBCL patient outcome.^{51,52} Finally, LILRB1/2 have been identified as “don't eat me” signals after engagement by MHC class I and could thus contribute to impairment of apoptosis previously reported in DLBCL.^{24,53} Interestingly, *LILRB2* and *IDO1* were found coregulated with PD-L1 expression on CD68^{pos} TAM in DLBCL contributing to a poor prognosis signature.⁵⁴ Overall, analysis of large datasets of bulk RNAseq recently underlines the pro-tumoral role of TAM, revealing the co-occurrence of a high amount of TAM, a proinflammatory gene expression profile, and an overexpression of *PD-L1*, *IDO1*, and

immunosuppressive cytokines.³ Conversely, the relationship between TAM and angiogenesis in B-cell lymphoma is largely underexplored even if a correlation between CD163^{pos} TAM and neovascularization through angiogenic sprouting has been proposed in FL.⁵⁵

We showed here specific co-amplification and co-activation of TAM and BEC subpopulations in B-cell lymphomas compared to rSLO. In particular, suppressive PD-L1^{pos} TAM were correlated to HLA-DR expression on BEC in DLBCL, while upregulation of CD206 and S100A9 on different TAM subsets was correlated to an upregulation of CD31 and CD54 on BEC subtypes in FL. An increased density and disorganization of the vascular network is known in DLBCL,^{56,57} and neoangiogenesis signature is associated with adverse prognosis in this disease.⁴⁸ In FL LN, although micro-vessel density seems to be equivalent to that of the reactive LN, specific angiogenic pathways are activated in endothelial cells.^{7,56} We identified an upregulation of HLA-DR on the BEC clusters in FL and DLBCL, as well as a significant enrichment of BEC-CD36 and BEC-S100A9, which probably reflects endothelial activation. Notably, CD36 has been directly involved in the neoangiogenesis process.^{58,59} Exploring the mechanism underlying the BEC/TAM crosstalk, we combined our MNP scRNASeq data with published murine BEC scRNASeq data, and predicted a specific paracrine interaction between ANXA1-expressing BEC and FPR1/FPR2-expressing Mo&Mac in DLBCL, with a possible additional autocrine ANXA1-FPR2 signalling in BEC. Of note, *ANXA1*, *FPR1*, and *FPR2* were not differentially expressed in FL samples compared to rLN in published datasets of stromal, endothelial, T, and B cells.^{7,9} ANXA1 is an anti-inflammatory calcium-regulated protein, whose only known receptors are the FPR G-protein coupled PRR formyl-peptide receptors. ANXA1-FPR interaction is involved in monocyte recruitment and polarization, switching them to an M2/reparative/pro-tumor phenotype.^{60–64} ANXA1 and/or FPR1/2 are dysregulated in several solid tumors, with a correlation to poor prognosis. The involvement of ANXA1-FPR signalling in tumor progression and tumor cell invasion has been mostly explored in autocrine tumor cell activation, notably in breast cancer, gastric cancer, pancreatic carcinoma, and glioblastoma.^{65–68} However, it was also involved in paracrine interactions between metastatic mammary cancer cells and microglia, driving microglia recruitment and polarisation to a tumor-supportive phenotype.⁶⁹ Accordingly, elevated ANXA1, FPR1, and FPR2 are associated to poor outcome in breast cancer patients.⁶⁹ Similarly, ANXA1-FPR1 interaction has been predicted in multiple myeloma between inflammatory mesenchymal stromal cells and myeloid cells, thus contributing to the formation of the protumoral bone marrow niche.⁷⁰ Finally, cleaved ANXA1 has been described in caveolae

of endothelial cells in several solid tumor tissues, specifically in the tumour vasculature, and not in the normal vessels.⁶⁵ FPR1/2 expression was not cluster-specific in DLBCL Mo&Mac, and S100A9 was a surrogate marker for FPR1/2, allowing us to confirm in situ the BEC-TAM interaction. S100A9 is highly expressed in circulating monocytes/M-MDSC in DLBCL and contributes to their immunosuppressive activity.^{71,72} Moreover, DLBCL TAM overexpress CCR2, which could reflect a recent recruitment to the tissue.⁵⁰ We also found a global upregulation of the monocyte markers CD14 and CD16 in Mo&Mac DLBCL compared to FL and rLN and CD16 was highly correlated to FPR1/2 expression in DLBCL Mo&Mac. An increased number of circulating CD16^{pos} ncMo, which display a combined inflammatory/tolerogenic phenotype and can be recruited by tumor B cells, has been shown in DLBCL.⁷³ All these observations suggest an increased recruitment of monocytes, including ncMo, to the tumor in DLBCL, in which the ANXA1-FPR interaction could be a key player in the monocyte-derived TAM infiltration.

ANXA1, *FPR1*, and *FPR2* expression were shown to correlate to patient prognosis and expression of immunosuppressive genes in DLBCL samples. Neoangiogenesis and infiltration of immunosuppressive TAM subsets have been previously associated to poor prognosis in DLBCL. Our data suggest that both processes could be linked, through an ANXA1-FPR1/2 interaction involving BEC and Mo&Mac, leading to an infiltration of immunosuppressive TAM. Targeting TAM recruitment, survival, and function has become a major therapeutic goal in lymphoma and a specific focus on ANXA1-FPR1/2-mediated interactions may be of clinical interest in DLBCL.

Limitation of the study

Although combining phenotypic and transcriptomic approaches, our single cell analyses are based on a limited number of samples. DLBCL is a clinically and biologically heterogeneous disease and the more recent DLBCL classifications reveal a relationship among tumor cell-of-origin, genomic alterations, and TME composition, including TAM content.^{3,74} Assessment of ANXA1 and FPR1/2 expression by BEC and Mo&Mac in larger populations of DLBCL patients would allow the identification of a potential association between ANXA1-FPR interaction and peculiar DLBCL molecular and TME subtypes. Moreover, we cannot exclude a loss of some macrophages during single cell suspension preparations, especially since macrophages are large, sometimes polynucleated cells embedded in the extracellular matrix that may be fragmented during isolation.⁷⁵ Additionally, we used murine BEC data for in silico identification of BEC-Mo&Mac interactions. Finally, other co-regulations and crosstalk mechanisms could be

at play between Mo&Mac and stromal or endothelial cells in FL and DLBCL, which we might have missed in this study.

Acknowledgments: Authors wish to thank all donors and also Catherine Blanc and Aurélien Corneau, from the CyPS core facility at Sorbonne University (Paris) for access to the Helios mass cytometer; Yael Glasson from the IRCM (Montpellier) for access to the Hyperion; the H2P2 (Rennes) for slide preparation; the Biosit CytomeTri (Rennes) for cell sorting; the CRB platform (Rennes) for samples management; Steve Genebrier for CyTOF experiments; Maxime Leplat for additional graphic illustrations; Mathieu Laurichesse (Lorient) for samples preparation.

Funding: Juliette Ferrant is recipient of a fellowship from the FHU CAMIn (Federation Hospitalo-Universitaire Cancer Microenvironnement et Innovation). Simon Léonard was supported by a specific grant from the LabEx IGO program (n° ANR-11-LABX-0016) funded by the «Investment into the Future» French Government program, managed by the National Research Agency (ANR). This work was supported by grants from the COmite de la REcherche Clinique et Translationnelle (CHU of Rennes), from the Ligue contre le Cancer (Comité 35 et 85), from the Institut Carnot-CALYM (Calym-Janssen 2019), from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE15-0015 StroMAC), from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (PGA1 RF20190208534), and from la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée).

Author contributions: Conceptualization, K.T. and M.R.; Methodology, J.F., S.L.G., F.P., K.T., and M.R.; Formal analysis, J.F., S.L.G., F.P., T.P., and M.R.; Investigation, J.F., S.L.G., F.P., S.L., I.P., B.H., L.D., C.M., B.A., N.V.A., C.L., H.A.M., and N.B.; Resources, C.P., A.B., V.L., and G.M.; Data curation, J.F., C.P., F.L.G., and M.R.; Writing - original draft preparation, J.F. and M.R.; Writing - review and editing, J.F., S.L.G., K.T., and M.R.; Visualization, J.F., S.L.G. and M.R.; Supervision, K.T. and M.R.; Project administration, K.T. and M.R.; Funding acquisition, J.F., K.T., and M.R.

Competing interests: J.F., S.L.G., F.P., S.L., I.P., C.P., A.B., V.L., G.M., B.H., L.D., C.M., B.A., N.V.A., C.L., F.L.G., H.A.M., N.B., T.P., K.T., and M.R. declare no competing interest.

Figure 1: Stromal, endothelial, and MNP phenotypic landscape of reactive and lymphoma SLO

(A) UMAP and FlowSOM clustering of all 658,206 myeloid cells from SLO included in the CyTOF analysis and by sample (n = 138,374 DLBCL, n = 152,000 FL, n = 236,902 rLN, n = 130,930 rTonsil), displaying the clusters identified and UMAP projection of selected markers expression (left). Heatmap of the mean metal intensity (MMI) of selected markers and tissue abundance for the 11 MNP clusters, and relative proportion of the clusters for each sample (right).

(B) Ratio of all monocytes/macrophages clusters (Mo&Mac metacluster) to all DC clusters, according to sample type. Mann-Whitney, ***p < 0.001.

(C) UMAP and FlowSOM clustering of all 594,946 CD45^{neg} cells from SLO included in the CyTOF analysis and by sample type (n = 79,955 DLBCL, n = 105,344 FL, n = 86,839 rLN, n = 32,2808 rTonsil), displaying the clusters identified and UMAP projection of selected markers expression (left). Heatmap of the mean metal intensity (MMI) of selected markers and tissue abundance for the 11 stromal and endothelial clusters, and relative proportion of the clusters for each sample (right).

(D) Ratio of BEC-CD36 and BEC-S100A9 clusters to other BEC clusters, according to sample type. Mann-Whitney, ****p < 0.0001.

See also Figure S1.

Figure 2: Myeloid subsets and Blood Endothelial Cells are co-regulated in SLO

(A) Heatmap of the statistically different parameters (abundance of clusters and mean metal intensity between sample types (FL, DLBCL, rLN, rTonsil).

(B) Correlation matrix displaying the same parameters (except FDC, FRC-NOS, Epithelial cells, and DN-CD36 abundances) for LN samples (rLN, FL, and DLBCL). Spearman test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Parameters involved in significant correlations between myeloid and stromal/endothelial populations are highlighted in grey.

See also Figure S2.

Figure 3: MNP landscape in reactive and lymphoma SLO as revealed by scRNASeq

(A) UMAP and FlowSOM clustering of all 8691 cells from SLO included in the single cell RNASeq analysis and by sample (n = 1154 DLBCL, n = 1444 FL, n = 3091 rLN, n = 3002 rTonsil), displaying the 12 clusters identified, including 11 MNP clusters.

(B) UMAP projection of selected markers expression.

(C) Dotplot showing the average RNA expression level (color scale) and percentage of expressing cells (dot size) of selected markers for the 11 MNP clusters (left), tissue preference of each cluster (center), relative proportion of the clusters for each sample (right).

(D) Ratio of all monocytes/macrophages clusters (Mo&Mac metacluster) to all cDC clusters, according to sample type. Mann-Whitney, * $p < 0.05$.

(E) Boxplot of Mac-C1Q cluster abundance according to sample type.

See also Figure S3.

Figure 4: Monocytes and macrophages transcriptomic deregulation in lymphoma

(A) Volcano plots of differentially expressed genes for monocytes and macrophages included in the CD14-moMac, S100-moMac, CD16-moMac, IL1b_moMac/DC, and Mac-C1Q, between FL and DLBCL (left), DLBCL and reactive LN (center), FL and reactive LN (right). Wilcoxon-Mann-Whitney test, $|FC| > 1.5$, $p < 0.05$. Only genes present in at least 30% of the cells in one of the compared conditions and found to be robustly differentially expressed by iteratively removing each sample from the differential analysis are presented as differentially expressed (larger, colored dots). Genes found to be deregulated in the comparison between clusters of one sample type and the other two sample types are highlighted in darker colors.

(B) Enrichment map of the pathway analysis for the differentially expressed genes. Each node represents a pathway, colored according to the context in which it is enriched.

See also Figure S4.

Figure 5: Interactome and *in situ* analyses identifies BEC and Mo&Mac crosstalk in DLBCL

(A) Dotplot of statistically significant interactions identified with CellphoneDB between normal murine BEC and rLN Mo&Mac or tumor murine BEC and DLBCL Mo&Mac, involving ligands expressed by murine BEC and receptors expressed by Mo&Mac and differentially expressed between rLN and DLBCL LN. Log₂ mean expression of interacting molecules (color scale) and p-values (dot size) are shown. Only statistically significant interactions are plotted ($p < 0.05$) with a minimal p-value set to 0.01 (left). Dotplots showing the average RNA expression level (color scale) and percentage of expressing cells (dot size) of the identified ligands expressed by tumor or normal BEC and receptors expressed by Mo&Mac (right).

(B) *ANXA1* expression on normal and tumor BEC⁴⁵ and *FPR1* and *FPR2* expression levels on DLBCL Mo&Mac clusters (left). Mann-Whitney, * $p < 0.05$.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

(C) CD31, ANXA1, CD68, and FPR1 staining by mIF in DLBCL. Arrows indicate colocalization. Scale bar represent 20 μm .

(D) *FPR1*, *FPR2* and *S100A9* expression levels on DLBCL Mo&Mac clusters.

(E) IMC staining for BEC (CD31^{pos} PDPN^{neg}), LEC (CD31^{pos} PDPN^{pos}), and macrophages/myeloid cells (CD68, CD163, and S100A9) in 25 μm vicinity area of blood vessels. ROI for DLBCL (n=4, 10 ROI, total area 7.1 mm^2), FL (n=3, 5 ROI, total area 5.6 mm^2), and rLN (n=3, 6 ROI, total area 6.5 mm^2). Blood vessels were defined as anatomical structure CD31^{pos} PDPN^{neg}. CD31 cells are in yellow; PDPN are in red, CD68 are in purple, CD163 are in green, and S100A9 are in pink; neighbourhoods' zones of 25 μm around blood vessels are indicated in light green. Representative ROI for DLBCL, FL, and rLN. Number of macrophages and macrophages expressing CD163 and/or S100A9 in 25 μm vicinity area of blood vessels. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons correction, *p < 0.05. Scale bar represent 100 μm .

(F) Kaplan-Meier survival curves and log-rank test comparing patients with high proportion of *FPR1* and *ANXA1* (*top*) and high proportion of *FPR2* and *ANXA1* (*bottom*) to those with low proportion (GSE117556).⁴⁸ Selected genes statistically enriched in groups of patients are indicated.

See also Figures S5 and S6.

Table 1: Patient characteristics

Disease/ sample type	Tissue	Age at diagnosis (years)	Cell of origin (DLBCL) or grade (FL)	Treatment	CyTOF	scRNAseq	Hyperion
rTonsil	tonsil	61	NA	NA	X		
	tonsil	40	NA	NA	X	X	
	tonsil	29	NA	NA	X	X	
	tonsil	NA	NA	NA	X		
	tonsil	NA	NA	NA	X		
	tonsil	NA	NA	NA	X		
	tonsil	NA	NA	NA		X	
rLN	LN	60	NA	NA	X	X	X
	LN	53	NA	NA	X	X	X
	LN	19	NA	NA	X	X	X
FL	LN	85	1-2	-	X	X	X
	LN	45	3a (relapse)	R-CHOP, Len	X	X	
	LN	75	1-2	-	X	X	
	LN	65	1-2 (relapse)	R-CHOP	X	X	
	LN	65	1-2 (relapse)	R-CHOP	X		
	LN	79	1-2	-	X		X
	LN	79	3a	-	X		
	LN	67	1-2 (relapse)	R-CHOP	X		
	LN	58	1	-	X		X
DLBCL	LN	74	non-GC	-	X		X
	LN	69	non-GC	-	X		X
	LN	52	GC	-	X		X
	LN	74	ABC	-	X	X	X
	LN	75	non-GC	-	X	X	
	LN	53	GC	-	X	X	

*replicate of same patient. ABC : Activated B cell, DLBCL : Diffuse Large B cell Lymphoma, FL : Follicular Lymphoma, GC : Germinal Center, Len : Lenalidomide, LN : Lymph Node, R-CHOP : Rituximab Cyclophosphamide Doxorubicine Vincristine Prednisone, rLN : reactive Lymph Node, scRNASeq : single cell RNASeq, NA : Not applicable.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
CD45 (HI30), 89Y	Standard Biotoools	Cat# 3089003; RRID: AB_2661851
CD326 (9C4), Purified	Biolegend	Cat# 324229; RRID: AB_2563742
CD19 (HIB19), Purified	Biolegend	Cat# 302202; RRID: AB_314232
HLA-DR (10.1), Purified	Biolegend	Cat# 307602; RRID: AB_314680
CD31 (WM59), Purified	Biolegend	Cat# 303127; RRID: AB_2563740
CD16 (B73.1), Purified	Biolegend	Cat# 360702; RRID: AB_2562693
CD64 (L243), Purified	Biolegend	Cat# 305029; RRID: AB_2563759
CD11c (3.9), Purified	Biolegend	Cat# 301602; RRID: AB_314172
CD33 (WM53), Purified	Biolegend	Cat# 303402; RRID: AB_314346
CD209 (9E9A8), Purified	Biolegend	Cat# 330102; RRID: AB_1134253
CD14 (M5E2), Purified	Biolegend	Cat# 301802; RRID: AB_314184
CD123 (6H6), Purified	Biolegend	Cat# 306002; RRID: AB_314576
CD21 (Bu32), Purified	Biolegend	Cat# 354902; RRID: AB_11219188
CD192 (K036C2), Purified	Biolegend	Cat# 357202; RRID: AB_2561851
CD163 (GHI/61), Purified	Biolegend	Cat# 333602; RRID: AB_1088991
CD36 (5-271), Purified	Biolegend	Cat# 336202; RRID: AB_1279228
CD86 (IT2.2), Purified	Biolegend	Cat# 305402; RRID: AB_314522
CD169 (7-239), Purified	Biolegend	Cat# 346002; RRID: AB_2189031
CD274 (29E.2A3), Purified	Biolegend	Cat# 329719; RRID: AB_2565429
CD254 (MIH24), Purified	Biolegend	Cat# 347501; RRID: AB_2044062
CD106 (EPR5047), Purified	abcam	Cat# ab134047; RRID: AB_2721053
CD3 (UCHT1), Purified	Biolegend	Cat# 300402; RRID: AB_314056
CD49a (TS2/7), Purified	Biolegend	Cat# 328302; RRID: AB_1236385
Podoplanin (REA446), Purified	Miltenyi Biotec	Cat# 130-107-017; RRID: AB_2653261
CD80 (2D10), Purified	Biolegend	Cat# 305202; RRID: AB_314498
CD34 (581), Purified	Biolegend	Cat# 343502; RRID: AB_1731898
CD1a (HI149), Purified	Biolegend	Cat# 300102; RRID: AB_314016
CX3CR1 (2A9-1), Purified	Biolegend	Cat# 341602; RRID: AB_1595422
CD32 (FUN-2), Purified	Biolegend	Cat# 303202; RRID: AB_314334
CD54 (HA58), Purified	Biolegend	Cat# 353102; RRID: AB_11204426
CD195 (J418F1), Purified	Biolegend	Cat# 359102; RRID: AB_2562457
CD206 (15-2), Purified	Biolegend	Cat# 321102; RRID: AB_571923
S100A9 (A15105J), Purified	Biolegend	Cat# 600302; RRID: AB_2721747
CD45RA (HI100), Purified	Biolegend	Cat# 304102; RRID: AB_314406
CD172a (15-414), Purified	Biolegend	Cat# 372102; RRID: AB_2629807
CD68 (Y1/82A), Purified	Biolegend	Cat# 333802; RRID: AB_1089058
CD11b (ICRF44), 209Bi	Standard Biotoools	Cat# 3209003; RRID: AB_2687654
CD163 (EDHu- 1), 147Sm	Standard Biotoools	Cat# 3147021D; RRID: AB_2892115
CD31 (EPR3094), 151Eu	Standard Biotoools	Cat# 3151025D; RRID: AB_2890140
CD68 (KP1), Purified	BioLegend	Cat# 916104; RRID: AB_2616797
Podoplanin (D2-40), Purified	BioLegend	Cat# 916606; RRID: AB_2565820
S100A9 (EPR3555), Purified	Abcam	Cat# 227570; RRID: AB_2924317
FPR1 (Polyclonal), Purified	Abcam	Cat# 113531; RRID: AB_10862408
CD31 (JC70), Purified	Roche	Cat# 5463475001; RRID: AB_1516761
ANXA1 (EPR19342), Purified	Abcam	Cat# 214486; RRID: AB_2890907
CD68 (KP-1), Purified	Roche	Cat# 5278252001; RRID: AB_2924322
CD45 (HI30), BV510	BD Biosciences	Cat# 563204; RRID: AB_2738067
CD45 (HI30), purified	Biolegend	Cat# 304002; RRID: AB_314390
CD3 (UCHT1), FITC	Beckman	Cat# A07746; RRID: AB_2801270
CD19 (J3-119), FITC	Beckman	Cat# A07768; RRID: AB_2924802

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

HLA-DR (G46-6), PE-CF594	BD Biosciences	Cat# 562304, RRID: AB_11154415
CD11c (B-ly6), PE	BD Biosciences	Cat# 555392, RRID: AB_395793
CD123 (7G3) PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	Cat# 558714, RRID: AB_1645547
- TotalSeq™-C0081 anti-human CD14 (M5E2)	Biolegend	Cat# 301859, RRID: AB_2800736
- TotalSeq™-C0407 anti-human CD36 (5-271)	Biolegend	Cat# 336227, RRID: AB_2800893
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
EQ Four Element Calibration Beads	Standard Biotoools	Cat# 201078
Antibody Stabilizer PBS	Candor Bioscience	Cat# 131050
Bond-Breaker TCEP Solution	Thermo Fisher Scientific	Cat# 77720
Cell-ID Intercalator-Ir	Standard Biotoools	Cat# 201192B
Cell-ID Cisplatin-198Pt	Standard Biotoools	Cat# 201198
Cell Acquisition Solution	Standard Biotoools	Cat# 201240
SuperBlock™ Blocking Buffer in PBS	Thermo Fisher Scientific	Cat# 37515
PAP Pen	Abcam	Cat# ab2601
DNase (Pulmozyme, 2.5mg / 2.5mL)	Roche	N/A
Collagenase type IV, CLS IV	Worthington	Cat# LS004186
Neutral Protease (Dispase), Purified	Worthington	Cat# LS02100
MgCl2 (1M)	Thermo Fisher Scientific	Cat# AM9530G
4% Sodium Citrate solution	Baxter	Cat# BDB8654
Fc Block	LFB	Cat# Tegeline
- Triton™ X-100	Thermo Fisher Scientific	Cat# 85111
Critical commercial assays		
Transcription factor staining buffer set	Miltenyi Biotec	Cat# 130-122-981
Maxpar X8 Multimetal Antibody Labeling Kit132	Standard Biotoools	Cat# 201300
EnVision flex, High pH	Dako	Cat# K8000
CryoStor® cell cryopreservation media	Sigma-Aldrich	Cat# C2874
Dynabeads anti-CD3	Invitrogen	Cat# 11151D
Dynabeads anti-CD19	Invitrogen	Cat# 11143D
BOND Epitope Retrieval Solution 1	Leica	Cat# AR9961
1X OPAL ANTI-MS + RB HRP	Akoya Biosciences	Cat# ARH1001EA
OPAL 520 Reagent Pack	Akoya Biosciences	Cat# FP1487001KT
OPAL 570 Reagent Pack	Akoya Biosciences	Cat# FP1488001KT
OPAL 620 Reagent Pack	Akoya Biosciences	Cat# FP1495001KT
OPAL 650 Reagent Pack	Akoya Biosciences	Cat# FP1496001KT
10X Spectral DAPI	Akoya Biosciences	Cat# FP1490
PROLONG GOLD antifade mounting reagent	Thermo Fisher Scientific	Cat# P36931
Chromium Next GEM Single Cell 5' V(D)J reagents kits (v1.1)	10X Genomics	N/A
Chromium Next GEM Single Cell 5' Library & Gel Bead Kit v1.1, 16 rxns	10X Genomics	Cat# PN-1000165
Chromium Single Cell 5' Library Construction Kit, 16 rxns	10X Genomics	Cat# PN-1000020
Chromium Single Cell 5' Feature Barcode Library Kit, 16 rxns	10X Genomics	Cat# PN-1000080
Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit, 48 rxns	10X Genomics	Cat# PN-1000120
Single Index Kit T Set A, 96 rxns	10X Genomics	Cat# PN-1000213
Deposited data		
RNaseq	Gloger et al. ⁴⁷	10.1158/0008-5472.can-19-1493
scRNAseq	Menzel et al. ⁴⁵	10.1016/j.celrep.2021.109878

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

scRNAseq	Roider et al. ⁹	10.1038/s41556-020-0532-x
RNA expression	Lenz et al. ⁴⁸	10.1056/nejmoa0802885
Software and algorithms		
Premessa (R package)	https://github.com/ParkerICI/premessa	premess 0.2.6
Cytobank	Kotecha et al. ⁷⁶ Beckman Coulter	N/A
viSNE (Cytobank)	Amir et al. ⁷⁷	N/A
UMAP (Cytobank)	Becht et al. ⁷⁸	N/A
FlowSOM (Cytobank)	Van Gassen et al. ⁷⁹	N/A
RStudio	https://www.rstudio.com/	v1.4.1717
Pheatmap (R package)	https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap	V1.0.12
Spectre (R package)	Ashhurst et al. ⁸⁰ https://immunodynamics.io/spectre	V0.4.6
CellRanger	10X Genomics	v4.0.0
R	https://cran.r-project.org	v4.0.0
Seurat (R package)	Hao et al. ⁸¹ https://satijalab.org/seurat	v4.0.2
Cytoscape		
Python		v3.7
CellphoneDB	Efremova et al. ⁴⁴	v2.0.0
Nichenet	Browaeys et al. ⁴⁶	v1.0.0
MCDViewer	Standard BioTools	v1.0.560.6
FIJI	Schindelin et al. ⁸²	v1.53q
QuPath	Bankhead et al. ⁸³	v0.3.2
Corrplot (R package)	https://cran.r-project.org/package=corrplot	v0.90
Prism (software)	Graphpad	v9
Kaluza	Beckman Coulter	v2.1
Other		
Zeiss AxioScan.Z1 whole-slide scanner	Zeiss	N/A
GentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec	N/A

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Mikael Roussel (mikael.roussel@chu-rennes.fr)

Material Availability

The study did not generate new unique reagents.

Data and Code Availability

Data generated during this study will be shared upon reasonable request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Patients and samples

Patients were recruited under institutional review board approval following informed consent process according to the declaration of Helsinki and the French National Cancer Institute ethic committee recommendations. Tissue samples included tonsils collected from routine tonsillectomy (n = 7), reactive LNs with follicular hyperplasia (n = 3), LNs from FL (n = 9) and DLBCL (n = 6) patients (Table 1). Fresh samples were minced into small fragments of about 2-3mm³, transferred into cryovials containing the cell cryopreservation media Cryostor CS10 (Sigma-Aldrich), and stored in liquid nitrogen. FFPE blocks from the same samples were cut into 4µm sections and placed on Superfrost Plus slides (Fisher) for *in situ* analysis.

METHODS DETAILS

Tissue processing

Cell suspensions enriched in myeloid and stromal cells were obtained as previously described.³³ Briefly, frozen tissue fragments were thawed and incubated for 5 minutes at 37°C in a dissociation buffer containing RPMI-1640 supplemented with 10 U/mL DNase (Roche), 200 U/mL collagenase IV (Worthington Biochemical), 1.6 U/mL neutral protease (Worthington Biochemical), 5 mM MgCl₂, and 1% Penicillin/Streptomycin, before mechanical dissociation with a GentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec), followed by a 40-minutes dissociation at 37°C under a 350-rpm agitation. Cell suspensions were then filtered with a 100 µm cell strainer and washed with a washed buffer containing PBS supplemented with 1% human serum albumin (HSA), 5 mM MgCl₂, and 6.7 mg/mL sodium citrate. To block Fc receptors, cells were incubated for 5 minutes at 4°C in depletion buffer supplemented with 12.5 µg/mL Tegeline before proceeding to myeloid and stromal cells enrichment. A lymphocyte depletion using Dynabeads anti-CD3 (Invitrogen) and Dynabeads anti-CD19 (Invitrogen) was then performed. According to manufacturer's recommendations, cells were incubated for 30 minutes at 4°C with 25 µL of Dynabeads anti-CD3 for 1 x 10⁷ cells and 25 µL of Dynabeads anti-CD19 for 2.5 x 10⁷ cells, with constant rocking on a nutating platform mixer, before magnetic removal of the beads. Cell suspensions enriched in myeloid and stromal cells were then used for CyTOF analysis or MNP FACS-sorting.

Antibodies and reagents for mass cytometry and imaging mass cytometry

Antibodies for mass cytometry and imaging mass cytometry were obtained already conjugated to metals (Standard BioTools) or obtained purified and then conjugated to lanthanide metals, using the MaxPar antibody conjugation kit (Standard BioTools) according to manufacturer's recommendations.⁷⁶ Antibodies used are listed in the Key Resources Table. Protein concentration was then determined by measurement of absorbance at 280 nm before titration on positive controls. Finally, the metal-labeled antibodies were diluted in Candor PBS Antibody Stabilization solution (Candor Bioscience) for long-term storage at 4 °C.

Mass cytometry analysis

Enriched cell suspensions were prepared for CyTOF analysis as previously described.^{33,76} Briefly, cells were stained 5 minutes in RPMI 1640 supplemented with 0.5 μM Cisplatin Cell-ID (Standard BioTools) before washing with 10% FCS in RPMI 1640. Cell pellets were resuspended in 40 μl of 0.5% BSA in PBS. Surface (SB) and intracellular (IB) staining buffer were prepared with antibodies listed in the Key Resources Table. Then 60 μl of SB was added to 40 μl of resuspended cells. After staining, cells were washed in 0.5% BSA in PBS before fixation/permeabilization with a permeabilization buffer (PB) (Transcription factor staining buffer set, Miltenyi Biotec). After washing, 60 μl of IB was added to 40 μl of resuspended cells in PB. After intracellular staining, cells were washed twice before staining in DNA intercalator solution (2.5% Paraformaldehyde, 1:3200 Cell-ID Intercalator-Ir [Standard BioTools] in PBS). Samples were cryopreserved at -80 °C until acquisition on Helios (Standard BioTools).

Multiplex immunofluorescence assay

The BOND RX (Leica Biosystems) was used to automate the staining procedure. After baking and dewaxing, the tissue slides were heat pre-treated using a ER1 (pH6) target retrieval buffer for 15 minutes at 97 °C (AR9961, Leica Biosystems). The slides were then stained for multiplex immunofluorescence using the BOND RX Opal multiplex procedure (v7.0.3.216 RX) in a 4-step protocol with sequential denaturation (ER1 retrieval buffer (pH6), at 97 °C, AR9661, Leica Biosystems) after each staining cycle. Following endogenous peroxidase blocking (15 minutes, ambient temperature, Discovery Inhibitor, Roche, Ventana Medical Systems), tissue slides were incubated using the primary antibodies FPR1 (polyclonal, AB113531, Abcam) at a 1/250 dilution (in Envision Flex diluent (K800621-2, Agilent Technologies), CD31 (ready-to-use, clone JC70,

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

05463475001, Roche Diagnostics), Annexin A1 (clone EPR19342, AB214486, Abcam) at a 1/600 dilution (in Envision Flex diluent (K800621-2, Agilent Technologies), and CD68 (ready-to-use, clone KP-1, 05278252001, Roche Diagnostics). Each target was linked using the OPAL Polymer HRP conjugated secondary antibodies (ready-to-use, ARH1001EA, AKOYA Biosciences). Visualization of the different targets was established using the OPAL Polaris 570 (FP1488001KT, AKOYA Biosciences), OPAL Polaris 520 (FP1487001KT, AKOYA Biosciences), OPAL Polaris 620 (FP1495001KT, AKOYA Biosciences) and OPAL Polaris 650 (FP1496001KT, AKOYA Biosciences) detection kits, respectively. The tissue slides were counterstained using Spectral DAPI (FP1490, AKOYA Biosciences) and mounted with PROLONG GOLD antifade mounting reagent (P36931, ThermoFisher). Fluorescent stained whole tissue slides were scanned in 16 bits using the Zeiss AxioScan.Z1 (Carl Zeiss) whole-slide scanner equipped with a Colibri 7 solid-state light source and appropriate filter cubes.

Imaging Mass Cytometry Acquisition

Two successive tissue sections were used. The first one was colored with hematoxylin-eosin-saffron (HES) to select the regions of interest to ablate. The second section was used for IMC staining. After baking and dewaxing, the tissue sections for IMC were heat pre-treated using a target retrieval solution for 30 min at 95°C (K8000, EnVision flex target retrieval solution, pH9 (Agilent Technologies)). Slides were cooled down for 20 min at room temperature before rinsing with water and PBS, and were then incubated 45 min with SuperBlock Blocking Buffer (#37515, ThermoScientific). Tissue sections were next incubated overnight with antibody cocktail diluted in 0,5% BSA in PBS in humidified chamber. Antibodies used are listed in the Key Resources Table. The following day, slides were successively rinsed with 0,2% Triton X-100 in PBS (#85111, ThermoScientific) and PBS, before Iridium intercalator staining during 30 min (#201192A, Standard BioTools) and drying. Two ROI per sample were acquired using the Hyperion Imaging Mass Cytometry (Standard BioTools) after tuning the instrument according to the manufacturer's instructions. Tissues were ablated at 200 Hz.

MNP isolation, HTO barcoding, and CITE-seq

Cell suspensions enriched in myeloid cells were stained for 30 minutes at 4°C with different antibodies for cell sorting, cell hashing, and cellular indexing of epitopes by sequencing. Antibodies used are listed in the Key Resources Table. Cell sorting was performed on a Aria

Fusion sorter. For each sample, CD45^{pos} CD3^{neg} CD19^{neg} HLA-DR^{pos} CD11c^{pos} and CD45^{pos} CD3^{neg} CD19^{neg} HLA-DR^{pos} CD11c^{neg} CD123^{neg} MNP populations were sorted and pooled, respecting their initial ratio (Figure S3A). Most samples were barcoded, we used homemade hashtag-oligo (HTO) for cell hashing, where oligo-tagged antibodies against CD45 uniquely label cells from distinct samples, which can be subsequently pooled. The homemade HTO were generated following the recommendations of the NYGCTech lab in their CITE-seq Hyper Antibody-Oligo Conjugation protocol version 2019-03-20. Samples were pooled after sorting and before library preparation, at a 1:1 cell ratio. Cytometry data are presented using Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter).

Library preparation and sequencing

Sorted MNP were converted to barcoded scRNASeq gene expression and cell surface protein libraries using Chromium Next GEM Single Cell 5' V(D)J reagents kits (v1.1) (10X Genomics) with feature barcode technology for Cell surface protein compatible with CITE-seq antibodies, according to manufacturer's recommendations (CG000208 Rev E), with an aim of 6000 cells per library. HTO libraries were generated by PCR on 5 ng of DNA amplification product (purified for cell surface protein library) using Kapa Hifi PCR Master Mix, 10 μM 10X Genomics SI-PCR primer and 10 μM Illumina TruSeq DNA D7xx primers, followed by 1.6X SPRIselect (Beckman Coulter) purification. Library quality controls and quantifications were performed using a 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA kit (Agilent). Libraries were then pooled (85% gene expression, 10% cell surface protein, 5% HTO) and subsequently sequenced on a NovaSeq 6000.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Mass Cytometry Preprocessing

After acquisition, intrafile signal drift was normalized and .fcs files were obtained using CyTOF software. To diminish batch effects, all files were normalized on EQ Beads (Fluidigm Sciences) using the premissa R package. Files were then uploaded to the Cytobank cloud-based platform (Beckman Coulter). Data were first arcsinh-transformed using a cofactor of 5. For all files, live single cells were selected by applying a gate on DNA1 vs. DNA2 followed by a gate on DNA1 vs. Cisplatin, then beads were removed by applying a gate on the beads channel (Ce140Di) vs. DNA.1. For each sample, we performed successive viSNE, which is based upon the Barnes–Hut implementation of t-SNE, using all markers included in our panel, to remove contaminating B,

T and low-quality cells, and selected all CD45^{neg} cells on one hand and all CD45^{pos} HLA-DR^{pos} CD3^{neg} CD19^{neg} cells on the other hand.

Mass Cytometry dimension reduction and clustering

For each population of interest, i.e. stromal/endothelial CD45^{neg} cells (594,946 cells [n = 79,955 for DLBCL, n = 105,344 for FL, n = 86,839 for rLN, and n = 322,808 for rTonsil]) and myeloid CD45^{pos} HLA-DR^{pos} CD3^{neg} CD19^{neg} cells (658,206 MNP [n = 138,374 for DLBCL, n = 152,000 for FL, n = 236,902 for rLN, and n = 130,930 for rTonsil]), we performed separate UMAP dimension reductions, using all parameters except CD3, CD19, and CD45. Then we applied a clustering method using the FlowSOM clustering algorithm. FlowSOM uses Self-Organizing Maps (SOMs) to partition cells into clusters based on their phenotype, and then builds a Minimal Spanning Tree (MST) to connect the nodes of the SOM, allowing the identification of metaclusters (i.e. group of clusters). We performed the FlowSOM algorithm on the previous UMAP results, using all events and all channels except CD3, CD19, and CD45, and the following parameters: clustering method = hierarchical consensus, iterations = 10, number of clusters = 100, number of metaclusters = 12 (for the stromal/endothelial population) or 13 (for myeloid cells). For both populations, each metacluster was manually annotated based on his marker expression phenotype, his projection on the UMAP, and his localization in the FlowSOM MST. Two stromal/endothelial metaclusters were merged into one, leading to the identification of 11 metaclusters. Single cell, clusters and metaclusters informations, including their abundances and mean marker intensities, were then exported from Cytobank for further analyses. Data representation, hierarchical clustering, and heatmaps were generated with R v4.0.0, using Rstudio v1.4.1717, and pheatmap and Spectre⁷⁷ packages.

Single cell RNASeq Preprocessing

After sequencing, libraries were mapped to the human GRCh38 genome and demultiplexed using CellRanger (10X Genomics, v.4.0.0). Data from each library were then further processed using the R package Seurat (v.4.0.2) on R v.4.0.0 with Rstudio v1.4.1717. Genes expressed in three or fewer cells were excluded from downstream analysis. For each library, cells expressing a number of genes above or below 2 median absolute deviations (MAD) or a percentage of mitochondrial transcripts above 2 MAD were filtered out. Cell surface protein and HTO counts were normalized using the centered log ratio transformation (CLR) method from the

NormalizeData function. HTO-tagged samples were demultiplexed using the HTODemux function with a positive quantile threshold set to 0.95. Gene expression counts were normalized using the NormalizeData function with the default scale factor of 10,000.

Single cell RNASeq integration, dimension reduction, and clustering

We used the standard anchor-based workflow for dataset integration in Seurat to adjust for technical and biological sources of variation between samples. All samples were then merged together and integrated data were scaled and centered using the ScaleData function. We then performed a principal component analysis (PCA) based on the top 2000 variable features followed by a graph-based clustering using the FindNeighbors and the FindCluster functions, with a resolution of 0.4. Results were visualized using a nonlinear dimensional reduction UMAP and cell clusters were annotated based on the expression of canonical markers. Then, we focused on MNP clusters. All cells included in the MNP clusters previously identified (i.e. moMac, Mac-C1Q, SIGLEC6-cDC, CLEC9A-cDC1, LAMP3-cDC, cDC2, MNDA-cDC2) were extracted, and the same integration, scaling, clustering (resolution of 0.65), annotation, and visualization workflow was applied.

Differentially expressed genes analysis

Differentially expressed (DE) genes analysis was performed using the FindMarker Seurat function, with a minimal fold-change of 1.5, a minimum of 30% of gene-expressing cells in at least one of the sets of cells compared, and the default Wilcoxon rank sum test. Adjusted p-values were obtained with a Bonferroni correction using all genes in the dataset. To address inter-samples heterogeneity, we performed multiple DE genes analyses while iteratively removing one of the samples from the analyses, and kept only “robust” DE genes that were found statistically DE in all sub-analyses. We performed DE genes analyses to compare sample types (i.e. rTonsil, rLN, FL, DLBCL) for global monocyte/macrophages population as a whole (Mo&Mac metacluster) (Table S1).and then for all individual MNP clusters (i.e. CD14-moMac, S100-moMac, CD16-moMac, IL1b-moMac, Mac-C1Q) and DC clusters (i.e. MNDA-cDC2, CD1E-cDC2, CREM-cDC2, LAMP3-cDC, SIGLEC6-cDC, CLEC9A-cDC1) (Table S2).

Volcano plots were created with the R package EnhancedVolcano. Pathway enrichment analysis and visualization of DE gene was performed following Reimand et al. recommendations⁴², using g:Profiler and EnrichmentMap application on Cytoscape. DE gene lists were defined as

described above and ranked by \log_2FC . Pathway enrichment analysis with g:Profiler was performed on ordered gene lists on Reactome and GO:Biological processes databases while removing not manually reviewed annotations, with a q-value <0.01 , a size of query/term intersection ≥ 3 , and a size of functional category between 5 and 350. Results were exported and subsequently uploaded in Cytoscape for visualization with EnrichmentMap, with a FDR q-value cutoff set to 1 and selection of the “Filter genes by expression” option. The prefuse force directed layout algorithm weighted using the gene set similarity coefficient was chosen for visualization. Auto annotation followed by manual arrangement of network nodes and updating of theme labels was then conducted, and nodes were colored based on their gene list of origin. Genes co-expressions were assessed using the FeatureScatter tool from the Seurat package and Pearson correlations.

Protein activity analysis

The R package PISCES is a regulatory-network-based methodology for the analysis of single cell gene expression profiles that allows protein activity inference.⁷⁸ Data were normalized using SCTransform and CorDist functions, then cluster-specific metacells were generated with a minimum of 200 cells included. These metacells were used as inputs for gene networks generation with the R package corto,⁷⁹ using as centroids DoRotheA regulons (confidence level A to E)⁸⁰ and a p-value $<1.10^{-10}$. After creation of a PISCES object, CPM normalization, and generation of a gene expression signature, the protein activity signature was obtained with VIPER. As protein activity includes scaled negative values, we applied a linear correction to the inferred protein data and set the minimum protein activity value to zero before DE analysis. DE analysis, volcano plots, and pathway enrichment analysis and visualization were performed as previously described for gene expression data.

Analysis of public datasets

We used 2 published stromal/endothelial murine lymphoma datasets for the analysis of interactions between our MNP scRNASeq dataset and BEC.^{44,47} For the CellphoneDB analysis, we collected scRNAseq data generated from E μ -Myc lymphoma mice LN BEC.⁴⁴ Using the homologene R package, we generated a conversion table of the mouse gene names into human gene names, then filtered each mouse name to match a unique human gene and created a Seurat object by matching each count to each converted mouse gene name. For the Nichenet

analysis, we used bulk RNAseq data generated from the same mouse model,⁴⁷ after a similar conversion of mouse gene names into human gene names using the homologene R package.

Interactome analysis

Interactome analyses were performed with CellPhoneDB (v2.0.0)⁴⁵ on Python v3.7 and Nichenet (v1.0.0)⁴⁶ on R v.4.0.0 with Rstudio v1.4.1717. CellPhoneDB is a manual curated repository of ligands, receptors and their interactions, integrated with a statistical framework for inferring cell-cell communication networks from single cell transcriptome data. Only receptors and ligands expressed in more than 10% of the cells in any given population were considered. We performed pairwise comparisons between all moMac clusters (Mo&Mac metacluster and all individual MNP clusters [i.e. CD14-moMac, S100-moMac, CD16-moMac, IL1b-moMac, Mac-C1Q]) from our dataset and published BEC populations from lymphoma mice.⁴⁴ Ligand-receptor interaction scores were computed and tested using CellPhoneDB statistical analysis method with the default parameters and a p-value threshold set at 0.05. We then focused on statistically relevant predicted interactions involving up- or down-regulated genes in DLBCL vs rLN moMac, either at the RNA level or inferred with PISCES.

We used the Nichenet R package to identify top ligand-receptor and ligand-targets interactions between DLBCL-moMac and lymphoma-BEC. For this approach, we created a data matrix using the Seurat function AverageExpression on moMac from each sample to mimic bulk RNAseq data. We defined a DLBCL-moMac signature as the genes up- or down-regulated in DLBCL compared to rLN either at the RNA level or inferred with PISCES. For BEC, we used the published dataset GSE126033,⁴⁷ after converting murine genes into human genes. Expressed genes were defined in sender and receiver cells as an average log₂ expression above 0.2 for moMac and 7 for BEC. The DLBCL-moMac signature was used as the gene set of interest in the receiver population (i.e. DLBCL-moMac) to predict how ligands can impact target genes and rank receptors according to their activity. Then the best upstream ligands expressed by sender cells (i.e. BEC) were filtered.

Segmentation and data analysis for imaging mass cytometry

MCD files were converted to ome.tiff format through MCDViewer (Standard BioTools). We normalized all ROI (99th percentile normalization) and performed a scaling between 0 to 100 using FIJI software.⁸¹ Blood vessels were constituted of BEC defined as CD31^{pos} PDPN^{neg}

annotations using the QuPath Software's pixel classification. Areas of 25µm around the blood vessels structure were arbitrary defined using the Expand annotations function in QuPath. Due to their complex morphology, macrophages were segmented using the cell detection command in QuPath based on the expression of CD68, CD163, and S100A9. CSV files of cells detections were exported from QuPath to the OMIQ software (Dotmatics) for further analyses.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Graphpad Prism 9.0.0 or R v4.0.0, using Rstudio v1.4.1717. P values were defined by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post-test for multiple group comparisons or by Wilcoxon matched-pairs signed rank tests as appropriate. Correlations were calculated using Spearman test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Heatmaps were generated with the pheatmap package and correlation matrixes were built with the corrplot package. Hierarchical clustering of the patients was performed using euclidean distance and ward.D2 clustering.

Literature cited

1. Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390. 10.1182/blood-2016-01-643569.
2. Scholler, N., Perbost, R., Locke, F.L., Jain, M.D., Turcan, S., Danan, C., Chang, E.C., Neelapu, S.S., Miklos, D.B., Jacobson, C.A., et al. (2022). Tumor immune contexture is a determinant of anti-CD19 CAR T cell efficacy in large B cell lymphoma. *Nat Med* 28, 1872–1882. 10.1038/s41591-022-01916-x.
3. Kotlov, N., Bagaev, A., Revuelta, M.V., Phillip, J.M., Cacciapuoti, M.T., Antysheva, Z., Svekolkin, V., Tikhonova, E., Mihecheva, N., Kuzkina, N., et al. (2021). Clinical and Biological Subtypes of B-cell Lymphoma Revealed by Microenvironmental Signatures. *Cancer Discov* 11, 1468–1489. 10.1158/2159-8290.cd-20-0839.
4. Milpied, P., Gandhi, A.K., Cartron, G., Pasqualucci, L., Tarte, K., Nadel, B., and Roulland, S. (2021). Follicular lymphoma dynamics. *Adv Immunol* 150, 43–103. 10.1016/bs.ai.2021.05.002.
5. Lamaison, C., and Tarte, K. (2021). B cell/stromal cell crosstalk in health, disease, and treatment: Follicular lymphoma as a paradigm. *Immunol Rev* 302, 273–285. 10.1111/imr.12983.
6. Han, G., Deng, Q., Marques-Piubelli, M.L., Dai, E., Dang, M., Ma, M.C.J., Li, X., Yang, H., Henderson, J., Kudryashova, O., et al. (2022). Follicular Lymphoma Microenvironment Characteristics Associated with Tumor Cell Mutations and MHC Class II Expression. *Blood Cancer Discov*, OF1–OF16. 10.1158/2643-3230.bcd-21-0075.
7. Abe, Y., Sakata-Yanagimoto, M., Fujisawa, M., Miyoshi, H., Suehara, Y., Hattori, K., Kusakabe, M., Sakamoto, T., Nishikii, H., Nguyen, T.B., et al. (2022). A single-cell atlas of non-haematopoietic cells in human lymph nodes and lymphoma reveals a landscape of stromal remodelling. *Nat Cell Biol* 24, 565–578. 10.1038/s41556-022-00866-3.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

8. Haebe, S., Shree, T., Sathe, A., Day, G., Czerwinski, D.K., Grimes, S.M., Lee, H., Binkley, M.S., Long, S.R., Martin, B., et al. (2021). Single-cell analysis can define distinct evolution of tumor sites in follicular lymphoma. *Blood* *137*, 2869–2880. 10.1182/blood.2020009855.
9. Roeder, T., Seufert, J., Uvarovskii, A., Frauhammer, F., Bordas, M., Abedpour, N., Stolarczyk, M., Mallm, J.-P., Herbst, S.A., Bruch, P.-M., et al. (2020). Dissecting intratumour heterogeneity of nodal B-cell lymphomas at the transcriptional, genetic and drug-response levels. *Nature cell biology*, 1–27. 10.1038/s41556-020-0532-x.
10. Ma, R.-Y., Black, A., and Qian, B.-Z. (2022). Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends Immunol* *43*, 546–563. 10.1016/j.it.2022.04.008.
11. Lopez-Yrigoyen, M., Cassetta, L., and Pollard, J.W. (2021). Macrophage targeting in cancer. *Ann Ny Acad Sci* *1499*, 18–41. 10.1111/nyas.14377.
12. Pittet, M.J., Michielin, O., and Migliorini, D. (2022). Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat Rev Clin Oncol*, 1–20. 10.1038/s41571-022-00620-6.
13. DeNardo, D.G., and Ruffell, B. (2019). Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* *19*, 369–382. 10.1038/s41577-019-0127-6.
14. Farinha, P., Masoudi, H., Skinnider, B.F., Shumansky, K., Spinelli, J.J., Gill, K., Klasa, R., Voss, N., Connors, J.M., and Gascoyne, R.D. (2005). Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* *106*, 2169–2174. 10.1182/blood-2005-04-1565.
15. Canioni, D., Salles, G., Mounier, N., Brousse, N., Keuppens, M., Morchhauser, F., Lamy, T., Sonet, A., Rousset, M.-C., Foussard, C., et al. (2008). High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. *Journal of clinical oncology* *26*, 440–446. 10.1200/jco.2007.12.8298.
16. Kridel, R., Steidl, C., and Gascoyne, R.D. (2015). Tumor-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* *100*, 143–145. 10.3324/haematol.2015.124008.
17. Marchesi, F., Cirillo, M., Bianchi, A., Gately, M., Olimpieri, O.M., Cerchiara, E., Renzi, D., Micera, A., Balzamino, B.O., Bonini, S., et al. (2014). High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM) at diagnosis is significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematological oncology*, n/a-n/a. 10.1002/hon.2142.
18. Nam, S.J., Kim, S., Kwon, D., Kim, H., Kim, S., Lee, E., Kim, T.M., Heo, D.S., Park, S.H., Lim, M.S., et al. (2018). Prognostic implications of tumor-infiltrating macrophages, M2 macrophages, regulatory T-cells, and indoleamine 2,3-dioxygenase-positive cells in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Oncoimmunology* *7*, 1–39. 10.1080/2162402x.2018.1442164.
19. Riihijarvi, S., Fiskvik, I., Taskinen, M., Vajavaara, H., Tikkala, M., Yri, O., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Delabie, J., Smeland, E., Holte, H., et al. (2015). Prognostic influence of macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a correlative study from a Nordic phase II trial. *Haematologica* *100*, 238–245. 10.3324/haematol.2014.113472.
20. Taskinen, M., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Nyman, H., Eerola, L.-M., and Leppä, S. (2007). A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clinical Cancer Research* *13*, 5784–5789. 10.1158/1078-0432.ccr-07-0778.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

21. McCord, R., Bolen, C.R., Koeppen, H., Kadel, E.E., Oestergaard, M.Z., Nielsen, T., Sehn, L.H., and Venstrom, J.M. (2019). PD-L1 and tumor-associated macrophages in de novo DLBCL. *Blood Advances* 3, 531–540. 10.1182/bloodadvances.2018020602.
22. Vari, F., Arpon, D., Keane, C., Hertzberg, M.S., Talaulikar, D., Jain, S., Cui, Q., Han, E., Tobin, J., Bird, R., et al. (2018). Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* 131, 1809–1819. 10.1182/blood-2017-07-796342.
23. Autio, M., Leivonen, S.-K., Brück, O., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Pellinen, T., and Leppä, S. (2021). Clinical Impact of Immune Cells and Their Spatial Interactions in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Microenvironment. *Clin Cancer Res*, clincanres.CCR-21-3140-A.2021. 10.1158/1078-0432.ccr-21-3140.
24. Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Tang, C., Myklebust, J.H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A.C., Chan, C.K., Tan, B.T., et al. (2010). Anti-CD47 Antibody Synergizes with Rituximab to Promote Phagocytosis and Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma. *Cell* 142, 699–713. 10.1016/j.cell.2010.07.044.
25. Epron, G., Ame-Thomas, P., Priol, J.L., Pangault, C., Dulong, J., Lamy, T., Fest, T., and Tarte, K. (2012). Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia* 26, 139–148. 10.1038/leu.2011.179.
26. Amin, R., Mourcin, F., Uhel, F., Pangault, C., Ruminy, P., Dupré, L., Guirriec, M., Marchand, T., Fest, T., Lamy, T., et al. (2015). DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood* 126, 1911–1920. 10.1182/blood-2015-04-640912.
27. Chiodin, G., Allen, J.D., Bryant, D.J., Rock, P., Martino, E.A., Valle-Argos, B., Duriez, P.J., Watanabe, Y., Henderson, I., Blachly, J.S., et al. (2021). Insertion of atypical glycans into the tumor antigen-binding site identifies DLBCLs with distinct origin and behavior. *Blood* 138, 1570–1582. 10.1182/blood.2021012052.
28. Linley, A., Krysov, S., Ponzoni, M., Johnson, P.W., Packham, G., and Stevenson, F.K. (2015). Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood* 126, 1902–1910. 10.1182/blood-2015-04-640805.
29. Guilloton, F., Caron, G., Ménard, C., Pangault, C., Amé-Thomas, P., Dulong, J., Vos, J.D., Rossille, D., Henry, C., Lamy, T., et al. (2012). Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood* 119, 2556–2567. 10.1182/blood-2011-08-370908.
30. Shen, L., Li, H., Shi, Y., Wang, D., Gong, J., Xun, J., Zhou, S., Xiang, R., and Tan, X. (2016). M2 tumour-associated macrophages contribute to tumour progression via legumain remodelling the extracellular matrix in diffuse large B cell lymphoma. *Scientific reports* 6, 30347. 10.1038/srep30347.
31. Bellomo, A., Gentek, R., Bajénoff, M., and Baratin, M. (2018). Lymph node macrophages: Scavengers, immune sentinels and trophic effectors. *Cell Immunol* 330, 168–174. 10.1016/j.cellimm.2018.01.010.
32. Dasoveanu, D.C., Park, H.J., Ly, C.L., Shipman, W.D., Chyou, S., Kumar, V., Tarlinton, D., Ludewig, B., Mehrara, B.J., and Lu, T.T. (2020). Lymph node stromal CCL2 limits antibody responses. *Sci Immunol* 5. 10.1126/sciimmunol.aaw0693.
33. Ferrant, J., Gallou, S.L., Manson, G., Genebrier, S., Mourcin, F., Tarte, K., and Roussel, M. (2020). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Methods Mol Biology* 2236, 57–66. 10.1007/978-1-0716-1060-2_6.
34. Bhattacharjee, A., Rodrigues, E., Jung, J., Luzentales-Simpson, M., Enterina, J.R., Galleguillos, D., Laurent, C.D.St., Nakhaei-Nejad, M., Fuchsberger, F.F., Streith, L., et al. (2019). Repression of phagocytosis by human CD33 is not conserved with mouse CD33. *Commun Biology* 2, 450. 10.1038/s42003-019-0698-6.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

35. Zhang, Q., He, Y., Luo, N., Patel, S.J., Han, Y., Gao, R., Modak, M., Carotta, S., Haslinger, C., Kind, D., et al. (2019). Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell* 179, 829-845.e20. 10.1016/j.cell.2019.10.003.
36. Cheng, S., Li, Z., Gao, R., Xing, B., Gao, Y., Yang, Y., Qin, S., Zhang, L., Ouyang, H., Du, P., et al. (2021). A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell* 184, 792-809.e23. 10.1016/j.cell.2021.01.010.
37. Villar, J., and Segura, E. (2020). Decoding the Heterogeneity of Human Dendritic Cell Subsets. *Trends Immunol* 41, 1062–1071. 10.1016/j.it.2020.10.002.
38. Brown, C.C., Gudjonson, H., Pritykin, Y., Deep, D., Lavallée, V.-P., Mendoza, A., Fromme, R., Mazutis, L., Ariyan, C., Leslie, C., et al. (2019). Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. *Cell* 179, 846-863.e24. 10.1016/j.cell.2019.09.035.
39. Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356, eaah4573-14. 10.1126/science.aah4573.
40. See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356, eaag3009. 10.1126/science.aag3009.
41. Veglia, F., Sanseviero, E., and Gabrilovich, D.I. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol*, 1–14. 10.1038/s41577-020-00490-y.
42. Reimand, J., Isserlin, R., Voisin, V., Kucera, M., Tannus-Lopes, C., Rostamianfar, A., Wadi, L., Meyer, M., Wong, J., Xu, C., et al. (2019). Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc* 14, 482–517. 10.1038/s41596-018-0103-9.
43. Obradovic, A., Vlahos, L., Laise, P., Worley, J., Tan, X., Wang, A., and Califano, A. (2022). PISCES: A pipeline for the Systematic, Protein Activity-based Analysis of Single Cell RNA Sequencing Data. *Biorxiv*, 2021.05.20.445002. 10.1101/2021.05.20.445002.
44. Efremova, M., Vento-Tormo, M., Teichmann, S.A., and Vento-Tormo, R. (2020). CellPhoneDB: inferring cell–cell communication from combined expression of multi-subunit ligand–receptor complexes. *Nat Protoc* 15, 1484–1506. 10.1038/s41596-020-0292-x.
45. Menzel, L., Zschummel, M., Crowley, T., Franke, V., Grau, M., Ulbricht, C., Hauser, A., Siffrin, V., Bajénoff, M., Acton, S.E., et al. (2021). Lymphocyte access to lymphoma is impaired by high endothelial venule regression. *Cell Reports* 37, 109878. 10.1016/j.celrep.2021.109878.
46. Browaeys, R., Saelens, W., and Saeys, Y. (2020). NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nat Methods* 17, 159–162. 10.1038/s41592-019-0667-5.
47. Gloger, M., Menzel, L., Grau, M., Vion, A.-C., Anagnostopoulos, I., Zapukhlyak, M., Gerlach, K., Kammertöns, T., Hehlhans, T., Zschummel, M., et al. (2020). Lymphoma Angiogenesis Is Orchestrated by Noncanonical Signaling Pathways. *Cancer Res* 80, 1316–1329. 10.1158/0008-5472.can-19-1493.
48. Lenz, G., Wright, G., Dave, S.S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., et al. (2008). Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *New Engl J Medicine* 359, 2313–2323. 10.1056/nejmoa0802885.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

49. Mulder, K., Patel, A.A., Kong, W.T., Piot, C., Halitzki, E., Dunsmore, G., Khalilnezhad, S., Irac, S.E., Dubuisson, A., Chevrier, M., et al. (2021). Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity* *54*, 1883-1900.e5. 10.1016/j.immuni.2021.07.007.
50. Roussel, M., Lhomme, F., Roe, C.E., Bartkowiak, T., Gravelle, P., Laurent, C., Fest, T., and Irish, J.M. (2020). Mass cytometry defines distinct immune profile in germinal center B-cell lymphomas. *Cancer Immunol Immunother* *69*, 407–420. 10.1007/s00262-019-02464-z.
51. Ninomiya, S., Hara, T., Tsurumi, H., Hoshi, M., Kanemura, N., Goto, N., Kasahara, S., Shimizu, M., Ito, H., Saito, K., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor tissue indicates prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Ann Hematol* *90*, 409–416. 10.1007/s00277-010-1093-z.
52. Yoshikawa, T., Hara, T., Tsurumi, H., Goto, N., Hoshi, M., Kitagawa, J., Kanemura, N., Kasahara, S., Ito, H., Takemura, M., et al. (2010). Serum concentration of L-kynurenine predicts the clinical outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Eur J Haematol* *84*, 304–309. 10.1111/j.1600-0609.2009.01393.x.
53. Barkal, A.A., Weiskopf, K., Kao, K.S., Gordon, S.R., Rosental, B., Yiu, Y.Y., George, B.M., Markovic, M., Ring, N.G., Tsai, J.M., et al. (2018). Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nat Immunol* *19*, 76–84. 10.1038/s41590-017-0004-z.
54. Xu-Monette, Z., Xiao, M., Au, Q., Padmanabhan, R., Xu, B., Hoe, N., Rodriguez-Perales, S., Torres-Ruiz, R., Manyam, G., Visco, C., et al. (2019). Immune profiling and quantitative analysis decipher the clinical role of immune checkpoint expression in the tumor immune microenvironment of DLBCL. *Cancer Immunol Res* *7*, canimm.0439.2018. 10.1158/2326-6066.cir-18-0439.
55. Clear, A.J., Lee, A.M., Calaminici, M., Ramsay, A.G., Morris, K.J., Hallam, S., Kelly, G., Macdougall, F., Lister, T.A., and Gribben, J.G. (2010). Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood* *115*, 5053–5056. 10.1182/blood-2009-11-253260.
56. Passalidou, E., Stewart, M., Trivella, M., Steers, G., Pillai, G., Dogan, A., Leigh, I., Hatton, C., Harris, A., Gatter, K., et al. (2003). Vascular patterns in reactive lymphoid tissue and in non-Hodgkin's lymphoma. *Brit J Cancer* *88*, 553–559. 10.1038/sj.bjc.6600742.
57. Ruan, J., Hyjek, E., Kermani, P., Christos, P.J., Hooper, A.T., Coleman, M., Hempstead, B., Leonard, J.P., Chadburn, A., and Rafii, S. (2006). Magnitude of Stromal Hemangiogenesis Correlates with Histologic Subtype of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clin Cancer Res* *12*, 5622–5631. 10.1158/1078-0432.ccr-06-1204.
58. Silverstein, R.L., and Febbraio, M. (2009). CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Sci Signal* *2*, re3. 10.1126/scisignal.272re3.
59. Kazerounian, S., Duquette, M., Reyes, M.A., Lawler, J.T., Song, K., Perruzzi, C., Primo, L., Khosravi-Far, R., Bussolino, F., Rabinovitz, I., et al. (2011). Priming of the vascular endothelial growth factor signaling pathway by thrombospondin-1, CD36, and spleen tyrosine kinase. *Blood* *117*, 4658–4666. 10.1182/blood-2010-09-305284.
60. McArthur, S., Gobbetti, T., Kusters, D.H.M., Reutelingsperger, C.P., Flower, R.J., and Perretti, M. (2015). Definition of a Novel Pathway Centered on Lysophosphatidic Acid To Recruit Monocytes during the Resolution Phase of Tissue Inflammation. *Journal of Immunology* *195*, 1139–1151. 10.4049/jimmunol.1500733.
61. McArthur, S., Juban, G., Gobbetti, T., Desgeorges, T., Theret, M., Gondin, J., Toller-Kawahisa, J.E., Reutelingsperger, C.P., Chazaud, B., Perretti, M., et al. (2020). Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *J Clin Invest* *130*, 1156–1167. 10.1172/jci124635.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

62. Li, Y., Cai, L., Wang, H., Wu, P., Gu, W., Chen, Y., Hao, H., Tang, K., Yi, P., Liu, M., et al. (2011). Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene* *30*, 3887–3899. 10.1038/onc.2011.112.
63. Pupjalis, D., Goetsch, J., Kottas, D.J., Gerke, V., and Rescher, U. (2011). Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling. *Embo Mol Med* *3*, 102–114. 10.1002/emmm.201000113.
64. Moraes, L.A., Kar, S., Foo, S.L., Gu, T., Toh, Y.Q., Ampomah, P.B., Sachaphibulkij, K., Yap, G., Zharkova, O., Lukman, H.M., et al. (2017). Annexin-A1 enhances breast cancer growth and migration by promoting alternative macrophage polarization in the tumour microenvironment. *Sci Rep-uk* *7*, 17925. 10.1038/s41598-017-17622-5.
65. Boudhraa, Z., Bouchon, B., Viillard, C., D'Incan, M., and Degoul, F. (2016). Annexin A1 localization and its relevance to cancer. *Clin Sci* *130*, 205–220. 10.1042/cs20150415.
66. Liu, M., Zhao, J., Chen, K., Bian, X., Wang, C., Shi, Y., and Wang, J.M. (2012). G protein-coupled receptor FPR1 as a pharmacologic target in inflammation and human glioblastoma. *Int Immunopharmacol* *14*, 283–288. 10.1016/j.intimp.2012.07.015.
67. Cheng, T., Wu, M., Lin, J., Lin, M., Shun, C., Huang, H., Hua, K., and Kuo, M. (2012). Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway. *Cancer* *118*, 5757–5767. 10.1002/cncr.27565.
68. Belvedere, R., Bizzarro, V., Popolo, A., Piazz, F.D., Vasaturo, M., Picardi, P., Parente, L., and Petrella, A. (2014). Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. *Bmc Cancer* *14*, 961. 10.1186/1471-2407-14-961.
69. Foo, S.L., Sachaphibulkij, K., Lee, C.L.Y., Yap, G.L.R., Cui, J., Arumugam, T., and Lim, L.H.K. (2022). Breast cancer metastasis to brain results in recruitment and activation of microglia through annexin-A1/formyl peptide receptor signaling. *Breast Cancer Res* *24*, 25. 10.1186/s13058-022-01514-2.
70. Jong, M.M.E. de, Kellermayer, Z., Papazian, N., Tahri, S., Bruinink, D.H. op, Hoogenboezem, R., Sanders, M.A., Woestijne, P.C. van de, Bos, P.K., Khandanpour, C., et al. (2021). The multiple myeloma microenvironment is defined by an inflammatory stromal cell landscape. *Nat Immunol* *22*, 769–780. 10.1038/s41590-021-00931-3.
71. Azaoui, I., Uhel, F., Rossille, D., Pangault, C., Dulong, J., Priol, J.L., Lamy, T., Houot, R., Gouill, S.L., Cartron, G., et al. (2016). T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood* *128*, 1081–1092. 10.1182/blood-2015-08-662783.
72. Ferrant, J., Lhomme, F., Gallou, S.L., Irish, J.M., and Roussel, M. (2021). Circulating Myeloid Regulatory Cells: Promising Biomarkers in B-Cell Lymphomas. *Front Immunol* *11*, 623993. 10.3389/fimmu.2020.623993.
73. Gallou, S.L., Lhomme, F., Irish, J.M., Mingam, A., Pangault, C., Monvoisin, C., Ferrant, J., Azaoui, I., Rossille, D., Bouabdallah, K., et al. (2021). Nonclassical Monocytes Are Prone to Migrate Into Tumor in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Immunol* *12*, 755623. 10.3389/fimmu.2021.755623.
74. Steen, C.B., Luca, B.A., Esfahani, M.S., Azizi, A., Sworder, B.J., Nabet, B.Y., Kurtz, D.M., Liu, C.L., Khameneh, F., Advani, R.H., et al. (2021). The landscape of tumor cell states and ecosystems in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 10.1016/j.ccell.2021.08.011.
75. Millard, S.M., Heng, O., Opperman, K.S., Sehgal, A., Irvine, K.M., Kaur, S., Sandrock, C.J., Wu, A.C., Magor, G.W., Batoon, L., et al. (2021). Fragmentation of tissue-resident macrophages during isolation confounds analysis of single-cell preparations from mouse hematopoietic tissues. *Cell Reports* *37*, 110058. 10.1016/j.celrep.2021.110058.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

76. Kotecha, N., Krutzik, P.O., and Irish, J.M. (2010). Web-based analysis and publication of flow cytometry experiments. *Current protocols in cytometry / editorial board, J Paul Robinson, managing editor [et al] Chapter 10, Unit10.17-10.17.24.* 10.1002/0471142956.cy1017s53.
77. Amir, E.D., Davis, K.L., Tadmor, M.D., Simonds, E.F., Levine, J.H., Bendall, S.C., Shenfeld, D.K., Krishnaswamy, S., Nolan, G.P., and Pe'er, D. (2013). viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* 31, 545–552. 10.1038/nbt.2594.
78. Becht, E., McInnes, L., Healy, J., Dutertre, C.-A., Kwok, I.W.H., Ng, L.G., Ginhoux, F., and Newell, E.W. (2018). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nature biotechnology*, 1–10. 10.1038/nbt.4314.
79. Gassen, S.V., Callebaut, B., Helden, M.J.V., Lambrecht, B.N., Demeester, P., Dhaene, T., and Saeys, Y. (2015). FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 87, 636–645. 10.1002/cyto.a.22625.
80. Ashhurst, T.M., Marsh-Wakefield, F., Putri, G.H., Spiteri, A.G., Shinko, D., Read, M.N., Smith, A.L., and King, N.J.C. (2021). Integration, exploration, and analysis of high-dimensional single-cell cytometry data using Spectre. *Cytom Part A.* 10.1002/cyto.a.24350.
81. Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W.M., Zheng, S., Butler, A., Lee, M.J., Wilk, A.J., Darby, C., Zager, M., et al. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 184, 3573-3587.e29. 10.1016/j.cell.2021.04.048.
82. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682. 10.1038/nmeth.2019.
83. Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., et al. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep-uk* 7, 16878. 10.1038/s41598-017-17204-5.
84. Roussel, M., Ferrant, J., Reizine, F., Gallou, S.L., Dulong, J., Carl, S., Lesouhaitier, M., Gregoire, M., Bescher, N., Verdy, C., et al. (2021). Comparative immune profiling of acute respiratory distress syndrome patients with or without SARS-CoV-2 infection. *Cell Reports Medicine* 2, 100291. 10.1016/j.xcrm.2021.100291.
85. Obradovic, A., Chowdhury, N., Haake, S.M., Ager, C., Wang, V., Vlahos, L., Guo, X.V., Aggen, D.H., Rathmell, W.K., Jonasch, E., et al. (2021). Single-cell protein activity analysis identifies recurrence-associated renal tumor macrophages. *Cell.* 10.1016/j.cell.2021.04.038.
86. Mercatelli, D., Lopez-Garcia, G., and Giorgi, F.M. (2020). corto: a lightweight R package for gene network inference and master regulator analysis. *Bioinformatics* 36, 3916–3917. 10.1093/bioinformatics/btaa223.
87. Garcia-Alonso, L., Holland, C.H., Ibrahim, M.M., Turei, D., and Saez-Rodriguez, J. (2019). Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities. *Genome Res* 29, 1363–1375. 10.1101/gr.240663.118.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

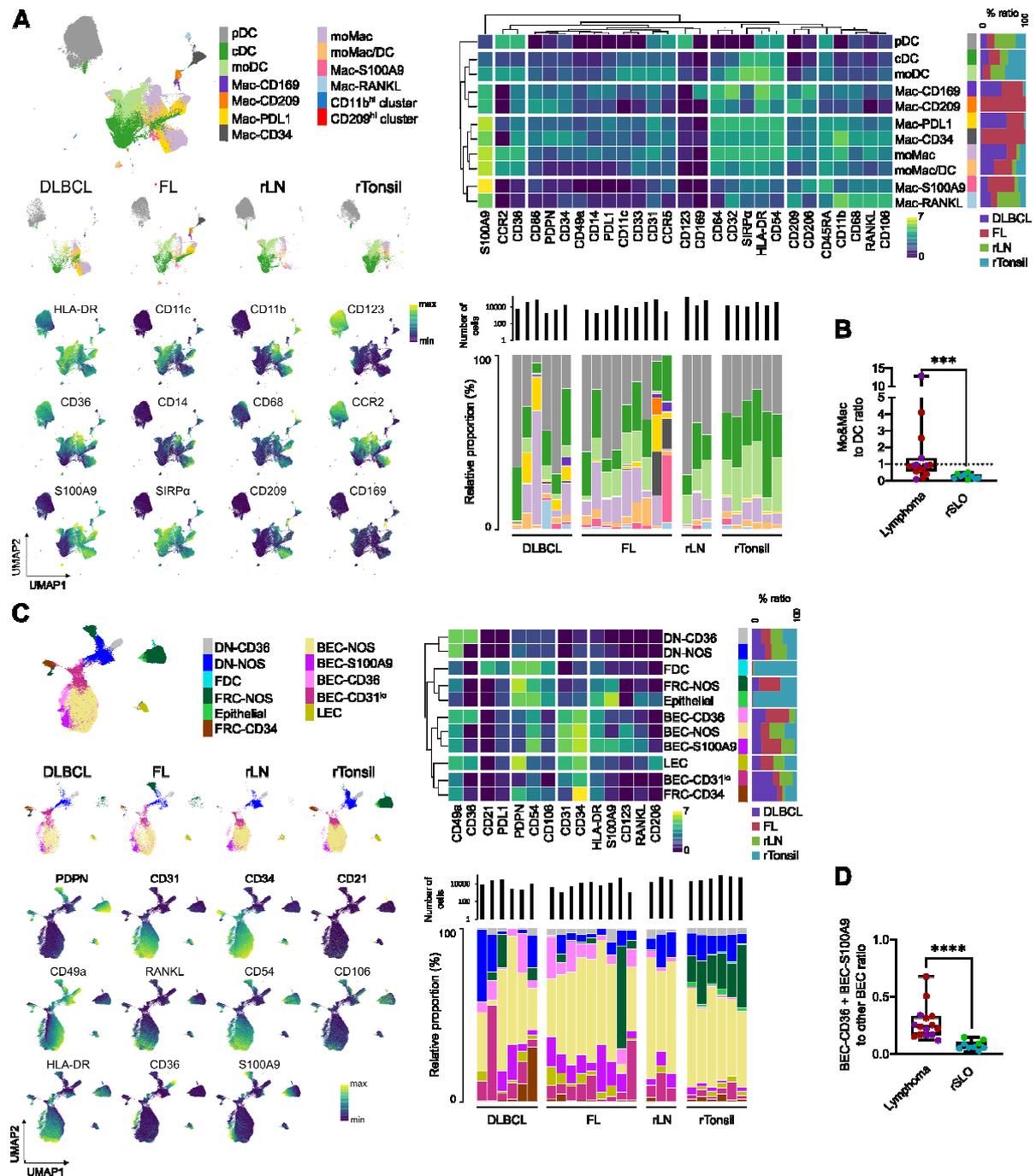


Figure 1

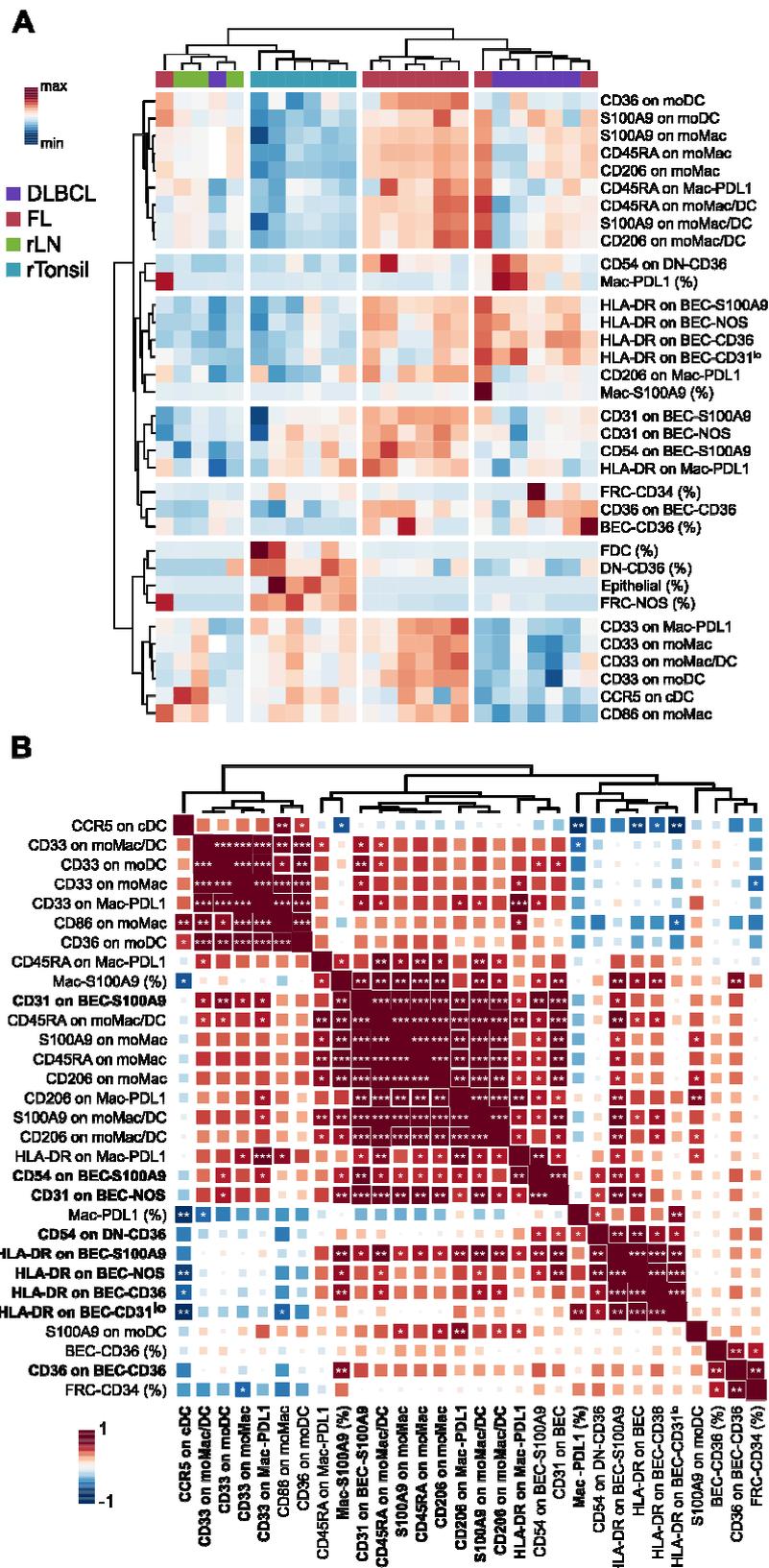


Figure 2

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

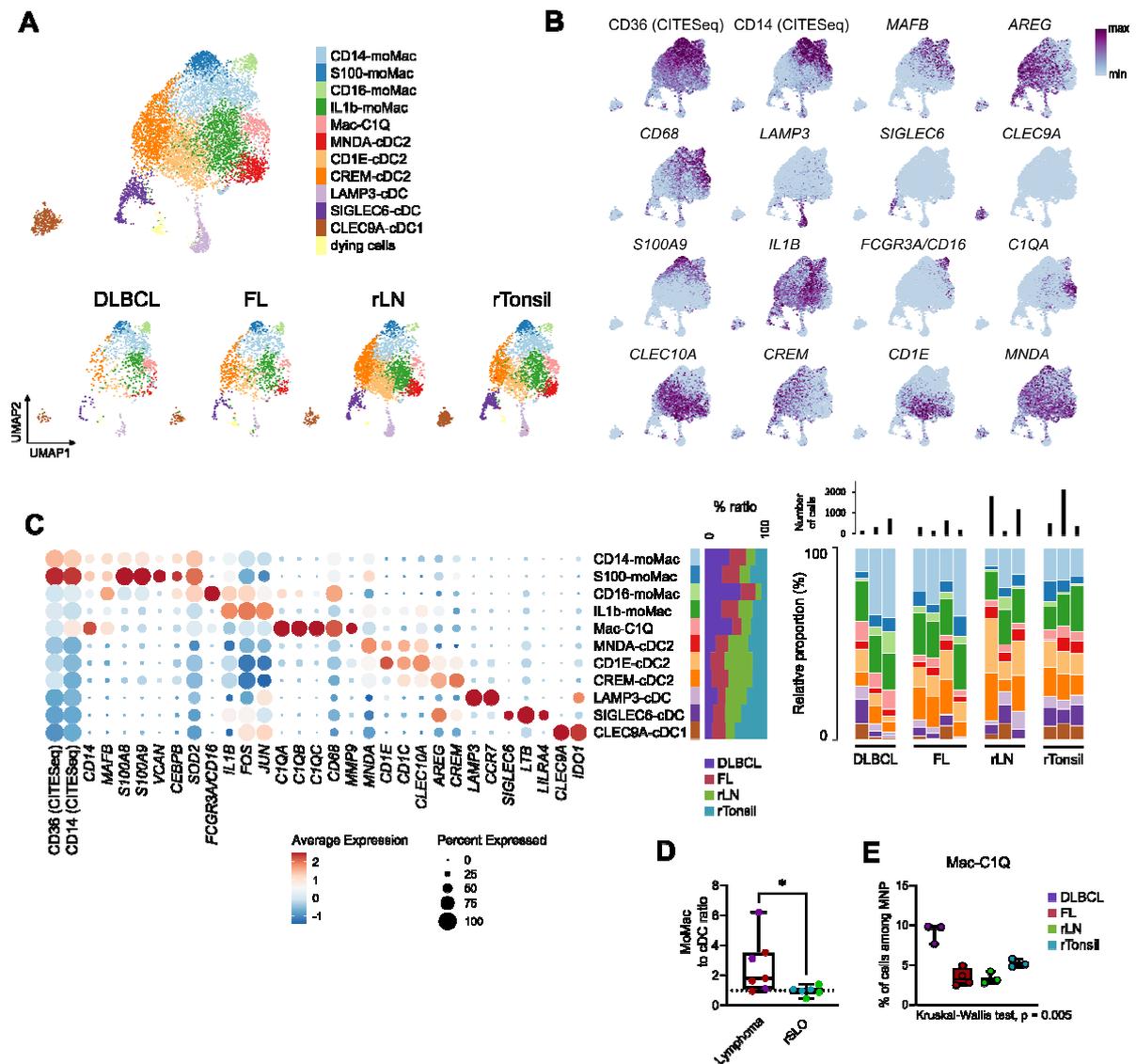
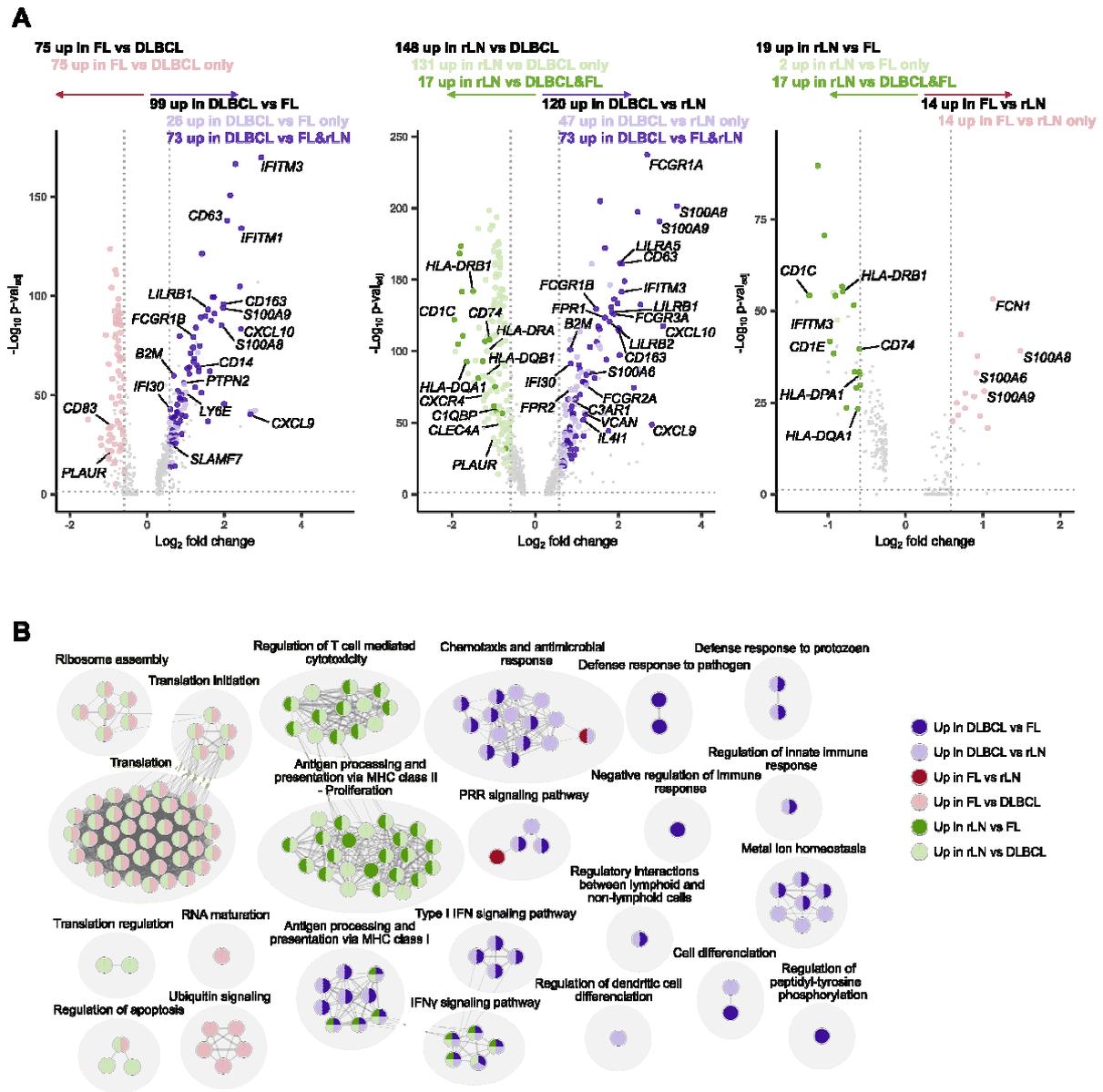


Figure 3

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B



Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

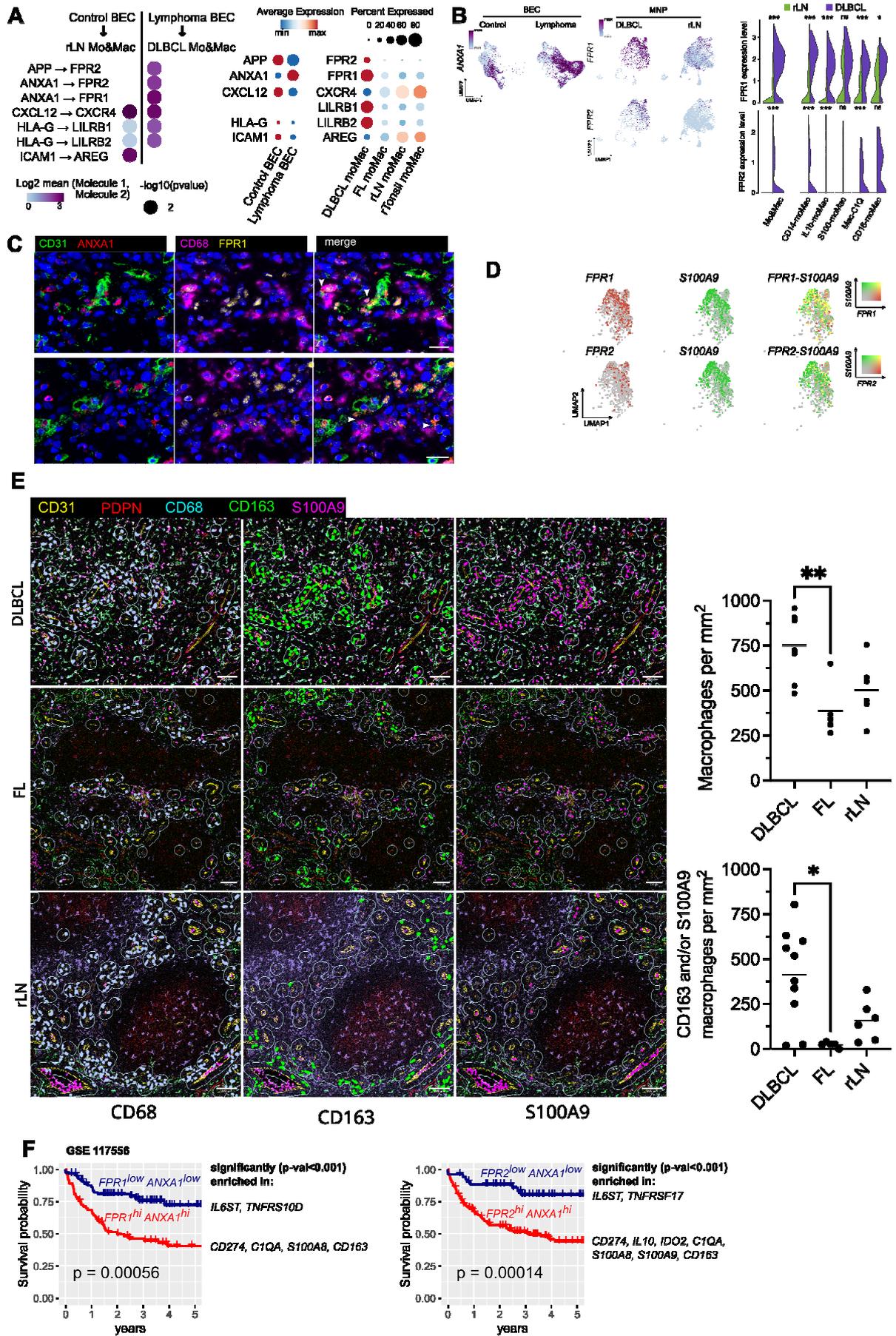


Figure 5

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental tables

Table S1: Differentially expressed genes between sample types in the Mo&Mac metacluster (Related to Figure 4 & S4)

Table S2: Differentially expressed genes between sample types in the Mo&Mac clusters (Related to Figure 4 & S4)

Table S3: Differentially expressed inferred proteins between sample types in the Mo&Mac metacluster (Related to Figure S4)

Table S4: Differentially expressed inferred proteins between sample types in the Mo&Mac clusters (Related to Figure S4)

Table S5: Pearson correlations of genes to FPR1 and FPR2 expression in DLBCL Mo&Mac (Related to Figure 5 & S5)

Supplemental figures

Figure S1: CyTOF panel and analysis pipeline (Related to Figure 1)

(A) Experimental design overview.

(B) CyTOF panel dedicated to the study of SLO MNP and stromal/endothelial cells.

(C) CyTOF analysis flowchart.

(D) Abundances of significantly enriched MNP clusters in lymphoma, according to sample type. Mann-Whitney, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure S2: Myeloid, stroma, and endothelial phenotype (Related to Figure 2)

(A) Heatmap of relative proportions of all CyTOF clusters and relevant mean metal intensity (MMI) in distinct clusters between sample types (FL, DLBCL, rLN, rTonsil). Statistically different parameters are highlighted. Statistically different relative proportions and relevant statistically different MMI (i.e. number of cells in compared clusters > 500 , arcsinh transformed MMI > 1 in at least one condition for the compared clusters, and statistical difference not only relying on rTonsil tissues) were selected for correlation analyses (See Figure 2). Kruskal-Wallis, $p < 0.05$.

(B) Boxplots of selected CyTOF clusters abundances and selected markers MMI for chosen differentially expressed clusters, according to sample type. Kruskal-Wallis, multiple comparison with Dunn correction, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure S3: Cell sorting and scRNASeq flowchart (Related to Figure 3)

(A) Gating strategy to sort OLS MNP – excluding pDC – by FACS.

(B) scRNASeq analysis flowchart.

(C) UMAP and FlowSOM clustering of all viable cells from SLO included in the single cell RNASeq analysis, displaying the 17 clusters identified, including 7 non-pDC MNP clusters (top left), or the cells colored by sample – i.e. DLBCL, FL, rLN, rTonsil (bottom left), and projection of selected markers expression (right).

(D) Boxplots of scRNASeq clusters abundances according to sample type. Kruskal-Wallis, multiple comparison with Dunn correction.

Figure S4: Monocytes and macrophages transcriptomic deregulation in lymphoma (Related to Figure 4)

(A) Principal component analysis (PCA) on top 1000 expressed genes in rLN and rTonsil samples, barycenter of each group is shown. Volcano plots of differentially expressed genes for all cells (i.e. monocytes/macrophages) included in the 5 monocytes/macrophages clusters – CD14-moMac, S100-moMac, CD16-moMac, IL1b_moMac/DC, Mac-C1Q – between rTonsil and rLN (left), rTonsil and FL (center), rTonsil and DLBCL (right). Wilcoxon-Mann-Whitney test, $|FC| > 1.5$, $p\text{-val}_{adj} < 0.05$. Only genes present in at least 30% of the cells in one of the compared conditions and found to be robustly differentially expressed by iteratively removing each sample from the differential analysis are presented as differentially expressed (larger, colored dots).

(B) Volcano plots of statistically different inferred proteins for all cells (i.e. monocytes/macrophages) included in the 5 monocytes/macrophages clusters – CD14-moMac, S100-moMac, CD16-moMac, IL1b_moMac/DC, Mac-C1Q – between FL and DLBCL (left), DLBCL and reactive LN (center), FL and reactive LN (right). Wilcoxon-Mann-Whitney test, $|FC| > 1.5$, $p < 0.05$. Only proteins present in at least 30% of the cells in one of the compared conditions and found to be robustly differentially expressed by iteratively removing each sample from the differential analysis are presented as differentially expressed (larger, colored dots). Proteins

found to be deregulated in the comparison between clusters of one sample type and the other two sample types are highlighted in darker colors. Proteins were inferred using the PISCES method.¹

(C) Enrichment map of the pathway analysis for the differentially expressed inferred proteins. The pathway analysis was conducted with g:profiler, using the Reactome and GO:BP databases and the enrichment map was built in Cytoscape by combining all 6 pathway analyses corresponding to all comparisons between FL, DLBCL and rLN samples.² Each node represents a pathway, colored according to the context in which it is enriched. Pathways were found enriched only in the DLBCL vs FL and DLBCL vs rLN signatures.

Figure S5: Interactome and *in situ* analyses identifies BEC and Mo&Mac crosstalk in DLBCL (Related to Figure 5)

(A) Dotplot of statistically significant interactions identified with CellphoneDB³ between normal murine BEC and rLN moMac clusters or tumor murine BEC and DLBCL moMac clusters, involving ligands expressed by murine BEC and receptors expressed by moMac and differentially expressed between rLN and DLBCL LN. Log₂ mean expression of interacting molecules (color scale) and p-values (dot size) are shown. Only statistically significant interactions are plotted (p<0.05) with a minimal p-value set to 0.01.

(B) Dotplot of statistically significant interactions identified with CellphoneDB³ between normal murine BEC and rLN moMac or tumor murine BEC and DLBCL moMac, involving ligands expressed by moMac and receptors expressed by murine BEC and differentially expressed between rLN and DLBCL LN. Log₂ mean expression of interacting molecules (color scale) and p-values (dot size) are shown. Only statistically significant interactions are plotted (p<0.05) with a minimal p-value set to 0.01 (left). Dotplots showing the average RNA expression level (color scale) and percentage of expressing cells (dot size) of the identified ligands expressed by moMac and receptors expressed by tumor or normal BEC (right).

(C) Heatmap of the interaction potential between the top 12 ligands expressed by tumor murine BEC identified with Nichenet and their receptors expressed by DLBCL moMac. Dotplots showing the average RNA expression level (color scale) and percentage of expressing cells (dot size) of the identified ligands expressed by tumor BEC and receptors expressed by Mo&Mac.

(D) Boxplots showing ANXA1, FPR1 and FPR2 expression levels on BEC, LEC, FRC and DN from naïve or tumor mouse LN tissue (GSE126033).⁴

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

(E) Violin plots showing ANXA1, FPR1 and FPR2 expression levels on T and B cells from DLBCL LN and rLN.⁵

(F) Violin plot showing ANXA1 expression level on DLBCL and rLN Mo&Mac.

(G) CD31, ANXA1, CD68, and FPR1 staining by mIF in DLBCL and rLN. Scale bar represent 20 μm .

(H) Top 10 genes correlated to FPR1 or FPR2 in DLBCL moMac. Pearson correlation ***= $p < 0.001$.

Figure S6: *In situ* analyses identifies BEC and Mo&Mac crosstalk in DLBCL (Related to Figure 5)

IMC staining for BEC (CD31^{pos} PDPN^{neg}), LEC (CD31^{pos} PDPN^{pos}), and macrophages/myeloid cells (CD68, CD163, and S100A9). ROI for DLBCL (n=4, 10 ROI, total area 7.1 mm²), FL (n=3, 5 ROI, total area 5.6 mm²), and rLN (n=3, 6 ROI, total area 6.5 mm²). Blood vessels were defined as anatomical structure CD31^{pos} PDPN^{neg}. CD31 cells are in yellow; PDPN are in red, CD68 are in cyan, CD163 are in green, and S100A9 are in pink; neighbourhoods' zones of 25 μm around blood vessels are indicated in light green. Representative ROI for DLBCL, FL, and rLN.

Blood vessel, number of macrophages, and macrophages expressing CD163 and/or S100A9 in all ROI. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons correction, * $p < 0.05$. Scale bar represent 100 μm .

Literature cited

1. Obradovic, A., Vlahos, L., Laise, P., Worley, J., Tan, X., Wang, A., and Califano, A. (2022). PISCES: A pipeline for the Systematic, Protein Activity-based Analysis of Single Cell RNA Sequencing Data. *Biorxiv*, 2021.05.20.445002. 10.1101/2021.05.20.445002.
2. Reimand, J., Isserlin, R., Voisin, V., Kucera, M., Tannus-Lopes, C., Rostamianfar, A., Wadi, L., Meyer, M., Wong, J., Xu, C., et al. (2019). Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc* 14, 482–517. 10.1038/s41596-018-0103-9.
3. Efremova, M., Vento-Tormo, M., Teichmann, S.A., and Vento-Tormo, R. (2020). CellPhoneDB: inferring cell–cell communication from combined expression of multi-subunit ligand–receptor complexes. *Nat Protoc* 15, 1484–1506. 10.1038/s41596-020-0292-x.
4. Gloger, M., Menzel, L., Grau, M., Vion, A.-C., Anagnostopoulos, I., Zapukhlyak, M., Gerlach, K., Kammertöns, T., Hehlhans, T., Zschummel, M., et al. (2020). Lymphoma Angiogenesis Is Orchestrated by Noncanonical Signaling Pathways. *Cancer Res* 80, 1316–1329. 10.1158/0008-5472.can-19-1493.
5. Roeder, T., Seufert, J., Uvarovskii, A., Frauhammer, F., Bordas, M., Abedpour, N., Stolarczyk, M., Mallm, J.-P., Herbst, S.A., Bruch, P.-M., et al. (2020). Dissecting intratumour heterogeneity of nodal B-cell lymphomas at the transcriptional, genetic and drug-response levels. *Nature cell biology*, 1–27. 10.1038/s41556-020-0532-x.

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

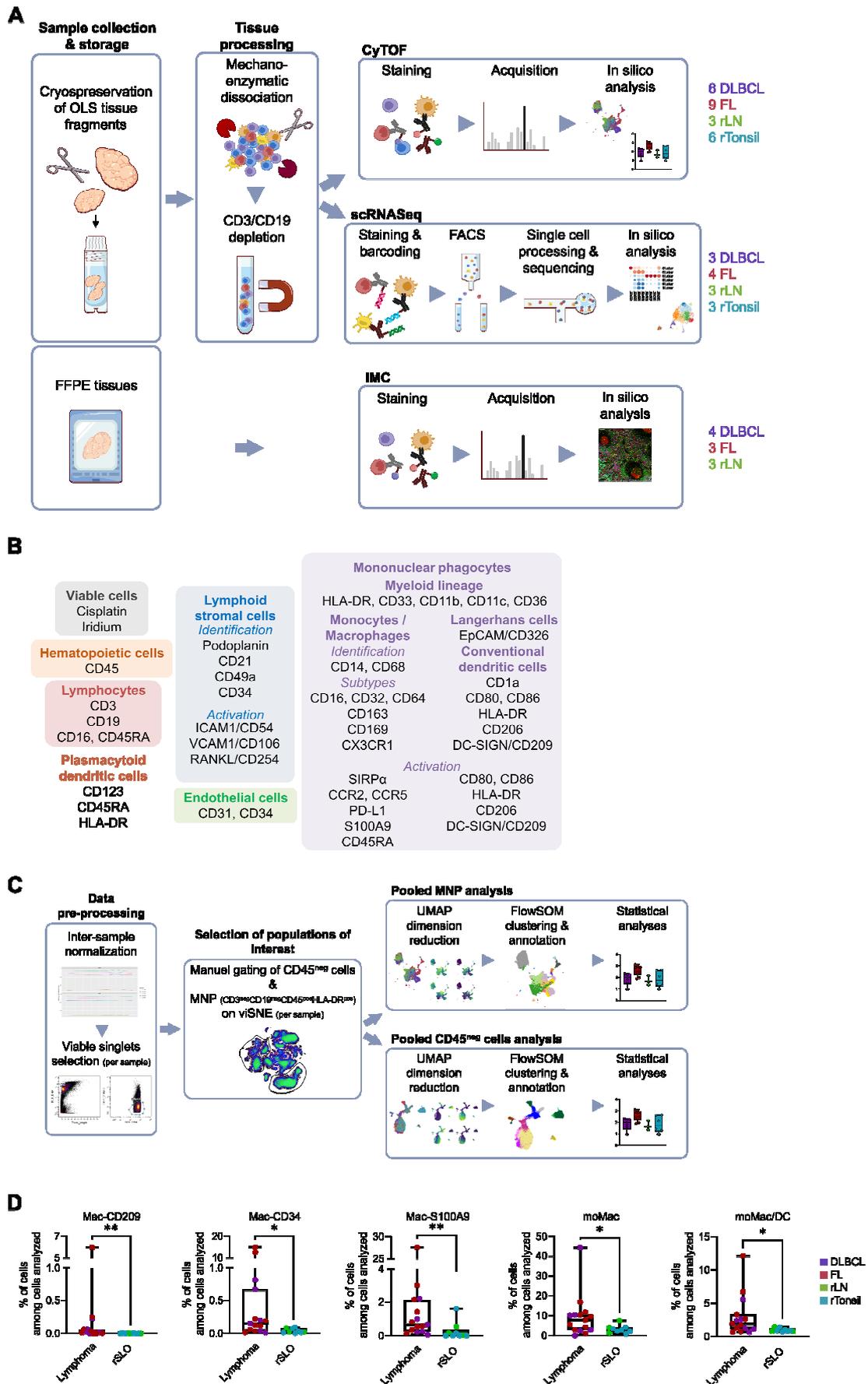


Figure S1

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

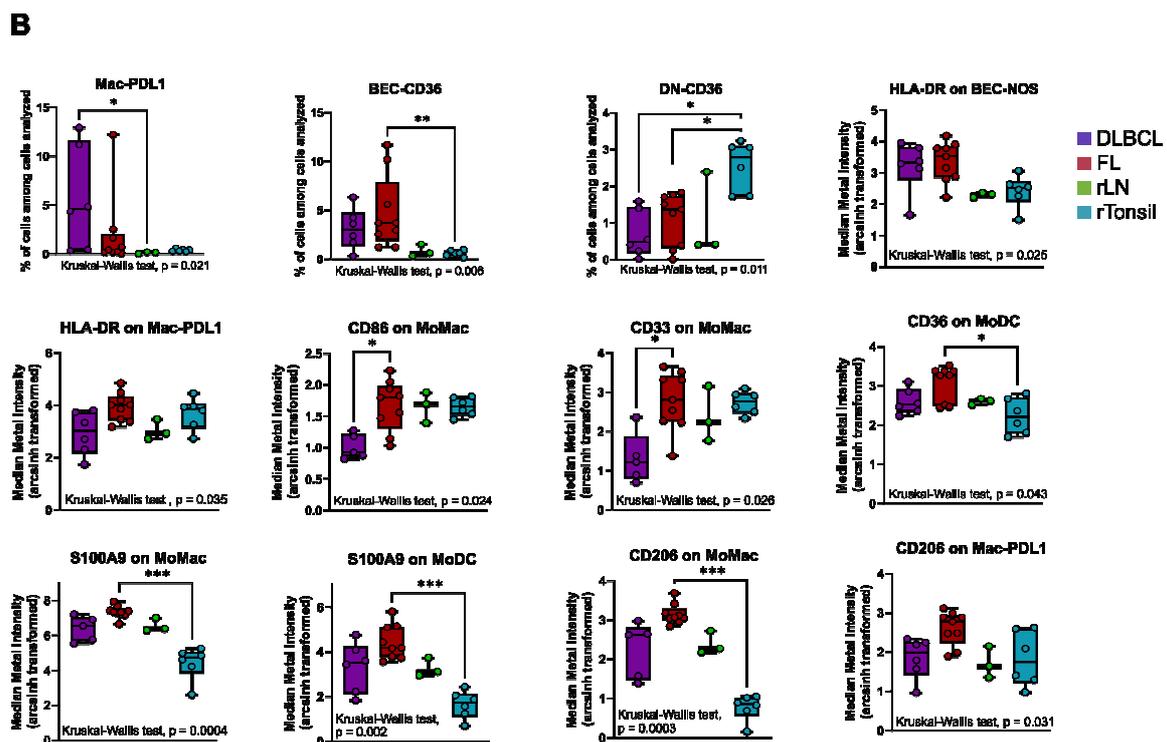
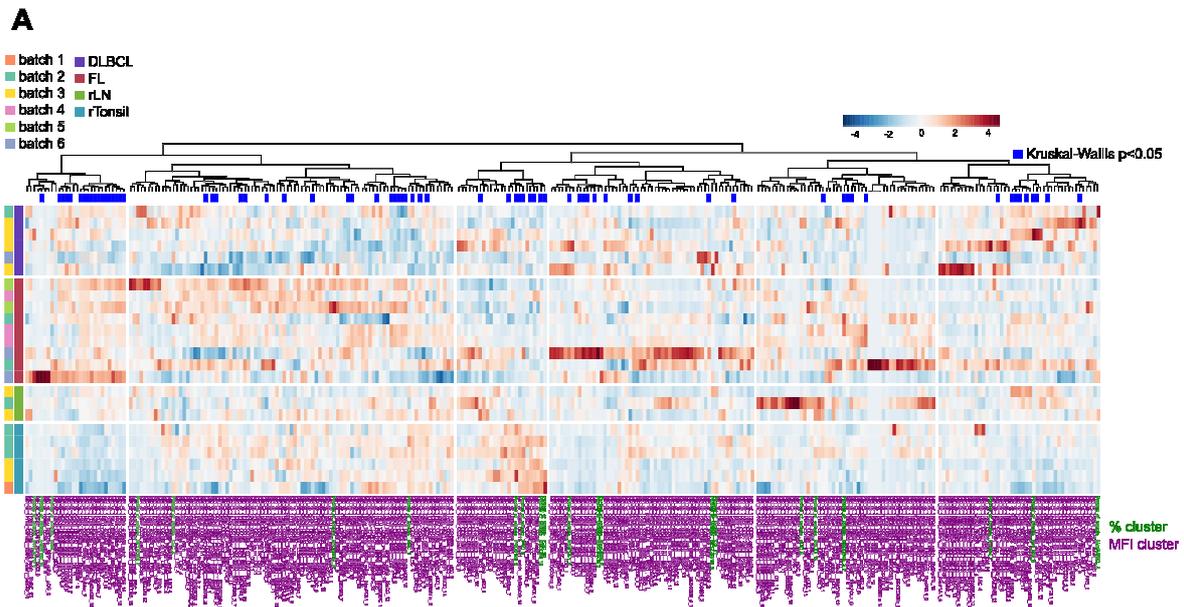


Figure S2

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

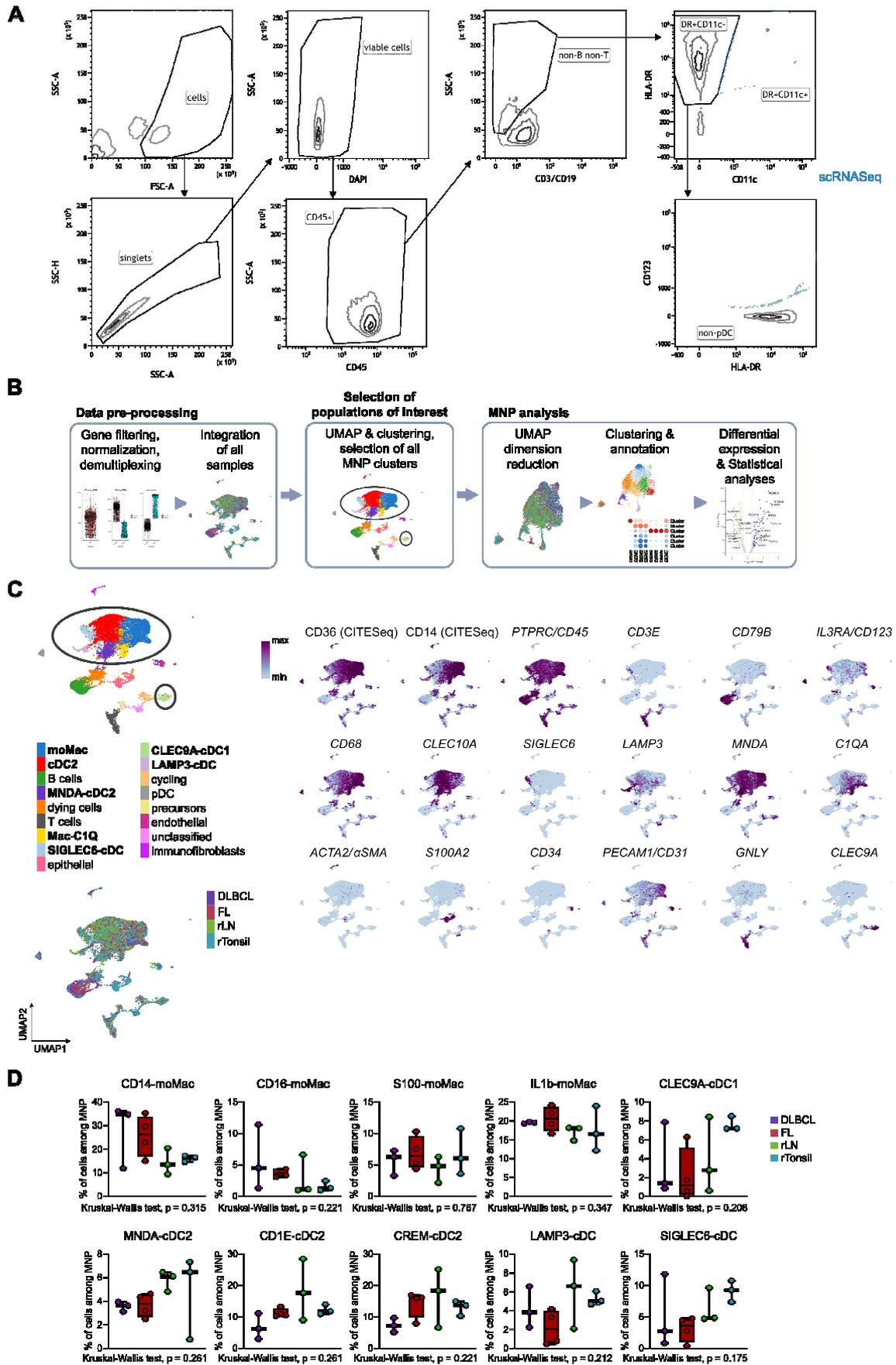


Figure S3

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

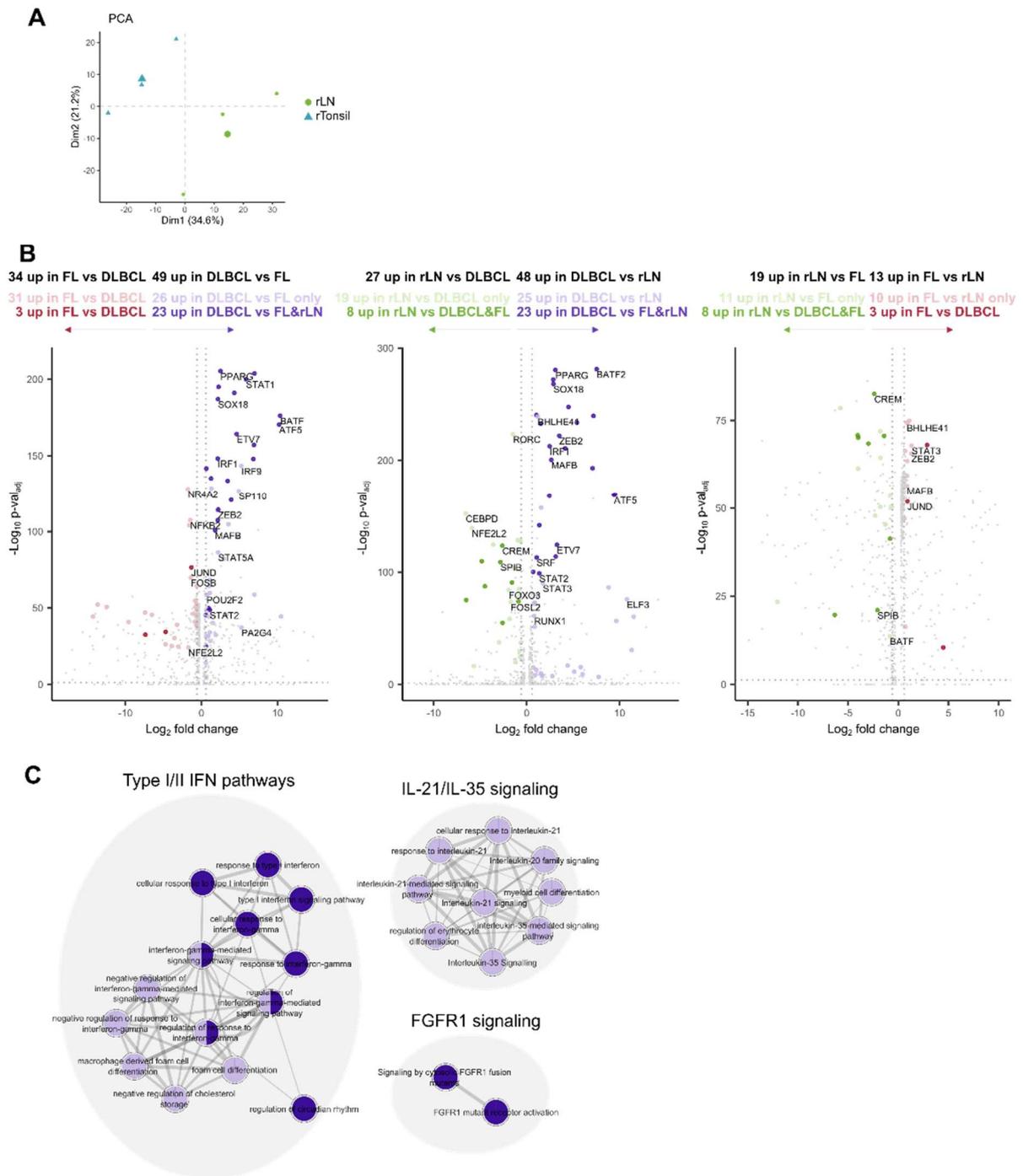


Figure S4

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

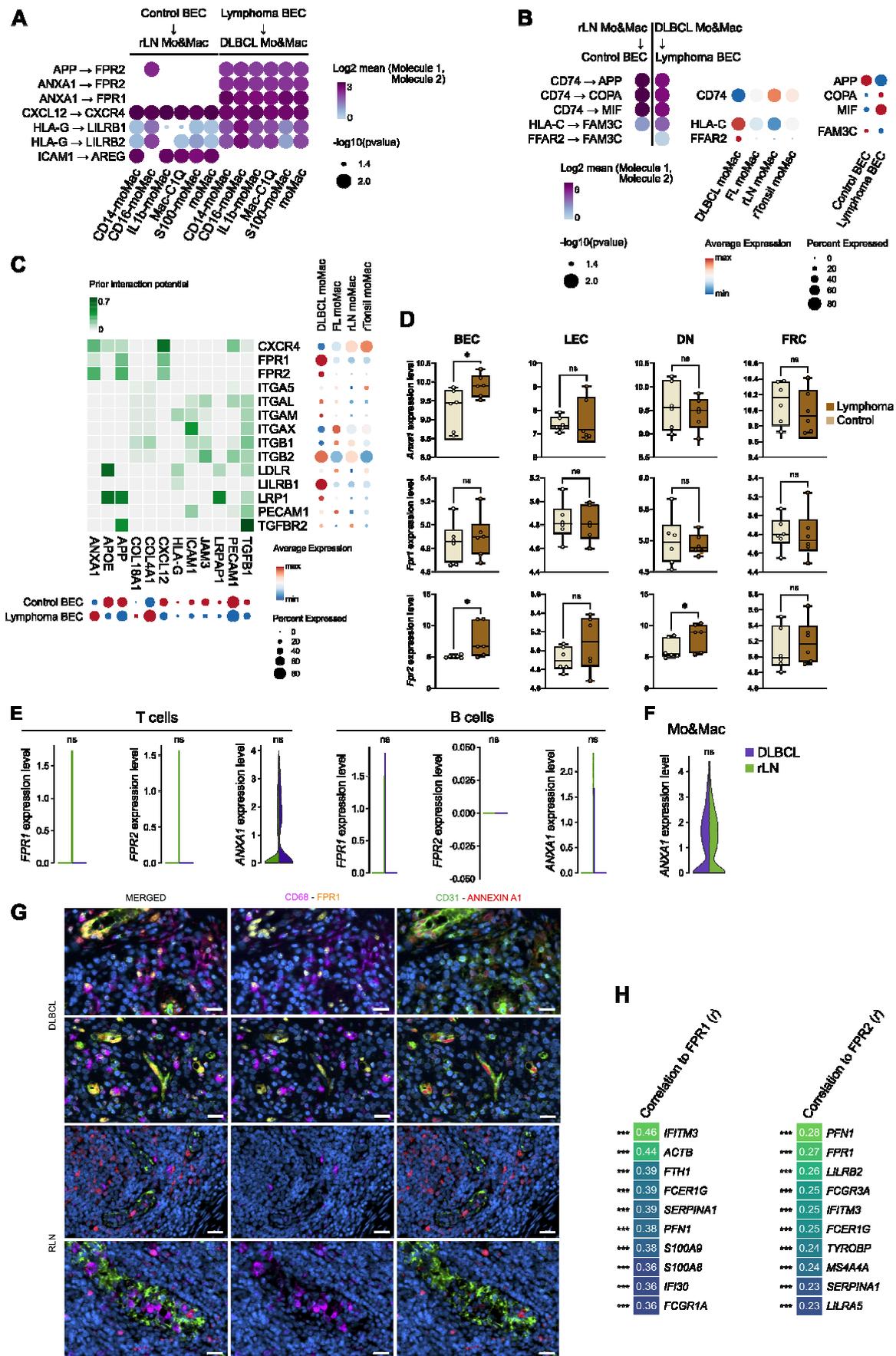


Figure S5

Résultats 2 – Identification d'interactions d'intérêt clinique entre les macrophages associés aux tumeurs et les cellules endothéliales sanguines dans le lymphome diffus à grandes cellules B

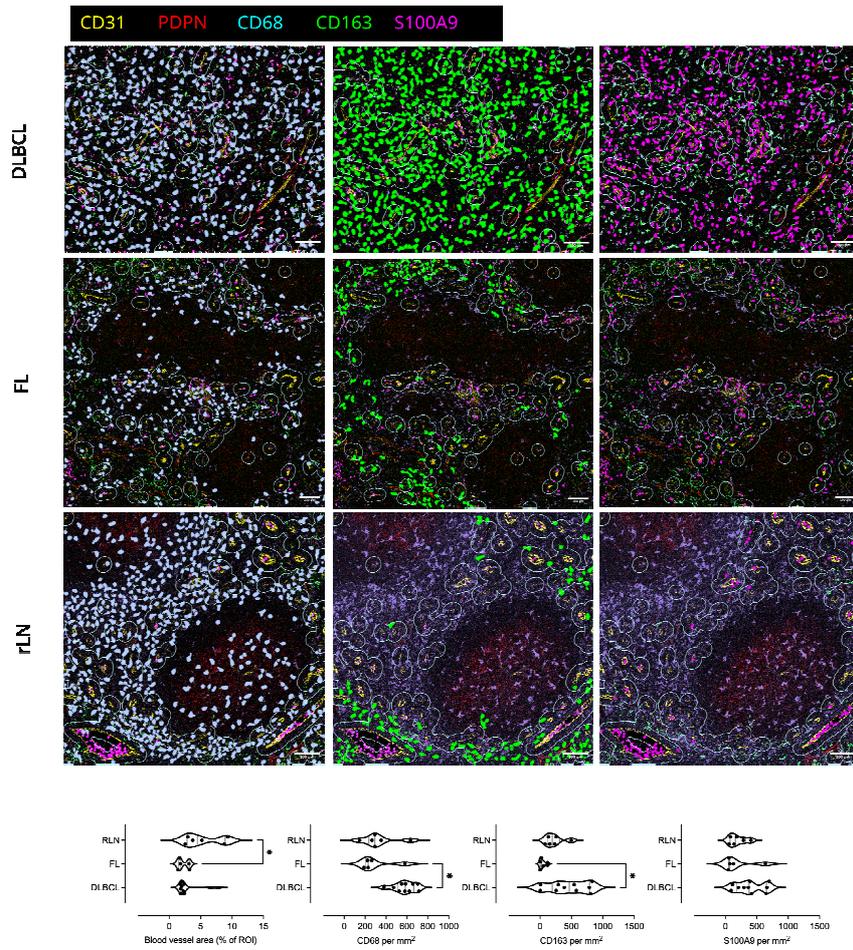
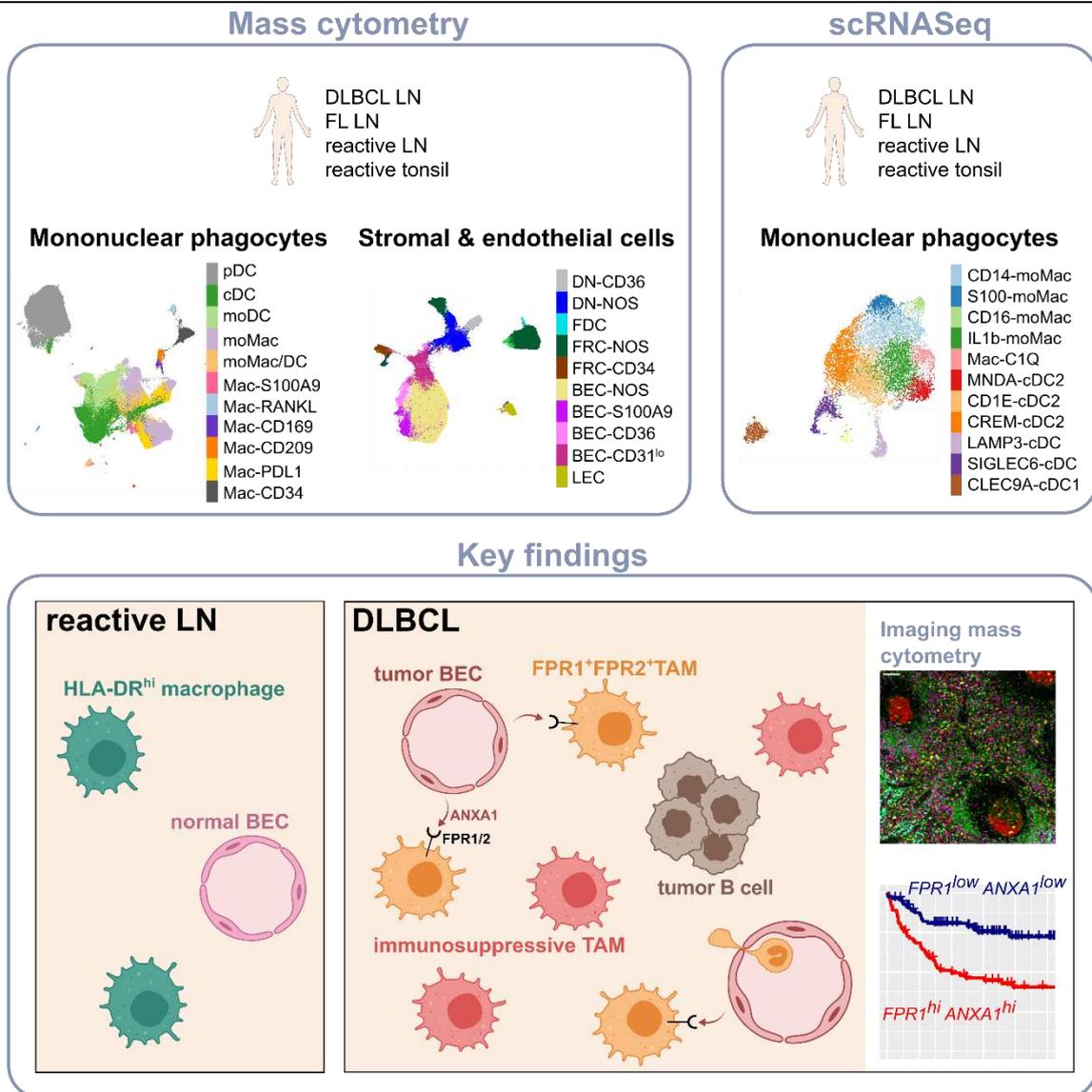


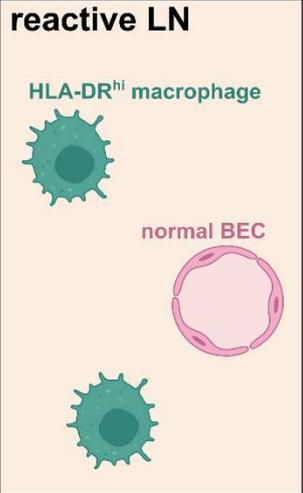
Figure S6

Conclusion et perspectives

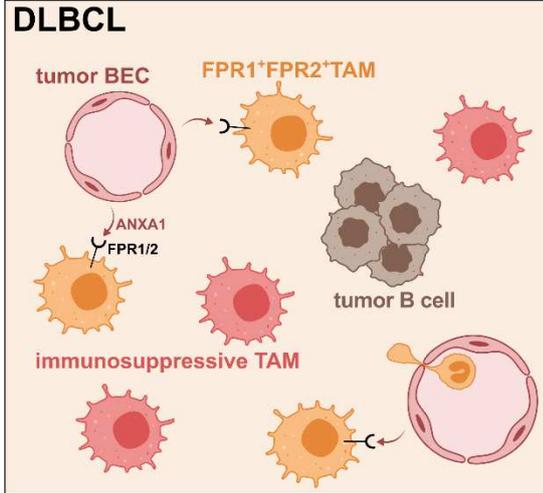


Key findings

reactive LN



DLBCL



Imaging mass cytometry

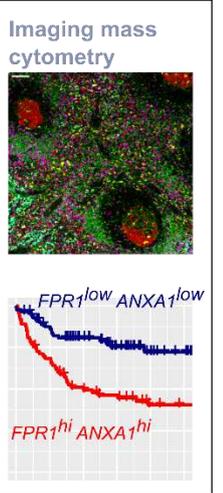


Figure 21 | Principaux résultats obtenus

Nous avons pu grâce à ce travail proposer une première caractérisation de l'hétérogénéité des MNP dans le DLBCL et le FL, en comparaison aux organes lymphoïdes secondaires (rLN et rTonsil), à la fois au niveau phénotypique par une approche en CyTOF et au niveau transcriptomique par une approche en scRNASeq. Nous avons également pu évaluer à l'aide de notre panel CyTOF dédié les modifications des compartiments endothélial et stromal associées aux altérations des MNP dans les lymphomes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une co-amplification de populations de macrophages et de BEC présentant des états d'activation spécifiques dans le lymphome. L'étude en scRNASeq des monocytes et macrophages (Mo&Mac) ayant mis en évidence une dérégulation majeure de ces cellules dans le DLBCL, contrairement au FL et au contexte réactionnel, nous nous sommes ensuite particulièrement focalisés sur l'analyse

des interactions Mo&Mac-BEC dans ce lymphome de haut grade. *Via* une analyse d'interactome *in silico* combinant nos données originales et des données précédemment publiées de scRNASeq de BEC de lymphome agressif murin, nous avons identifié une interaction entre le ligand ANXA1 produit par les BEC et ses récepteurs FPR1 et FPR2 exprimés par les Mo&Mac de DLBCL. Nous avons pu mettre en évidence *in situ* sur des échantillons tissulaires l'existence de cette interaction ANXA1-FPR1/2, et confirmé son potentiel intérêt physiopathologique en montrant son association à un pronostic défavorable dans une large cohorte de patients atteints de DLBCL. Une mise en exergue des principaux résultats obtenus est proposée sous la forme d'un résumé graphique (Figure 21).

Notre travail de caractérisation des MNP d'OLS à l'échelle de la cellule unique a permis d'établir différentes altérations atteignant ce compartiment dans le lymphome B, dont une surexpression de S100A9 et une diminution de gènes impliqués dans la présentation antigénique. Si nous avons pu mettre en évidence de nombreuses autres dérégulations dans les Mo&Mac de DLBCL, comme la surexpression de gènes de réponse à l'IFN ou impliqués dans l'immunosuppression, nous n'avons pas établi de signature transcriptomique claire de TAM de FL. En revanche, sur le plan phénotypique, avec l'approche en CyTOF qui inclut bien plus de cellules et davantage d'échantillons, nous avons bel et bien mis en évidence un profil spécifique de TAM dans cette pathologie. Même si nous avons utilisé des approches haute résolution, une des principales limites de ce travail est le nombre limité d'échantillons inclus, d'autant que les différents groupes étudiés ne sont pas parfaitement homogènes. Cette limite, induite à la fois par le nombre d'échantillons disponibles et par le coût des techniques utilisées, pourrait expliquer en partie ces constatations dans le FL. L'incrémentation de nouveaux échantillons de FL, mais aussi de DLBCL, pourrait permettre d'identifier davantage de gènes dérégulés dans les MNP de lymphome. De la même manière, nous ne pouvons prétendre à une étude exhaustive des altérations du dialogue entre les TAM et les compartiments stromal et endothélial, d'autant plus que nous avons focalisé notre étude sur les Mo&Mac de DLBCL (qui présentaient une signature transcriptomique conséquente) et utilisé en regard des données murines dans le cadre des prédictions d'interactions potentielles. Si des données scRNASeq de cellules endothéliales et stromales humaines ont été récemment publiées dans le FL ⁵²⁰, il n'existe pas à notre connaissance de données similaires dans le DLBCL. L'obtention de telles données pourrait possiblement permettre d'identifier d'autres interactions moléculaires entre les BEC et les Mo&Mac dans ce lymphome.

Une autre limite induite par le nombre limité d'échantillons inclus dans notre étude est l'absence de prise en compte de l'hétérogénéité inter-patients des lymphomes, et en particulier

du DLBCL. En outre, nous avons utilisé deux approches reposant sur des suspensions cellulaires, qui bien que présentant l'avantage de permettre l'étude d'un nombre important de cellules, empêchent d'évaluer in situ les localisations et co-localisations cellulaires. L'analyse d'échantillons issus de larges cohortes de patients, bien caractérisées, pourrait permettre de valider la pertinence pronostique de l'interaction ANXA1-FPR1/2 dans le DLBCL, mais aussi d'identifier un éventuel lien avec un ou des sous-groupes de patients identifiés par l'une des classifications proposées dans cette pathologie. Une telle approche pourrait s'appuyer sur les banques d'échantillons constituées dans le cadre des essais cliniques, qui incluent un grand nombre de patients bien caractérisés sur les plans clinique et biologique. Ainsi, les tissue microarrays (TMA) constituent des candidats de choix pour l'étude in situ et à grande échelle de l'interaction entre les BEC ANXA1^{pos} et les TAM FPR1/2^{pos} dans le DLBCL. Toutefois, les TMA ne permettent d'analyser qu'une aire limitée de coupe tissulaire, et les techniques d'imagerie applicables dans le cadre de ces larges études, comme l'immunofluorescence multiplex, un nombre limité de marqueurs. Pour cartographier finement la niche tumorale au sein de laquelle évoluent les différentes populations de TAM, et notamment les TAM FPR1/2^{pos}, l'imagerie par cytométrie de masse (IMC) constitue un outil particulièrement intéressant. En effet, l'IMC permet l'étude d'une quarantaine de marqueurs phénotypiques sur des échantillons histologiques⁸¹⁵. Un panel IMC incluant des marqueurs d'intérêt dans l'étude de la niche lymphomateuse, dont des marqueurs myéloïdes, stromaux, endothéliaux, T, B, et NK, a tout récemment été mis au point dans l'équipe, et a déjà pu être mis à profit dans le présent travail. L'analyse de l'intégralité de ce panel sur des coupes histologiques de patients atteints de lymphomes pourrait permettre d'évaluer l'ensemble des caractéristiques du TME, en particulier celles associées à l'interaction ANXA1-FPR1/2, et ainsi mieux comprendre l'implication physiopathogénique de cette interaction dans le DLBCL.

Nous proposons dans ce travail de lier deux processus influençant défavorablement le pronostic du DLBCL : la néoangiogenèse et l'infiltration de populations de TAM présentant des phénotypes spécifiques. Sur la base de nos observations et de la littérature, nous supposons que des monocytes exprimant FPR1/2 pourraient être recrutés à la tumeur par le biais d'ANXA1 produite par les BEC tumorales, puis polarisés in situ, conduisant à une infiltration de TAM immunosuppresseurs. Ces hypothèses mériteraient d'être testées sur le plan mécanistique, par des approches in vitro et/ou des modèles murins, afin d'élucider les processus à l'œuvre dans le recrutement des monocytes circulants et leur polarisation in situ, ainsi que les voies de signalisation en jeu.

Sur le plan du recrutement de monocytes FPR1/2^{pos} via ANXA1, une première piste pourrait être d'évaluer l'expression des récepteurs FPR1 et FPR2 par les monocytes circulants de patients atteints de DLBCL, en disposant idéalement des prélèvements tissulaires correspondants. Au-delà

de valider le potentiel des monocytes circulants dans leur ensemble à être recrutés par cette interaction, cette approche pourrait permettre d'identifier les sous-types de monocytes (classiques, non classiques, ou intermédiaires) les plus susceptibles de migrer à la tumeur. Cela pourrait être les ncMo, qui ont été décrits comme enclins à être recrutés à la tumeur dans le DLBCL ⁹⁷. De plus, au vu du potentiel pronostique de l'interaction ANXA1-FPR1/2, le compartiment sanguin pourrait constituer un biomarqueur de choix, plus accessible et moins invasif que les prélèvements tissulaires. Une étude plus fine de la cinétique et des mécanismes de recrutement des monocytes au cours de la lymphomagenèse nécessiterait des modèles murins de DLBCL, comme le modèle E μ -Myc ou des souris greffées avec la lignée de lymphome agressif A20, et des stratégies de type *fate mapping* permettant de tracer les lignées cellulaires. De tels modèles pourraient permettre d'une part d'étudier le phénotype et la distribution tissulaire des monocytes recrutés à la tumeur, mais aussi de tester des inhibiteurs pharmacologiques afin d'élucider les mécanismes moléculaires en jeu voire de proposer des pistes thérapeutiques ciblant le dialogue BEC-Mo&Mac.

Sur le plan de la différenciation *in situ* des monocytes par ANXA1, plusieurs voies de signalisation ont été impliquées dans la polarisation vers un phénotype M2/immunosuppresseur des Mo&Mac ⁸¹⁶⁻⁸¹⁹. Ces études *in vitro* se focalisant sur différentes voies de signalisation par des approches ciblées, il est difficile d'établir une vision d'ensemble des mécanismes impliqués dans le processus de polarisation. L'analyse de la polarisation *in vitro* de monocytes sous l'effet d'ANXA1 par des approches haute résolution, telles que la qPCR haut débit (système Biomark de Fluidigm) ou le RNASeq pourrait éclaircir les mécanismes moléculaires impliqués, et permettre une comparaison avec les signatures transcriptomiques observées dans le DLBCL. L'exploration des mécanismes impliqués dans la polarisation des monocytes recrutés à la tumeur pourrait également bénéficier des modèles murins précédemment évoqués, incluant des lignées cellulaires traçables. L'étude phénotypique et transcriptomique (notamment des FPR et de gènes de voies de signalisation candidates, ainsi que des protéines et gènes immunosuppresseurs) des monocytes et des macrophages tissulaires murins à différentes étapes de la lymphomagenèse pourrait notamment permettre d'établir si les TAM immunosuppresseurs retrouvés dans le DLBCL sont issus de monocytes recrutés et polarisés via FPR1/2. Au-delà des OLS, ces analyses pourraient se porter sur l'ensemble des organes envahis par la pathologie, ou cette même interaction ANXA1-FPR1/2 pourrait entrer en jeu. Enfin, des analyses fonctionnelles *in vivo* et *in vitro* impliquant des inhibiteurs pharmacologiques pourraient une fois encore améliorer la compréhension des mécanismes de différenciation des TAM et offrir de potentielles pistes thérapeutiques.

Pour finir, l'existence d'une interaction entre des cellules endothéliales exprimant ANXA1 et des Mo&Mac exprimant FPR1/2 pourrait être retrouvée d'autres cancers, hématologiques ou solides, aussi bien au niveau de la tumeur primaire que des sites métastatiques ganglionnaires ou

tissulaires. En effet, les processus de néoangiogenèse et le recrutement de monocytes à l'origine de TAM immunosuppresseurs sont des mécanismes pathogéniques pouvant être observés dans tous les types de tumeurs, primitives comme métastatiques. Cibler ce type de dialogue intercellulaire chez des patients sélectionnés pourrait permettre le développement de thérapies personnalisées non spécifiques d'un type tumoral.

Bibliographie

1. Gordon, S. (2008). Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur J Immunol* *38*, 3257–3264. 10.1002/eji.200838855.
2. Williams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 571–578. 10.1038/nri3712.
3. Metchnikoff, E. (1892). *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation: faites à l'Institut Pasteur en avril et mai 1891* (G. Masson).
4. van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). Le système phagocytaire mononucléaire: nouvelle classification des macrophages, des monocytes et de leurs cellules souches. *Bull World Health Organ* *47*, 651–658.
5. van Furth, R. (1981). 27 - IDENTIFICATION OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES: OVERVIEW AND DEFINITIONS. In *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, D. O. Adams, P. J. Edelson, and H. S. Koren, eds. (Academic Press), pp. 243–251. 10.1016/B978-0-12-044220-1.50033-7.
6. Steinman, R.M., and Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 5132–5136. 10.1073/pnas.75.10.5132.
7. Gordon, S., and Plüddemann, A. (2017). Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biology* *15*, 53. 10.1186/s12915-017-0392-4.
8. Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* *11*, 723–737. 10.1038/nri3073.
9. Nobs, S.P., and Kopf, M. (2021). Tissue-resident macrophages: guardians of organ homeostasis. *Trends Immunol* *42*, 495–507. 10.1016/j.it.2021.04.007.
10. Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 253–268. 10.1038/nri3175.
11. Robinson, A., Han, C.Z., Glass, C.K., and Pollard, J.W. (2021). Monocyte Regulation in Homeostasis and Malignancy. *Trends Immunol* *42*, 104–119. 10.1016/j.it.2020.12.001.
12. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74–e80. 10.1182/blood-2010-02-258558.
13. Mosier, D.E., and Coppelson, L.W. (1968). A THREE-CELL INTERACTION REQUIRED FOR THE INDUCTION OF THE PRIMARY IMMUNE RESPONSE in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *61*, 542–547. 10.1073/pnas.61.2.542.
14. Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* *8*, 1217–1226. 10.1038/ni1522.
15. Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* *8*, 1207–1216. 10.1038/ni1518.
16. Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., and Schreiber, H. (2007). The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research* *67*, 425. 10.1158/0008-5472.CAN-06-3037.
17. Hegde, S., Leader, A.M., and Merad, M. (2021). MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity. *Immunity* *54*, 875–884. 10.1016/j.immuni.2021.04.004.
18. Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology* *19*, 108–119. 10.1038/s41590-017-0022-x.
19. Veglia, F., Sanseviero, E., and Gabrilovich, D.I. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol* *21*, 485–498. 10.1038/s41577-020-00490-y.
20. Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* *7*, 12150. 10.1038/ncomms12150.
21. Cassetta, L., Baekkevold, E.S., Brandau, S., Bujko, A., Cassatella, M.A., Dorhoi, A., Krieg, C., Lin, A., Loré, K., Marini, O., et al. (2019). Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and non-human primates. *Cancer Immunol Immunother* *68*, 687–697. 10.1007/s00262-019-02302-2.

22. Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162–174. 10.1038/nri2506.
23. Roussel, M., Ferrell, P.B., Greenplate, A.R., Lhomme, F., Gallou, S.L., Diggins, K.E., Johnson, D.B., and Irish, J.M. (2017). Mass cytometry deep phenotyping of human mononuclear phagocytes and myeloid-derived suppressor cells from human blood and bone marrow. *Journal of Leukocyte Biology* 102, 437–447. 10.1189/jlb.5MA1116-457R.
24. Wistuba-Hamprecht, K., Martens, A., Weide, B., Teng, K.W.W., Zelba, H., Guffart, E., Chen, J., Garbe, C., Newell, E.W., Larbi, A., et al. (2017). Establishing High Dimensional Immune Signatures from Peripheral Blood via Mass Cytometry in a Discovery Cohort of Stage IV Melanoma Patients. *J Immunol* 198, 927–936. 10.4049/jimmunol.1600875.
25. DeNardo, D.G., and Ruffell, B. (2019). Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 19, 369–382. 10.1038/s41577-019-0127-6.
26. Lopez-Yrigoyen, M., Cassetta, L., and Pollard, J.W. (2021). Macrophage targeting in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1499, 18–41. 10.1111/nyas.14377.
27. Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., and Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175, 342–349. 10.4049/jimmunol.175.1.342.
28. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549–555. 10.1016/s1471-4906(02)02302-5.
29. Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969. 10.1038/nri2448.
30. Cassetta, L., and Pollard, J.W. (2018). Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 17, 887–904. 10.1038/nrd.2018.169.
31. Ginhoux, F., Schultze, J.L., Murray, P.J., Ochando, J., and Biswas, S.K. (2016). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat. Immunol.* 17, 34–40. 10.1038/ni.3324.
32. Xue, J., Schmidt, S.V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T.D., Emde, M., Schmidleithner, L., et al. (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40, 274–288. 10.1016/j.immuni.2014.01.006.
33. Ginhoux, F., and Williams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449. 10.1016/j.immuni.2016.02.024.
34. Williams, M., Thierry, G.R., Bonnardel, J., and Bajenoff, M. (2020). Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity* 52, 434–451. 10.1016/j.immuni.2020.02.015.
35. Laviron, M., and Boissonnas, A. (2019). Ontogeny of Tumor-Associated Macrophages. *Front Immunol* 10, 1799. 10.3389/fimmu.2019.01799.
36. Ajami, B., Bennett, J.L., Kriegler, C., Tetzlaff, W., and Rossi, F.M.V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10, 1538–1543. 10.1038/nn2014.
37. Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3, 1135–1141. 10.1038/ni852.
38. Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* 15, 929–937. 10.1038/ni.2967.
39. Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40, 91–104. 10.1016/j.immuni.2013.11.019.
40. Caronni, N., Montaldo, E., Mezzanzanica, L., Cilenti, F., Genua, M., and Ostuni, R. (2021). Determinants, mechanisms, and outcomes of myeloid cell diversity in cancer. *Immunol Rev.* 10.1111/imr.12944.
41. Bigley, V., Haniffa, M., Doulatov, S., Wang, X.-N., Dickinson, R., McGovern, N., Jardine, L., Pagan, S., Dimmick, I., Chua, I., et al. (2011). The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med* 208, 227–234. 10.1084/jem.20101459.
42. Kanitakis, J., Morelon, E., Petruzzo, P., Badet, L., and Dubernard, J.-M. (2011). Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. *Exp Dermatol* 20, 145–146. 10.1111/j.1600-0625.2010.01146.x.

43. van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., et al. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* *44*, 755–768. 10.1016/j.immuni.2016.02.017.
44. Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* *159*, 1312–1326. 10.1016/j.cell.2014.11.018.
45. Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., et al. (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* *7*, 10321. 10.1038/ncomms10321.
46. Mantovani, A., Allavena, P., Sozzani, S., Vecchi, A., Locati, M., and Sica, A. (2004). Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol* *14*, 155–160. 10.1016/j.semcancer.2003.10.001.
47. Ban, Y., Mai, J., Li, X., Mitchell-Flack, M., Zhang, T., Zhang, L., Chouchane, L., Ferrari, M., Shen, H., and Ma, X. (2017). Targeting Autocrine CCL5-CCR5 Axis Reprograms Immunosuppressive Myeloid Cells and Reinforces Antitumor Immunity. *Cancer Res* *77*, 2857–2868. 10.1158/0008-5472.CAN-16-2913.
48. Cassetta, L., Fragkogianni, S., Sims, A.H., Swierczak, A., Forrester, L.M., Zhang, H., Soong, D.Y.H., Cotechini, T., Anur, P., Lin, E.Y., et al. (2019). Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets. *Cancer Cell* *35*, 588–602.e10. 10.1016/j.ccell.2019.02.009.
49. Henze, A.-T., and Mazzone, M. (2016). The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* *126*, 3672–3679. 10.1172/JCI84427.
50. Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* *193*, 727–740. 10.1084/jem.193.6.727.
51. Lin, E.Y., Li, J., Bricard, G., Wang, W., Deng, Y., Sellers, R., Porcelli, S.A., and Pollard, J.W. (2007). Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. *Mol Oncol* *1*, 288–302. 10.1016/j.molonc.2007.10.003.
52. Bowman, R.L., Klemm, F., Akkari, L., Pyonteck, S.M., Sevenich, L., Quail, D.F., Dhara, S., Simpson, K., Gardner, E.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., et al. (2016). Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. *Cell Rep* *17*, 2445–2459. 10.1016/j.celrep.2016.10.052.
53. Loyher, P.-L., Hamon, P., Laviron, M., Meghraoui-Kheddar, A., Goncalves, E., Deng, Z., Torstensson, S., Bercovici, N., Baudesson de Chanville, C., Combadière, B., et al. (2018). Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *J Exp Med* *215*, 2536–2553. 10.1084/jem.20180534.
54. Zhu, Y., Herndon, J.M., Sojka, D.K., Kim, K.-W., Knolhoff, B.L., Zuo, C., Cullinan, D.R., Luo, J., Bearden, A.R., Lavine, K.J., et al. (2017). Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity* *47*, 597. 10.1016/j.immuni.2017.08.018.
55. Friebel, E., Kapolou, K., Unger, S., Núñez, N.G., Utz, S., Rushing, E.J., Regli, L., Weller, M., Greter, M., Tugues, S., et al. (2020). Single-Cell Mapping of Human Brain Cancer Reveals Tumor-Specific Instruction of Tissue-Invasive Leukocytes. *Cell* *181*, 1626–1642.e20. 10.1016/j.cell.2020.04.055.
56. Klemm, F., Maas, R.R., Bowman, R.L., Kornete, M., Soukup, K., Nassiri, S., Brouland, J.-P., Iacobuzio-Donahue, C.A., Brennan, C., Tabar, V., et al. (2020). Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell* *181*, 1643–1660.e17. 10.1016/j.cell.2020.05.007.
57. Müller, S., Kohanbash, G., Liu, S.J., Alvarado, B., Carrera, D., Bhaduri, A., Watchmaker, P.B., Yagnik, G., Di Lullo, E., Malatesta, M., et al. (2017). Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol.* *18*, 234. 10.1186/s13059-017-1362-4.
58. Bonnardel, J., and Guillemins, M. (2018). Developmental control of macrophage function. *Curr Opin Immunol* *50*, 64–74. 10.1016/j.coi.2017.12.001.
59. Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* *41*, 21–35. 10.1016/j.immuni.2014.06.013.
60. Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., and Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* *15*, 731–744. 10.1038/nri3920.
61. Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* *11*, 889–896. 10.1038/ni.1937.
62. DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., and Coussens, L.M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* *16*, 91–102. 10.1016/j.ccr.2009.06.018.

63. Shiao, S.L., Ruffell, B., DeNardo, D.G., Faddegon, B.A., Park, C.C., and Coussens, L.M. (2015). TH2-Polarized CD4(+) T Cells and Macrophages Limit Efficacy of Radiotherapy. *Cancer Immunol Res* 3, 518–525. 10.1158/2326-6066.CIR-14-0232.
64. Yonemitsu, K., Pan, C., Fujiwara, Y., Miyasato, Y., Shiota, T., Yano, H., Hosaka, S., Tamada, K., Yamamoto, Y., and Komohara, Y. (2022). GM-CSF derived from the inflammatory microenvironment potentially enhanced PD-L1 expression on tumor-associated macrophages in human breast cancer. *Sci Rep* 12, 12007. 10.1038/s41598-022-16080-y.
65. Kryczek, I., Wei, S., Zhu, G., Myers, L., Mottram, P., Cheng, P., Chen, L., Coukos, G., and Zou, W. (2007). Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 67, 8900–8905. 10.1158/0008-5472.CAN-07-1866.
66. Affara, N.I., Ruffell, B., Medler, T.R., Gunderson, A.J., Johansson, M., Bornstein, S., Bergsland, E., Steinhoff, M., Li, Y., Gong, Q., et al. (2014). B cells regulate macrophage phenotype and response to chemotherapy in squamous carcinomas. *Cancer Cell* 25, 809–821. 10.1016/j.ccr.2014.04.026.
67. Andreu, P., Johansson, M., Affara, N.I., Pucci, F., Tan, T., Junankar, S., Korets, L., Lam, J., Tawfik, D., DeNardo, D.G., et al. (2010). FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* 17, 121–134. 10.1016/j.ccr.2009.12.019.
68. Gunderson, A.J., Kaneda, M.M., Tsujikawa, T., Nguyen, A.V., Affara, N.I., Ruffell, B., Gorjestani, S., Liudahl, S.M., Truitt, M., Olson, P., et al. (2016). Bruton Tyrosine Kinase-Dependent Immune Cell Cross-talk Drives Pancreas Cancer. *Cancer Discov* 6, 270–285. 10.1158/2159-8290.CD-15-0827.
69. Kaneda, M.M., Cappello, P., Nguyen, A.V., Ralainirina, N., Hardamon, C.R., Foubert, P., Schmid, M.C., Sun, P., Mose, E., Bouvet, M., et al. (2016). Macrophage PI3Kγ Drives Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression. *Cancer Discov* 6, 870–885. 10.1158/2159-8290.CD-15-1346.
70. de Visser, K.E., Korets, L.V., and Coussens, L.M. (2005). De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 7, 411–423. 10.1016/j.ccr.2005.04.014.
71. Doedens, A.L., Stockmann, C., Rubinstein, M.P., Liao, D., Zhang, N., DeNardo, D.G., Coussens, L.M., Karin, M., Goldrath, A.W., and Johnson, R.S. (2010). Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res* 70, 7465–7475. 10.1158/0008-5472.CAN-10-1439.
72. Imtiyaz, H.Z., Williams, E.P., Hickey, M.M., Patel, S.A., Durham, A.C., Yuan, L.-J., Hammond, R., Gimotty, P.A., Keith, B., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* 120, 2699–2714. 10.1172/JCI39506.
73. Verberk, S.G.S., de Goede, K.E., Gorki, F.S., van Dierendonck, X.A.M.H., Argüello, R.J., and Van den Bossche, J. (2022). An integrated toolbox to profile macrophage immunometabolism. *Cell Rep Methods* 2, 100192. 10.1016/j.crmeth.2022.100192.
74. Geeraerts, X., Bolli, E., Fendt, S.-M., and Van Genderachter, J.A. (2017). Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. *Front Immunol* 8, 289. 10.3389/fimmu.2017.00289.
75. Geeraerts, X., Fernández-García, J., Hartmann, F.J., Goede, K.E. de, Martens, L., Elkrím, Y., Debraekeleer, A., Stijlemans, B., Vandekerke, A., Rinaldi, G., et al. (2021). Macrophages are metabolically heterogeneous within the tumor microenvironment. *Cell Reports* 37. 10.1016/j.celrep.2021.110171.
76. Zhang, D., Tang, Z., Huang, H., Zhou, G., Cui, C., Weng, Y., Liu, W., Kim, S., Lee, S., Perez-Neut, M., et al. (2019). Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature* 574, 575–580. 10.1038/s41586-019-1678-1.
77. Colegio, O.R., Chu, N.-Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., et al. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513, 559–563. 10.1038/nature13490.
78. Bohn, T., Rapp, S., Luther, N., Klein, M., Bruehl, T.-J., Kojima, N., Aranda Lopez, P., Hahlbrock, J., Muth, S., Endo, S., et al. (2018). Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages. *Nat. Immunol.* 19, 1319–1329. 10.1038/s41590-018-0226-8.
79. El-Kenawi, A., Gatenbee, C., Robertson-Tessi, M., Bravo, R., Dhillon, J., Balagurunathan, Y., Berglund, A., Vishvakarma, N., Ibrahim-Hashim, A., Choi, J., et al. (2019). Acidity promotes tumour progression by altering macrophage phenotype in prostate cancer. *Br J Cancer* 121, 556–566. 10.1038/s41416-019-0542-2.
80. Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 16, 582. 10.1038/nrc.2016.73.
81. Kumar, V., Cheng, P., Condamine, T., Mony, S., Languino, L.R., McCaffrey, J.C., Hockstein, N., Guarino, M., Masters, G., Penman, E., et al. (2016). CD45 Phosphatase Inhibits STAT3 Transcription Factor Activity in Myeloid Cells and Promotes Tumor-Associated Macrophage Differentiation. *Immunity* 44, 303–315. 10.1016/j.immuni.2016.01.014.

82. Mace, T.A., Ameen, Z., Collins, A., Wojcik, S., Mair, M., Young, G.S., Fuchs, J.R., Eubank, T.D., Frankel, W.L., Bekaii-Saab, T., et al. (2013). Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner. *Cancer Res* 73, 3007–3018. 10.1158/0008-5472.CAN-12-4601.
83. Jiang, H., Hegde, S., Knolhoff, B.L., Zhu, Y., Herndon, J.M., Meyer, M.A., Nywening, T.M., Hawkins, W.G., Shapiro, I.M., Weaver, D.T., et al. (2016). Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat Med* 22, 851–860. 10.1038/nm.4123.
84. Laklai, H., Miroshnikova, Y.A., Pickup, M.W., Collisson, E.A., Kim, G.E., Barrett, A.S., Hill, R.C., Lakins, J.N., Schlaepfer, D.D., Mouw, J.K., et al. (2016). Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat Med* 22, 497–505. 10.1038/nm.4082.
85. McWhorter, F.Y., Davis, C.T., and Liu, W.F. (2015). Physical and mechanical regulation of macrophage phenotype and function. *Cell Mol Life Sci* 72, 1303–1316. 10.1007/s00018-014-1796-8.
86. Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.-W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.-L., and Karin, M. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457, 102–106. 10.1038/nature07623.
87. Kobayashi, N., Miyoshi, S., Mikami, T., Koyama, H., Kitazawa, M., Takeoka, M., Sano, K., Amano, J., Isogai, Z., Niida, S., et al. (2010). Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res* 70, 7073–7083. 10.1158/0008-5472.CAN-09-4687.
88. Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 712–723. 10.1038/nri2852.
89. Wang, Q., He, Z., Huang, M., Liu, T., Wang, Y., Xu, H., Duan, H., Ma, P., Zhang, L., Zamvil, S.S., et al. (2018). Vascular niche IL-6 induces alternative macrophage activation in glioblastoma through HIF-2 α . *Nat Commun* 9, 559. 10.1038/s41467-018-03050-0.
90. Roberts, A.W., Lee, B.L., Deguine, J., John, S., Shlomchik, M.J., and Barton, G.M. (2017). Tissue-Resident Macrophages Are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. *Immunity* 47, 913–927.e6. 10.1016/j.immuni.2017.10.006.
91. Cook, R.S., Jacobsen, K.M., Wofford, A.M., DeRyckere, D., Stanford, J., Prieto, A.L., Redente, E., Sandahl, M., Hunter, D.M., Strunk, K.E., et al. (2013). MerTK inhibition in tumor leukocytes decreases tumor growth and metastasis. *J Clin Invest* 123, 3231–3242. 10.1172/JCI67655.
92. Wellenstein, M.D., Coffelt, S.B., Duits, D.E.M., van Miltenburg, M.H., Slagter, M., de Rink, I., Henneman, L., Kas, S.M., Prekovic, S., Hau, C.-S., et al. (2019). Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis. *Nature* 572, 538–542. 10.1038/s41586-019-1450-6.
93. Porta, C., Consonni, F.M., Morlacchi, S., Sangaletti, S., Bleve, A., Totaro, M.G., Larghi, P., Rimoldi, M., Tripodo, C., Strauss, L., et al. (2020). Tumor-Derived Prostaglandin E2 Promotes p50 NF- κ B-Dependent Differentiation of Monocytic MDSCs. *Cancer Res* 80, 2874–2888. 10.1158/0008-5472.CAN-19-2843.
94. Venneri, M.A., De Palma, M., Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., Mazziere, R., Doglioni, C., and Naldini, L. (2007). Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 109, 5276–5285. 10.1182/blood-2006-10-053504.
95. Chittezhath, M., Dhillon, M.K., Lim, J.Y., Laoui, D., Shalova, I.N., Teo, Y.L., Chen, J., Kamaraj, R., Raman, L., Lum, J., et al. (2014). Molecular profiling reveals a tumor-promoting phenotype of monocytes and macrophages in human cancer progression. *Immunity* 41, 815–829. 10.1016/j.immuni.2014.09.014.
96. Hamm, A., Prenen, H., Van Delm, W., Di Matteo, M., Wenes, M., Delamarre, E., Schmidt, T., Weitz, J., Sarmiento, R., Dezi, A., et al. (2016). Tumour-educated circulating monocytes are powerful candidate biomarkers for diagnosis and disease follow-up of colorectal cancer. *Gut* 65, 990–1000. 10.1136/gutjnl-2014-308988.
97. Le Gallou, S., Lhomme, F., Irish, J.M., Mingam, A., Pangault, C., Monvoisin, C., Ferrant, J., Azzaoui, I., Rossille, D., Bouabdallah, K., et al. (2021). Nonclassical Monocytes Are Prone to Migrate Into Tumor in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Frontiers in Immunology* 12, 5332. 10.3389/fimmu.2021.755623.
98. Javeed, N., Gustafson, M.P., Dutta, S.K., Lin, Y., Bamlet, W.R., Oberg, A.L., Petersen, G.M., Chari, S.T., Dietz, A.B., and Mukhopadhyay, D. (2017). Immunosuppressive CD14+HLA-DRlo/neg monocytes are elevated in pancreatic cancer and “primed” by tumor-derived exosomes. *Oncoimmunology* 6, e1252013. 10.1080/2162402X.2016.1252013.
99. Plebanek, M.P., Angeloni, N.L., Vinokour, E., Li, J., Henkin, A., Martinez-Marin, D., Filleur, S., Bhowmick, R., Henkin, J., Miller, S.D., et al. (2017). Pre-metastatic cancer exosomes induce immune surveillance by patrolling monocytes at the metastatic niche. *Nat Commun* 8, 1319. 10.1038/s41467-017-01433-3.
100. Biswas, S.K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol* 35, 585–600. 10.1007/s00281-013-0367-7.

101. Qian, B., Deng, Y., Im, J.H., Muschel, R.J., Zou, Y., Li, J., Lang, R.A., and Pollard, J.W. (2009). A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One* 4, e6562. 10.1371/journal.pone.0006562.
102. Cheng, S., Li, Z., Gao, R., Xing, B., Gao, Y., Yang, Y., Qin, S., Zhang, L., Ouyang, H., Du, P., et al. (2021). A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell* 184, 792-809.e23. 10.1016/j.cell.2021.01.010.
103. Ma, R.-Y., Black, A., and Qian, B.-Z. (2022). Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends in Immunology* 43, 546-563. 10.1016/j.it.2022.04.008.
104. Mulder, K., Patel, A.A., Kong, W.T., Piot, C., Halitzki, E., Dunsmore, G., Khalilnezhad, S., Irac, S.E., Dubuisson, A., Chevrier, M., et al. (2021). Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity* 54, 1883-1900.e5. 10.1016/j.immuni.2021.07.007.
105. Wu, S.Z., Al-Eryani, G., Roden, D.L., Junankar, S., Harvey, K., Andersson, A., Thennavan, A., Wang, C., Torpy, J.R., Bartonicek, N., et al. (2021). A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers. *Nat Genet* 53, 1334-1347. 10.1038/s41588-021-00911-1.
106. Braun, D.A., Street, K., Burke, K.P., Cookmeyer, D.L., Denize, T., Pedersen, C.B., Gohil, S.H., Schindler, N., Pomerance, L., Hirsch, L., et al. (2021). Progressive immune dysfunction with advancing disease stage in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 39, 632-648.e8. 10.1016/j.ccell.2021.02.013.
107. Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12, 298-306. 10.1038/nrc3245.
108. Bruni, D., Angell, H.K., and Galon, J. (2020). The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer* 20, 662-680. 10.1038/s41568-020-0285-7.
109. Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 14, 1014-1022. 10.1038/ni.2703.
110. Gajewski, T.F., Corrales, L., Williams, J., Horton, B., Sivan, A., and Spranger, S. (2017). Cancer Immunotherapy Targets Based on Understanding the T Cell-Inflamed Versus Non-T Cell-Inflamed Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1036, 19-31. 10.1007/978-3-319-67577-0_2.
111. Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., and Fridman, W.H. (2019). Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 19, 307-325. 10.1038/s41568-019-0144-6.
112. Cabrita, R., Lauss, M., Sanna, A., Donia, M., Skaarup Larsen, M., Mitra, S., Johansson, I., Phung, B., Harbst, K., Vallon-Christersson, J., et al. (2020). Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature* 577, 561-565. 10.1038/s41586-019-1914-8.
113. Helmink, B.A., Reddy, S.M., Gao, J., Zhang, S., Basar, R., Thakur, R., Yizhak, K., Sade-Feldman, M., Blando, J., Han, G., et al. (2020). B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* 577, 549-555. 10.1038/s41586-019-1922-8.
114. Petitprez, F., de Reyniès, A., Keung, E.Z., Chen, T.W.-W., Sun, C.-M., Calderaro, J., Jeng, Y.-M., Hsiao, L.-P., Lacroix, L., Bougoüin, A., et al. (2020). B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature* 577, 556-560. 10.1038/s41586-019-1906-8.
115. de Boer, M., van Dijck, J. a. a. M., Bult, P., Borm, G.F., and Tjan-Heijnen, V.C.G. (2010). Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *J Natl Cancer Inst* 102, 410-425. 10.1093/jnci/djq008.
116. Morton, D.L., Thompson, J.F., Cochran, A.J., Mozzillo, N., Elashoff, R., Essner, R., Nieweg, O.E., Roses, D.F., Hoekstra, H.J., Karakousis, C.P., et al. (2006). Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 355, 1307-1317. 10.1056/NEJMoa060992.
117. Davidson, S., Efremova, M., Riedel, A., Mahata, B., Pramanik, J., Huuhtanen, J., Kar, G., Vento-Tormo, R., Hagai, T., Chen, X., et al. (2020). Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Dynamic Stromal Niche That Supports Tumor Growth. *Cell Reports* 31, 107628. 10.1016/j.celrep.2020.107628.
118. Riedel, A., Shorthouse, D., Haas, L., Hall, B.A., and Shields, J. (2016). Tumor Induced Stromal Reprogramming Drives Lymph Node Transformation. *Nature immunology* 17, 1118. 10.1038/ni.3492.
119. Veglia, F., and Gabrilovich, D.I. (2017). Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Current Opinion in Immunology* 45, 43-51. 10.1016/j.coi.2017.01.002.
120. Dawson, C.A., Pal, B., Vaillant, F., Gandolfo, L.C., Liu, Z., Bleriot, C., Ginhoux, F., Smyth, G.K., Lindeman, G.J., Mueller, S.N., et al. (2020). Tissue-resident ductal macrophages survey the mammary epithelium and facilitate tissue remodelling. *Nat Cell Biol* 22, 546-558. 10.1038/s41556-020-0505-0.
121. Chen, X., Yang, M., Yin, J., Li, P., Zeng, S., Zheng, G., He, Z., Liu, H., Wang, Q., Zhang, F., et al. (2022). Tumor-associated macrophages promote epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer through CCL2/AKT/ β -catenin signaling. *Cell Commun Signal* 20, 92. 10.1186/s12964-022-00888-2.

122. Naik, S., Larsen, S.B., Cowley, C.J., and Fuchs, E. (2018). Two to Tango: Dialog between Immunity and Stem Cells in Health and Disease. *Cell* *175*, 908–920. 10.1016/j.cell.2018.08.071.
123. Ugel, S., De Sanctis, F., Mandruzzato, S., and Bronte, V. (2015). Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J. Clin. Invest.* *125*, 3365–3376. 10.1172/JCI80006.
124. Taniguchi, S., Elhance, A., Van Duzer, A., Kumar, S., Leitenberger, J.J., and Oshimori, N. (2020). Tumor-initiating cells establish an IL-33-TGF- β niche signaling loop to promote cancer progression. *Science* *369*, eaay1813. 10.1126/science.aay1813.
125. Jang, H.-J., Lee, H.-S., Yu, W., Ramineni, M., Truong, C.Y., Ramos, D., Splawn, T., Choi, J.M., Jung, S.Y., Lee, J.-S., et al. (2022). Therapeutic Targeting of Macrophage Plasticity Remodels the Tumor-Immune Microenvironment. *Cancer Research* *82*, 2593–2609. 10.1158/0008-5472.CAN-21-3506.
126. Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 178–196. 10.1038/nrm3758.
127. Fu, X.-T., Dai, Z., Song, K., Zhang, Z.-J., Zhou, Z.-J., Zhou, S.-L., Zhao, Y.-M., Xiao, Y.-S., Sun, Q.-M., Ding, Z.-B., et al. (2015). Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway. *Int J Oncol* *46*, 587–596. 10.3892/ijo.2014.2761.
128. Helm, O., Held-Feindt, J., Grage-Griebenow, E., Reiling, N., Ungefroren, H., Vogel, I., Krüger, U., Becker, T., Ebsen, M., Röcken, C., et al. (2014). Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer* *135*, 843–861. 10.1002/ijc.28736.
129. Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, T., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trümper, L., and Binder, C. (2006). Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 5454–5459. 10.1073/pnas.0509703103.
130. Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* *64*, 7022–7029. 10.1158/0008-5472.CAN-04-1449.
131. Engblom, C., Pfirschke, C., and Pittet, M.J. (2016). The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 447–462. 10.1038/nrc.2016.54.
132. Kusmartsev, S., and Gabrilovich, D.I. (2005). STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J. Immunol.* *174*, 4880–4891. 10.4049/jimmunol.174.8.4880.
133. Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., et al. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* *70*, 5728–5739. 10.1158/0008-5472.CAN-09-4672.
134. Geiger, R., Rieckmann, J.C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., et al. (2016). L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* *167*, 829–842.e13. 10.1016/j.cell.2016.09.031.
135. Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A.H., Piazuelo, M.B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E.M., et al. (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* *64*, 5839–5849. 10.1158/0008-5472.CAN-04-0465.
136. Chang, C.I., Liao, J.C., and Kuo, L. (2001). Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res* *61*, 1100–1106.
137. Kryczek, I., Zou, L., Rodriguez, P., Zhu, G., Wei, S., Mottram, P., Brumlik, M., Cheng, P., Curiel, T., Myers, L., et al. (2006). B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* *203*, 871–881. 10.1084/jem.20050930.
138. Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., et al. (2005). Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* *65*, 3044–3048. 10.1158/0008-5472.CAN-04-4505.
139. Marigo, I., Zilio, S., Desantis, G., Mlecnik, B., Agnellini, A.H.R., Ugel, S., Sasso, M.S., Qualls, J.E., Kratochvill, F., Zanovello, P., et al. (2016). T Cell Cancer Therapy Requires CD40-CD40L Activation of Tumor Necrosis Factor and Inducible Nitric-Oxide-Synthase-Producing Dendritic Cells. *Cancer Cell* *30*, 377–390. 10.1016/j.ccell.2016.08.004.
140. Lu, T., Ramakrishnan, R., Altiok, S., Youn, J.-I., Cheng, P., Celis, E., Pisarev, V., Sherman, S., Sporn, M.B., and Gabrilovich, D. (2011). Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Invest* *121*, 4015–4029. 10.1172/JCI45862.

141. Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D.L., Schneck, J., and Gabrilovich, D.I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 13, 828–835. 10.1038/nm1609.
142. Kuang, D.-M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J.-P., Wu, C., and Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* 206, 1327–1337. 10.1084/jem.20082173.
143. Lin, H., Wei, S., Hurt, E.M., Green, M.D., Zhao, L., Vatan, L., Szeliga, W., Herbst, R., Harms, P.W., Fecher, L.A., et al. (2018). Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest* 128, 805–815. 10.1172/JCI96113.
144. Ceeraz, S., Nowak, E.C., and Noelle, R.J. (2013). B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol* 34, 556–563. 10.1016/j.it.2013.07.003.
145. Li, J., Lee, Y., Li, Y., Jiang, Y., Lu, H., Zang, W., Zhao, X., Liu, L., Chen, Y., Tan, H., et al. (2018). Co-inhibitory Molecule B7 Superfamily Member 1 Expressed by Tumor-Infiltrating Myeloid Cells Induces Dysfunction of Anti-tumor CD8+ T Cells. *Immunity* 48, 773–786.e5. 10.1016/j.immuni.2018.03.018.
146. Kreymborg, K., Haak, S., Murali, R., Wei, J., Waitz, R., Gasteiger, G., Savage, P.A., van den Brink, M.R.M., and Allison, J.P. (2015). Ablation of B7-H3 but Not B7-H4 Results in Highly Increased Tumor Burden in a Murine Model of Spontaneous Prostate Cancer. *Cancer Immunol Res* 3, 849–854. 10.1158/2326-6066.CIR-15-0100.
147. Rahbar, R., Lin, A., Ghazarian, M., Yau, H.-L., Paramathas, S., Lang, P.A., Schildknecht, A., Elford, A.R., Garcia-Batres, C., Martin, B., et al. (2015). B7-H4 expression by nonhematopoietic cells in the tumor microenvironment promotes antitumor immunity. *Cancer Immunol Res* 3, 184–195. 10.1158/2326-6066.CIR-14-0113.
148. Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C.M.T., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E.S., Rugo, H.S., and Coussens, L.M. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell* 26, 623–637. 10.1016/j.ccell.2014.09.006.
149. Smith, L.K., Boukhaled, G.M., Condotta, S.A., Mazouz, S., Guthmiller, J.J., Vijay, R., Butler, N.S., Bruneau, J., Shoukry, N.H., Krawczyk, C.M., et al. (2018). Interleukin-10 Directly Inhibits CD8+ T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity* 48, 299–312.e5. 10.1016/j.immuni.2018.01.006.
150. Schuette, V., Embgenbroich, M., Ulas, T., Welz, M., Schulte-Schrepping, J., Draffehn, A.M., Quast, T., Koch, K., Nehring, M., König, J., et al. (2016). Mannose receptor induces T-cell tolerance via inhibition of CD45 and up-regulation of CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 10649–10654. 10.1073/pnas.1605885113.
151. Mitchem, J.B., Brennan, D.J., Knolhoff, B.L., Belt, B.A., Zhu, Y., Sanford, D.E., Belaygorod, L., Carpenter, D., Collins, L., Piwnicka-Worms, D., et al. (2013). Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res* 73, 1128–1141. 10.1158/0008-5472.CAN-12-2731.
152. Peranzoni, E., Lemoine, J., Vimeux, L., Feuillet, V., Barrin, S., Kantari-Mimoun, C., Bercovici, N., Guérin, M., Biton, J., Ouakrim, H., et al. (2018). Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E4041–E4050. 10.1073/pnas.1720948115.
153. Zhu, Y., Knolhoff, B.L., Meyer, M.A., Nywening, T.M., West, B.L., Luo, J., Wang-Gillam, A., Goedegebuure, S.P., Linehan, D.C., and DeNardo, D.G. (2014). CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res* 74, 5057–5069. 10.1158/0008-5472.CAN-13-3723.
154. Franciszkiewicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C., and Mami-Chouaib, F. (2012). Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res* 72, 6325–6332. 10.1158/0008-5472.CAN-12-2027.
155. Molon, B., Ugel, S., Del Pozzo, F., Soldani, C., Zilio, S., Avella, D., De Palma, A., Mauri, P., Monegal, A., Rescigno, M., et al. (2011). Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med* 208, 1949–1962. 10.1084/jem.20101956.
156. Sato, E., Simpson, K.L., Grisham, M.B., Koyama, S., and Robbins, R.A. (1999). Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on MCP-1-induced monocyte chemotactic activity in vitro. *Am J Physiol* 277, L543–549. 10.1152/ajplung.1999.277.3.L543.
157. Mariathasan, S., Turley, S.J., Nickles, D., Castiglioni, A., Yuen, K., Wang, Y., Kadel, E.E., Koepfen, H., Astarita, J.L., Cubas, R., et al. (2018). TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* 554, 544–548. 10.1038/nature25501.
158. Tauriello, D.V.F., Palomo-Ponce, S., Stork, D., Berenguer-Llergo, A., Badia-Ramentol, J., Iglesias, M., Sevillano, M., Ibiza, S., Cañellas, A., Hernando-Momblona, X., et al. (2018). TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* 554, 538–543. 10.1038/nature25492.

159. Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burrow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* *10*, 942–949. 10.1038/nm1093.
160. Dixit, A., Sarver, A.L., Zettervall, J., Huang, H., Zheng, K., Brekken, R.A., and Provenzano, P. (2022). Targeting TNF- α producing macrophages activate antitumor immunity in pancreatic cancer through IL33 signaling. *JCI Insight*, e153242. 10.1172/jci.insight.153242.
161. Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., et al. (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* *26*, 638–652. 10.1016/j.ccell.2014.09.007.
162. Roberts, E.W., Broz, M.L., Binnewies, M., Headley, M.B., Nelson, A.E., Wolf, D.M., Kaisho, T., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., and Krummel, M.F. (2016). Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* *30*, 324–336. 10.1016/j.ccell.2016.06.003.
163. Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoynazarova, M., Agudo, J., Tung, N., et al. (2016). Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* *44*, 924–938. 10.1016/j.immuni.2016.03.012.
164. Ahn, J., Xia, T., Rabasa Capote, A., Betancourt, D., and Barber, G.N. (2018). Extrinsic Phagocyte-Dependent STING Signaling Dictates the Immunogenicity of Dying Cells. *Cancer Cell* *33*, 862–873.e5. 10.1016/j.ccell.2018.03.027.
165. Cunha, L.D., Yang, M., Carter, R., Guy, C., Harris, L., Crawford, J.C., Quarato, G., Boada-Romero, E., Kalkavan, H., Johnson, M.D.L., et al. (2018). LC3-Associated Phagocytosis in Myeloid Cells Promotes Tumor Immune Tolerance. *Cell* *175*, 429–441.e16. 10.1016/j.cell.2018.08.061.
166. Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., and Hanahan, D. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* *339*, 58–61. 10.1038/339058a0.
167. Lin, E.Y., Li, J.-F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D.A., Qian, H., Xue, X., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* *66*, 11238–11246. 10.1158/0008-5472.CAN-06-1278.
168. De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L.S., Sampaolesi, M., and Naldini, L. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* *8*, 211–226. 10.1016/j.ccr.2005.08.002.
169. Mazzei, R., Pucci, F., Moi, D., Zonari, E., Ranghetti, A., Berti, A., Politi, L.S., Gentner, B., Brown, J.L., Naldini, L., et al. (2011). Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell* *19*, 512–526. 10.1016/j.ccr.2011.02.005.
170. Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* *8*, 618–631. 10.1038/nrc2444.
171. Yeo, E.-J., Cassetta, L., Qian, B.-Z., Lewkowich, I., Li, J., Stefater, J.A., Smith, A.N., Wiechmann, L.S., Wang, Y., Pollard, J.W., et al. (2014). Myeloid WNT7b mediates the angiogenic switch and metastasis in breast cancer. *Cancer Res* *74*, 2962–2973. 10.1158/0008-5472.CAN-13-2421.
172. Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* *67*, 2649–2656. 10.1158/0008-5472.CAN-06-1823.
173. Harney, A.S., Arwert, E.N., Entenberg, D., Wang, Y., Guo, P., Qian, B.-Z., Oktay, M.H., Pollard, J.W., Jones, J.G., and Condeelis, J.S. (2015). Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. *Cancer Discov* *5*, 932–943. 10.1158/2159-8290.CD-15-0012.
174. Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* *475*, 222–225. 10.1038/nature10138.
175. Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* *141*, 52–67. 10.1016/j.ccell.2010.03.015.
176. Sangaletti, S., Di Carlo, E., Gariboldi, S., Miotti, S., Cappetti, B., Parenza, M., Rumio, C., Brekken, R.A., Chiodoni, C., and Colombo, M.P. (2008). Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* *68*, 9050–9059. 10.1158/0008-5472.CAN-08-1327.
177. Brekken, R.A., Puolakkainen, P., Graves, D.C., Workman, G., Lubkin, S.R., and Sage, E.H. (2003). Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* *111*, 487–495. 10.1172/JCI16804.

178. Campo McKnight, D.A., Sosnoski, D.M., Koblinski, J.E., and Gay, C.V. (2006). Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone. *J Cell Biochem* 97, 288–302. 10.1002/jcb.20644.
179. Nielsen, S.R., Quaranta, V., Linford, A., Emeagi, P., Rainer, C., Santos, A., Ireland, L., Sakai, T., Sakai, K., Kim, Y.-S., et al. (2016). Macrophage-secreted granulins supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat Cell Biol* 18, 549–560. 10.1038/ncb3340.
180. Quaranta, V., Rainer, C., Nielsen, S.R., Raymant, M.L., Ahmed, M.S., Engle, D.D., Taylor, A., Murray, T., Campbell, F., Palmer, D.H., et al. (2018). Macrophage-Derived Granulins Drives Resistance to Immune Checkpoint Inhibition in Metastatic Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 78, 4253–4269. 10.1158/0008-5472.CAN-17-3876.
181. Pittet, M.J., Michielin, O., and Migliorini, D. (2022). Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat Rev Clin Oncol* 19, 402–421. 10.1038/s41571-022-00620-6.
182. Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196, 254–265. 10.1002/path.1027.
183. Zhang, Q., Liu, L., Gong, C., Shi, H., Zeng, Y., Wang, X., Zhao, Y., and Wei, Y. (2012). Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* 7, e50946. 10.1371/journal.pone.0050946.
184. Gentles, A.J., Newman, A.M., Liu, C.L., Bratman, S.V., Feng, W., Kim, D., Nair, V.S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C.D., et al. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 21, 938–945. 10.1038/nm.3909.
185. Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saatcioglu, H.D., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C.V., Kerwin, C.M., et al. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* 50, 1317–1334.e10. 10.1016/j.immuni.2019.03.009.
186. Di Caro, G., Cortese, N., Castino, G.F., Grizzi, F., Gavazzi, F., Ridolfi, C., Capretti, G., Mineri, R., Todoric, J., Zerbi, A., et al. (2016). Dual prognostic significance of tumour-associated macrophages in human pancreatic adenocarcinoma treated or untreated with chemotherapy. *Gut* 65, 1710–1720. 10.1136/gutjnl-2015-309193.
187. Krishna, C., DiNatale, R.G., Kuo, F., Srivastava, R.M., Vuong, L., Chowell, D., Gupta, S., Vanderbilt, C., Purohit, T.A., Liu, M., et al. (2021). Single cell sequencing links multiregional immune landscapes and tissue-resident T cells in ccRCC to tumor topology and therapy efficacy. *Cancer Cell* 39, 662–677.e6. 10.1016/j.ccell.2021.03.007.
188. Bassez, A., Vos, H., Van Dyck, L., Floris, G., Arijs, I., Desmedt, C., Boeckx, B., Vanden Bempt, M., Nevelsteen, I., Lambein, K., et al. (2021). A single-cell map of intratumoral changes during anti-PD1 treatment of patients with breast cancer. *Nat Med* 27, 820–832. 10.1038/s41591-021-01323-8.
189. Nalio Ramos, R., Missolo-Koussou, Y., Gerber-Ferder, Y., Bromley, C.P., Bugatti, M., Núñez, N.G., Tosello Boari, J., Richer, W., Menger, L., Denizéau, J., et al. (2022). Tissue-resident FOLR2+ macrophages associate with CD8+ T cell infiltration in human breast cancer. *Cell* 185, 1189–1207.e25. 10.1016/j.cell.2022.02.021.
190. Zhang, Y., Chen, H., Mo, H., Hu, X., Gao, R., Zhao, Y., Liu, B., Niu, L., Sun, X., Yu, X., et al. (2021). Single-cell analyses reveal key immune cell subsets associated with response to PD-L1 blockade in triple-negative breast cancer. *Cancer Cell* 39, 1578–1593.e8. 10.1016/j.ccell.2021.09.010.
191. Berry, S., Giraldo, N.A., Green, B.F., Cottrell, T.R., Stein, J.E., Engle, E.L., Xu, H., Ogurtsova, A., Roberts, C., Wang, D., et al. (2021). Analysis of multispectral imaging with the AstroPath platform informs efficacy of PD-1 blockade. *Science* 372, eaba2609. 10.1126/science.aba2609.
192. Pallasch, C.P., Leskov, I., Braun, C.J., Vorholt, D., Drake, A., Soto-Feliciano, Y.M., Bent, E.H., Schwamb, J., Iliopoulou, B., Kutsch, N., et al. (2014). Sensitizing protective tumor microenvironments to antibody-mediated therapy. *Cell* 156, 590–602. 10.1016/j.cell.2013.12.041.
193. Malesci, A., Bianchi, P., Celesti, G., Basso, G., Marchesi, F., Grizzi, F., Di Caro, G., Cavalleri, T., Rimassa, L., Palmqvist, R., et al. (2017). Tumor-associated macrophages and response to 5-fluorouracil adjuvant therapy in stage III colorectal cancer. *Oncoimmunology* 6, e1342918. 10.1080/2162402X.2017.1342918.
194. Klug, F., Prakash, H., Huber, P.E., Seibel, T., Bender, N., Halama, N., Pfirschke, C., Voss, R.H., Timke, C., Umansky, L., et al. (2013). Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS⁺/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer Cell* 24, 589–602. 10.1016/j.ccr.2013.09.014.
195. Mantovani, A., and Allavena, P. (2015). The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med* 212, 435–445. 10.1084/jem.20150295.
196. DeNardo, D.G., Brennan, D.J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S.L., Madden, S.F., Gallagher, W.M., Wadhvani, N., Keil, S.D., Junaid, S.A., et al. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* 1, 54–67. 10.1158/2159-8274.CD-10-0028.
197. Paulus, P., Stanley, E.R., Schäfer, R., Abraham, D., and Aharinejad, S. (2006). Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Res* 66, 4349–4356. 10.1158/0008-5472.CAN-05-3523.

198. Hughes, R., Qian, B.-Z., Rowan, C., Muthana, M., Keklikoglou, I., Olson, O.C., Tazzyman, S., Danson, S., Addison, C., Clemons, M., et al. (2015). Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. *Cancer Res* 75, 3479–3491. 10.1158/0008-5472.CAN-14-3587.
199. Zhang, X., Chen, Y., Hao, L., Hou, A., Chen, X., Li, Y., Wang, R., Luo, P., Ruan, Z., Ou, J., et al. (2016). Macrophages induce resistance to 5-fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer through the release of putrescine. *Cancer Lett* 381, 305–313. 10.1016/j.canlet.2016.08.004.
200. Madani, I., De Neve, W., and Mareel, M. (2008). Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis? *Bull Cancer* 95, 292–300. 10.1684/bdc.2008.0598.
201. Teresa Pinto, A., Laranjeiro Pinto, M., Patrícia Cardoso, A., Monteiro, C., Teixeira Pinto, M., Filipe Maia, A., Castro, P., Figueira, R., Monteiro, A., Marques, M., et al. (2016). Ionizing radiation modulates human macrophages towards a pro-inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities. *Sci Rep* 6, 18765. 10.1038/srep18765.
202. Neubert, N.J., Schmittnaegel, M., Bordry, N., Nassiri, S., Wald, N., Martignier, C., Tillé, L., Homicsko, K., Damsky, W., Maby-El Hajjami, H., et al. (2018). T cell-induced CSF1 promotes melanoma resistance to PD1 blockade. *Sci Transl Med* 10, eaan3311. 10.1126/scitranslmed.aan3311.
203. Nathan, C. (2008). Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nat Immunol* 9, 695–698. 10.1038/ni0708-695.
204. Kumar, V., Donthireddy, L., Marvel, D., Condamine, T., Wang, F., Lavilla-Alonso, S., Hashimoto, A., Vonteddu, P., Behera, R., Goins, M.A., et al. (2017). Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors. *Cancer Cell* 32, 654–668.e5. 10.1016/j.ccell.2017.10.005.
205. Cannarile, M.A., Weisser, M., Jacob, W., Jegg, A.-M., Ries, C.H., and Rüttinger, D. (2017). Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J Immunother Cancer* 5, 53. 10.1186/s40425-017-0257-y.
206. Guiducci, C., Vicari, A.P., Sangaletti, S., Trinchieri, G., and Colombo, M.P. (2005). Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res* 65, 3437–3446. 10.1158/0008-5472.CAN-04-4262.
207. Eubank, T.D., Roberts, R.D., Khan, M., Curry, J.M., Nuovo, G.J., Kuppusamy, P., and Marsh, C.B. (2009). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor inhibits breast cancer growth and metastasis by invoking an anti-angiogenic program in tumor-educated macrophages. *Cancer Res* 69, 2133–2140. 10.1158/0008-5472.CAN-08-1405.
208. Hoves, S., Ooi, C.-H., Wolter, C., Sade, H., Bissinger, S., Schmittnaegel, M., Ast, O., Giusti, A.M., Wartha, K., Runza, V., et al. (2018). Rapid activation of tumor-associated macrophages boosts preexisting tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine* 215, 859–876. 10.1084/jem.20171440.
209. Guerriero, J.L., Sotayo, A., Ponichtera, H.E., Castrillon, J.A., Pourzia, A.L., Schad, S., Johnson, S.F., Carrasco, R.D., Lazo, S., Bronson, R.T., et al. (2017). Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. *Nature* 543, 428–432. 10.1038/nature21409.
210. Lu, Z., Zou, J., Li, S., Topper, M.J., Tao, Y., Zhang, H., Jiao, X., Xie, W., Kong, X., Vaz, M., et al. (2020). Epigenetic therapy inhibits metastases by disrupting premetastatic niches. *Nature* 579, 284–290. 10.1038/s41586-020-2054-x.
211. Kaneda, M.M., Messer, K.S., Ralainirina, N., Li, H., Leem, C.J., Gorjestani, S., Woo, G., Nguyen, A.V., Figueiredo, C.C., Foubert, P., et al. (2016). PI3Ky is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature* 539, 437–442. 10.1038/nature19834.
212. van der Touw, W., Chen, H.-M., Pan, P.-Y., and Chen, S.-H. (2017). LILRB receptor-mediated regulation of myeloid cell maturation and function. *Cancer Immunol Immunother* 66, 1079–1087. 10.1007/s00262-017-2023-x.
213. Chen, H.-M., van der Touw, W., Wang, Y.S., Kang, K., Mai, S., Zhang, J., Alsina-Beauchamp, D., Duty, J.A., Mungamuri, S.K., Zhang, B., et al. (2018). Blocking immunoinhibitory receptor LILRB2 reprograms tumor-associated myeloid cells and promotes antitumor immunity. *J Clin Invest* 128, 5647–5662. 10.1172/JCI97570.
214. Jing, J., Yang, I.V., Hui, L., Patel, J.A., Evans, C.M., Prikeris, R., Kobzik, L., O'Connor, B.P., and Schwartz, D.A. (2013). Role of macrophage receptor with collagenous structure in innate immune tolerance. *J Immunol* 190, 6360–6367. 10.4049/jimmunol.1202942.
215. Georgoudaki, A.-M., Prokopec, K.E., Boura, V.F., Hellqvist, E., Sohn, S., Östling, J., Dahan, R., Harris, R.A., Rantalainen, M., Klevebring, D., et al. (2016). Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis. *Cell Rep* 15, 2000–2011. 10.1016/j.celrep.2016.04.084.
216. La Fleur, L., Boura, V.F., Alexeyenko, A., Berglund, A., Pontén, V., Mattsson, J.S., Djureinovic, D., Persson, J., Brunnström, H., Isaksson, J., et al. (2018). Expression of scavenger receptor MARCO defines a targetable tumor-associated macrophage subset in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*. 10.1002/ijc.31545.
217. La Fleur, L., Botling, J., He, F., Pelicano, C., Zhou, C., He, C., Palano, G., Mezheyski, A., Micke, P., Ravetch, J.V., et al. (2020). Targeting MARCO and IL-37R on immunosuppressive macrophages in lung cancer blocks regulatory T cells and supports cytotoxic lymphocyte function. *Cancer Res*. 10.1158/0008-5472.CAN-20-1885.

218. Deczkowska, A., Weiner, A., and Amit, I. (2020). The Physiology, Pathology, and Potential Therapeutic Applications of the TREM2 Signaling Pathway. *Cell* *181*, 1207–1217. 10.1016/j.cell.2020.05.003.
219. Binnewies, M., Pollack, J.L., Rudolph, J., Dash, S., Abushawish, M., Lee, T., Jahchan, N.S., Canaday, P., Lu, E., Norng, M., et al. (2021). Targeting TREM2 on tumor-associated macrophages enhances immunotherapy. *Cell Rep* *37*, 109844. 10.1016/j.celrep.2021.109844.
220. Katzenelenbogen, Y., Sheban, F., Yalin, A., Yofe, I., Svetlichnyy, D., Jaitin, D.A., Bornstein, C., Moshe, A., Keren-Shaul, H., Cohen, M., et al. (2020). Coupled scRNA-Seq and Intracellular Protein Activity Reveal an Immunosuppressive Role of TREM2 in Cancer. *Cell* *182*, 872-885.e19. 10.1016/j.cell.2020.06.032.
221. Molgora, M., Esaulova, E., Vermi, W., Hou, J., Chen, Y., Luo, J., Brioschi, S., Bugatti, M., Omodei, A.S., Ricci, B., et al. (2020). TREM2 Modulation Remodels the Tumor Myeloid Landscape Enhancing Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* *182*, 886-900.e17. 10.1016/j.cell.2020.07.013.
222. Vergote, I., Scambia, G., O'Malley, D.M., Van Calster, B., Park, S.-Y., Del Campo, J.M., Meier, W., Bamias, A., Colombo, N., Wenham, R.M., et al. (2019). Trebananib or placebo plus carboplatin and paclitaxel as first-line treatment for advanced ovarian cancer (TRINOVA-3/ENGOT-ov2/GOG-3001): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* *20*, 862–876. 10.1016/S1470-2045(19)30178-0.
223. Kienast, Y., Klein, C., Scheuer, W., Raemsch, R., Lorenzon, E., Bernicke, D., Herting, F., Yu, S., The, H.H., Martarello, L., et al. (2013). Ang-2-VEGF-A CrossMab, a novel bispecific human IgG1 antibody blocking VEGF-A and Ang-2 functions simultaneously, mediates potent antitumor, antiangiogenic, and antimetastatic efficacy. *Clin Cancer Res* *19*, 6730–6740. 10.1158/1078-0432.CCR-13-0081.
224. Kloepper, J., Riedemann, L., Amoozgar, Z., Seano, G., Susek, K., Yu, V., Dalvie, N., Amelung, R.L., Datta, M., Song, J.W., et al. (2016). Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 4476–4481. 10.1073/pnas.1525360113.
225. Oldenborg, P.-A. (2013). CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease. *ISRN Hematol* *2013*, 614619. 10.1155/2013/614619.
226. Willingham, S.B., Volkmer, J.-P., Gentles, A.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S.S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J.D., et al. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 6662–6667. 10.1073/pnas.1121623109.
227. Barkal, A.A., Weiskopf, K., Kao, K.S., Gordon, S.R., Rosental, B., Yiu, Y.Y., George, B.M., Markovic, M., Ring, N.G., Tsai, J.M., et al. (2018). Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nat Immunol* *19*, 76–84. 10.1038/s41590-017-0004-z.
228. Barkal, A.A., Brewer, R.E., Markovic, M., Kowarsky, M., Barkal, S.A., Zaro, B.W., Krishnan, V., Hatakeyama, J., Dorigo, O., Barkal, L.J., et al. (2019). CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature* *572*, 392–396. 10.1038/s41586-019-1456-0.
229. Sun, C., Mezzadra, R., and Schumacher, T.N. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* *48*, 434–452. 10.1016/j.immuni.2018.03.014.
230. Dhupkar, P., Gordon, N., Stewart, J., and Kleinerman, E.S. (2018). Anti-PD-1 therapy redirects macrophages from an M2 to an M1 phenotype inducing regression of OS lung metastases. *Cancer Med* *7*, 2654–2664. 10.1002/cam4.1518.
231. Hartley, G.P., Chow, L., Ammons, D.T., Wheat, W.H., and Dow, S.W. (2018). Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation. *Cancer Immunol Res* *6*, 1260–1273. 10.1158/2326-6066.CIR-17-0537.
232. Jing, W., Guo, X., Wang, G., Bi, Y., Han, L., Zhu, Q., Qiu, C., Tanaka, M., and Zhao, Y. (2020). Breast cancer cells promote CD169+ macrophage-associated immunosuppression through JAK2-mediated PD-L1 upregulation on macrophages. *Int Immunopharmacol* *78*, 106012. 10.1016/j.intimp.2019.106012.
233. Gordon, S.R., Maute, R.L., Dulken, B.W., Hutter, G., George, B.M., McCracken, M.N., Gupta, R., Tsai, J.M., Sinha, R., Corey, D., et al. (2017). PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* *545*, 495–499. 10.1038/nature22396.
234. Johnson, L.R., Lee, D.Y., Eacret, J.S., Ye, D., June, C.H., and Minn, A.J. (2021). The immunostimulatory RNA RN7SL1 enables CAR-T cells to enhance autonomous and endogenous immune function. *Cell* *184*, 4981-4995.e14. 10.1016/j.cell.2021.08.004.
235. Rodriguez-Garcia, A., Lynn, R.C., Poussin, M., Eiva, M.A., Shaw, L.C., O'Connor, R.S., Minutolo, N.G., Casado-Medrano, V., Lopez, G., Matsuyama, T., et al. (2021). CAR-T cell-mediated depletion of immunosuppressive tumor-associated macrophages promotes endogenous antitumor immunity and augments adoptive immunotherapy. *Nat Commun* *12*, 877. 10.1038/s41467-021-20893-2.
236. Chmielewski, M., Kopecky, C., Hombach, A.A., and Abken, H. (2011). IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res* *71*, 5697–5706. 10.1158/0008-5472.CAN-11-0103.

237. Kuhn, N.F., Purdon, T.J., van Leeuwen, D.G., Lopez, A.V., Curran, K.J., Daniyan, A.F., and Brentjens, R.J. (2019). CD40 Ligand-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells Enhance Antitumor Function by Eliciting an Endogenous Antitumor Response. *Cancer Cell* 35, 473-488.e6. 10.1016/j.ccell.2019.02.006.
238. Klichinsky, M., Ruella, M., Shestova, O., Lu, X.M., Best, A., Zeeman, M., Schmierer, M., Gabrusiewicz, K., Anderson, N.R., Petty, N.E., et al. (2020). Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol* 38, 947-953. 10.1038/s41587-020-0462-y.
239. Zhang, W., Liu, L., Su, H., Liu, Q., Shen, J., Dai, H., Zheng, W., Lu, Y., Zhang, W., Bei, Y., et al. (2019). Chimeric antigen receptor macrophage therapy for breast tumours mediated by targeting the tumour extracellular matrix. *Br J Cancer* 121, 837-845. 10.1038/s41416-019-0578-3.
240. Kaczanowska, S., Beury, D.W., Gopalan, V., Tycko, A.K., Qin, H., Clements, M.E., Drake, J., Nwanze, C., Murgai, M., Rae, Z., et al. (2021). Genetically engineered myeloid cells rebalance the core immune suppression program in metastasis. *Cell* 184, 2033-2052.e21. 10.1016/j.cell.2021.02.048.
241. Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8, 22-33. 10.1038/nri2217.
242. Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 30, 429-457. 10.1146/annurev-immunol-020711-075032.
243. Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5, 943-952. 10.1038/ni1100.
244. Caron, G., Le Gallou, S., Lamy, T., Tarte, K., and Fest, T. (2009). CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *J Immunol* 182, 7595-7602. 10.4049/jimmunol.0804272.
245. De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* 15, 137-148. 10.1038/nri3804.
246. Victora, G.D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A.B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., and Nussenzweig, M.C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* 120, 2240-2248. 10.1182/blood-2012-03-415380.
247. Roco, J.A., Mesin, L., Binder, S.C., Nefzger, C., Gonzalez-Figueroa, P., Canete, P.F., Ellyard, J., Shen, Q., Robert, P.A., Cappello, J., et al. (2019). Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity* 51, 337-350.e7. 10.1016/j.immuni.2019.07.001.
248. Gitlin, A.D., Shulman, Z., and Nussenzweig, M.C. (2014). Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* 509, 637-640. 10.1038/nature13300.
249. Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* 15, 172-184. 10.1038/nri3814.
250. Ci, W., Polo, J.M., Cerchiatti, L., Shaknovich, R., Wang, L., Yang, S.N., Ye, K., Farinha, P., Horsman, D.E., Gascoyne, R.D., et al. (2009). The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* 113, 5536-5548. 10.1182/blood-2008-12-193037.
251. Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 251-262. 10.1038/nrc1589.
252. Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580-5594. 10.1038/sj.onc.1204640.
253. Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C., Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* 40, 108-112. 10.1038/ng.2007.35.
254. Scott, D.W., and Gascoyne, R.D. (2014). The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nature Reviews Cancer* 14, 517. 10.1038/nrc3774.
255. Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375-2390. 10.1182/blood-2016-01-643569.
256. Milpied, P., Gandhi, A.K., Cartron, G., Pasqualucci, L., Tarte, K., Nadel, B., and Roulland, S. (2021). Follicular lymphoma dynamics. In *Advances in Immunology* (Elsevier), pp. 43-103. 10.1016/bs.ai.2021.05.002.
257. Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341, 1520-1529. 10.1056/NEJM19991113412007.
258. Stevenson, F.K., Sahota, S.S., Ottensmeier, C.H., Zhu, D., Forconi, F., and Hamblin, T.J. (2001). The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Adv Cancer Res* 83, 81-116. 10.1016/s0065-230x(01)83004-9.

259. Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* *403*, 503–511. 10.1038/35000501.
260. Sehn, L.H., and Salles, G. (2021). Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* *384*, 842–858. 10.1056/NEJMra2027612.
261. Roos, A.J.D., Fritschi, L., Ward, M.H., Monnereau, A., Hofmann, J., Bernstein, L., Bhatti, P., Moreno, Y.B., Benke, G., Casabonne, D., et al. (2022). Herbicide use in farming and other jobs in relation to non-Hodgkin's lymphoma (NHL) risk. *Occup Environ Med*. 10.1136/oemed-2022-108371.
262. Cheson, B.D., Fisher, R.I., Barrington, S.F., Cavalli, F., Schwartz, L.H., Zucca, E., Lister, T.A., Alliance, Australasian Leukaemia and Lymphoma Group, Eastern Cooperative Oncology Group, European Mantle Cell Lymphoma Consortium, et al. (2014). Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* *32*, 3059–3068. 10.1200/JCO.2013.54.8800.
263. Lenz, G., Wright, G., Dave, S.S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., et al. (2008). Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* *359*, 2313–2323. 10.1056/NEJMoa0802885.
264. Scott, D.W., Mottok, A., Ennishi, D., Wright, G.W., Farinha, P., Ben-Neriah, S., Kridel, R., Barry, G.S., Hother, C., Abrisqueta, P., et al. (2015). Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol* *33*, 2848–2856. 10.1200/JCO.2014.60.2383.
265. Chapuy, B., Stewart, C., Dunford, A.J., Kim, J., Kamburov, A., Redd, R.A., Lawrence, M.S., Roemer, M.G.M., Li, A.J., Ziepert, M., et al. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* *24*, 679–690. 10.1038/s41591-018-0016-8.
266. Schmitz, R., Wright, G.W., Huang, D.W., Johnson, C.A., Phelan, J.D., Wang, J.Q., Roulland, S., Kasbekar, M., Young, R.M., Shaffer, A.L., et al. (2018). Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* *378*, 1396–1407. 10.1056/NEJMoa1801445.
267. Steen, C.B., Luca, B.A., Esfahani, M.S., Azizi, A., Sworder, B.J., Nabet, B.Y., Kurtz, D.M., Liu, C.L., Khameneh, F., Advani, R.H., et al. (2021). The landscape of tumor cell states and ecosystems in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, S1535610821004517. 10.1016/j.ccell.2021.08.011.
268. Wright, G.W., Huang, D.W., Phelan, J.D., Coulibaly, Z.A., Roulland, S., Young, R.M., Wang, J.Q., Schmitz, R., Morin, R.D., Tang, J., et al. (2020). A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell* *37*, 551-568.e14. 10.1016/j.ccell.2020.03.015.
269. Rosenwald, A., Bens, S., Advani, R., Barrans, S., Copie-Bergman, C., Elsensohn, M.-H., Natkunam, Y., Calaminici, M., Sander, B., Baia, M., et al. (2019). Prognostic Significance of MYC Rearrangement and Translocation Partner in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol* *37*, 3359–3368. 10.1200/JCO.19.00743.
270. Scott, D.W., King, R.L., Staiger, A.M., Ben-Neriah, S., Jiang, A., Horn, H., Mottok, A., Farinha, P., Slack, G.W., Ennishi, D., et al. (2018). High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. *Blood* *131*, 2060–2064. 10.1182/blood-2017-12-820605.
271. Ennishi, D., Jiang, A., Boyle, M., Collinge, B., Grande, B.M., Ben-Neriah, S., Rushton, C., Tang, J., Thomas, N., Slack, G.W., et al. (2019). Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* *37*, 190–201. 10.1200/JCO.18.01583.
272. Barrington, S.F., Mikhaeel, N.G., Kostakoglu, L., Meignan, M., Hutchings, M., Müller, S.P., Schwartz, L.H., Zucca, E., Fisher, R.I., Trotman, J., et al. (2014). Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol* *32*, 3048–3058. 10.1200/JCO.2013.53.5229.
273. Cheson, B.D., Ansell, S., Schwartz, L., Gordon, L.I., Advani, R., Jacene, H.A., Hoos, A., Barrington, S.F., and Armand, P. (2016). Refinement of the Lugano Classification lymphoma response criteria in the era of immunomodulatory therapy. *Blood* *128*, 2489–2496. 10.1182/blood-2016-05-718528.
274. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project (1993). A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* *329*, 987–994. 10.1056/NEJM199309303291402.
275. Ruppert, A.S., Dixon, J.G., Salles, G., Wall, A., Cunningham, D., Poeschel, V., Haioun, C., Tilly, H., Ghesquieres, H., Ziepert, M., et al. (2020). International prognostic indices in diffuse large B-cell lymphoma: a comparison of IPI, R-IPI, and NCCN-IPI. *Blood* *135*, 2041–2048. 10.1182/blood.2019002729.
276. Sehn, L.H., Berry, B., Chhanabhai, M., Fitzgerald, C., Gill, K., Hoskins, P., Klasa, R., Savage, K.J., Shenkier, T., Sutherland, J., et al. (2007). The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* *109*, 1857–1861. 10.1182/blood-2006-08-038257.
277. Zhou, Z., Sehn, L.H., Rademaker, A.W., Gordon, L.I., Lacasce, A.S., Crosby-Thompson, A., Vanderplas, A., Zelenetz, A.D., Abel, G.A., Rodriguez, M.A., et al. (2014). An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients

- with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood* 123, 837–842. 10.1182/blood-2013-09-524108.
278. Maurer, M.J., Ghesquières, H., Jais, J.-P., Witzig, T.E., Haioun, C., Thompson, C.A., Delarue, R., Micallef, I.N., Peyrade, F., Macon, W.R., et al. (2014). Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J Clin Oncol* 32, 1066–1073. 10.1200/JCO.2013.51.5866.
279. Abramson, J.S., Palomba, M.L., Gordon, L.I., Lunning, M.A., Wang, M., Arnason, J., Mehta, A., Purev, E., Maloney, D.G., Andreadis, C., et al. (2020). Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet* 396, 839–852. 10.1016/S0140-6736(20)31366-0.
280. Chong, E.A., Ruella, M., and Schuster, S.J. (2021). Five-Year Outcomes for Refractory B-Cell Lymphomas with CAR T-Cell Therapy. *N Engl J Med* 384, 673–674. 10.1056/NEJMc2030164.
281. Jacobson, C., Locke, F.L., Ghobadi, A., Miklos, D.B., Lekakis, L.J., Oluwole, O.O., Lin, Y., Hill, B.T., Timmerman, J.M., Deol, A., et al. (2021). Long-Term (≥ 4 Year and ≥ 5 Year) Overall Survival (OS) By 12- and 24-Month Event-Free Survival (EFS): An Updated Analysis of ZUMA-1, the Pivotal Study of Axicabtagene Ciloleucel (Axi-Cel) in Patients (Pts) with Refractory Large B-Cell Lymphoma (LBCL). *Blood* 138, 1764. 10.1182/blood-2021-148078.
282. Locke, F.L., Miklos, D.B., Jacobson, C.A., Perales, M.-A., Kersten, M.-J., Oluwole, O.O., Ghobadi, A., Rapoport, A.P., McGuirk, J., Pagel, J.M., et al. (2022). Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 386, 640–654. 10.1056/NEJMoa2116133.
283. Neelapu, S.S., Locke, F.L., Bartlett, N.L., Lekakis, L.J., Miklos, D.B., Jacobson, C.A., Braunschweig, I., Oluwole, O.O., Siddiqi, T., Lin, Y., et al. (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 377, 2531–2544. 10.1056/NEJMoa1707447.
284. Schuster, S.J., Bishop, M.R., Tam, C.S., Waller, E.K., Borchmann, P., McGuirk, J.P., Jäger, U., Jaglowski, S., Andreadis, C., Westin, J.R., et al. (2019). Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 380, 45–56. 10.1056/NEJMoa1804980.
285. Sehgal, A., Hoda, D., Riedell, P.A., Ghosh, N., Hamadani, M., Hildebrandt, G.C., Godwin, J.E., Reagan, P.M., Wagner-Johnston, N., Essell, J., et al. (2022). Lisocabtagene maraleucel as second-line therapy in adults with relapsed or refractory large B-cell lymphoma who were not intended for haematopoietic stem cell transplantation (PILOT): an open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* 23, 1066–1077. 10.1016/S1470-2045(22)00339-4.
286. Duell, J., Maddocks, K.J., González-Barca, E., Jurczak, W., Liberati, A.M., De Vos, S., Nagy, Z., Obr, A., Gaidano, G., Abrisqueta, P., et al. (2021). Long-term outcomes from the Phase II L-MIND study of tafasitamab (MOR208) plus lenalidomide in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 106, 2417–2426. 10.3324/haematol.2020.275958.
287. Salles, G., Duell, J., González Barca, E., Tournilhac, O., Jurczak, W., Liberati, A.M., Nagy, Z., Obr, A., Gaidano, G., André, M., et al. (2020). Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology* 21, 978–988. 10.1016/S1470-2045(20)30225-4.
288. Petrich, A.M., Gandhi, M., Jovanovic, B., Castillo, J.J., Rajguru, S., Yang, D.T., Shah, K.A., Whyman, J.D., Lansigan, F., Hernandez-Illizaliturri, F.J., et al. (2014). Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood* 124, 2354–2361. 10.1182/blood-2014-05-578963.
289. Ansell, S.M., Minnema, M.C., Johnson, P., Timmerman, J.M., Armand, P., Shipp, M.A., Rodig, S.J., Ligon, A.H., Roemer, M.G.M., Reddy, N., et al. (2019). Nivolumab for Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Patients Ineligible for or Having Failed Autologous Transplantation: A Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol* 37, 481–489. 10.1200/JCO.18.00766.
290. Davies, A., Cummin, T.E., Barrans, S., Maishman, T., Mamot, C., Novak, U., Caddy, J., Stanton, L., Kazmi-Stokes, S., McMillan, A., et al. (2019). Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemoimmunotherapy for diffuse large B-cell lymphoma (REMoDL-B): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 20, 649–662. 10.1016/S1470-2045(18)30935-5.
291. Leonard, J.P., Kolibaba, K.S., Reeves, J.A., Tulpule, A., Flinn, I.W., Kolevska, T., Robles, R., Flowers, C.R., Collins, R., DiBella, N.J., et al. (2017). Randomized Phase II Study of R-CHOP With or Without Bortezomib in Previously Untreated Patients With Non-Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 35, 3538–3546. 10.1200/JCO.2017.73.2784.
292. Wilson, W.H., Young, R.M., Schmitz, R., Yang, Y., Pittaluga, S., Wright, G., Lih, C.-J., Williams, P.M., Shaffer, A.L., Gerecitano, J., et al. (2015). Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med* 21, 922–926. 10.1038/nm.3884.
293. Younes, A., Sehn, L.H., Johnson, P., Zinzani, P.L., Hong, X., Zhu, J., Patti, C., Belada, D., Samoilova, O., Suh, C., et al. (2019). Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine,

- and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 37, 1285–1295. 10.1200/JCO.18.02403.
294. Czuczman, M.S., Trněný, M., Davies, A., Rule, S., Linton, K.M., Wagner-Johnston, N., Gascoyne, R.D., Slack, G.W., Brousset, P., Eberhard, D.A., et al. (2017). A Phase 2/3 Multicenter, Randomized, Open-Label Study to Compare the Efficacy and Safety of Lenalidomide Versus Investigator's Choice in Patients with Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* 23, 4127–4137. 10.1158/1078-0432.CCR-16-2818.
295. Nowakowski, G.S., Hong, F., Scott, D.W., Macon, W.R., King, R.L., Habermann, T.M., Wagner-Johnston, N., Casulo, C., Wade, J.L., Nagargoje, G.G., et al. (2021). Addition of Lenalidomide to R-CHOP Improves Outcomes in Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Randomized Phase II US Intergroup Study ECOG-ACRIN E1412. *J Clin Oncol* 39, 1329–1338. 10.1200/JCO.20.01375.
296. Nowakowski, G.S., Chiappella, A., Gascoyne, R.D., Scott, D.W., Zhang, Q., Jurczak, W., Özcan, M., Hong, X., Zhu, J., Jin, J., et al. (2021). ROBUST: A Phase III Study of Lenalidomide Plus R-CHOP Versus Placebo Plus R-CHOP in Previously Untreated Patients With ABC-Type Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 39, 1317–1328. 10.1200/JCO.20.01366.
297. Davids, M.S., Roberts, A.W., Seymour, J.F., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Wierda, W.G., Puvvada, S., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Salem, A.H., et al. (2017). Phase I First-in-Human Study of Venetoclax in Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* 35, 826–833. 10.1200/JCO.2016.70.4320.
298. Italiano, A., Soria, J.-C., Toulmonde, M., Michot, J.-M., Lucchesi, C., Varga, A., Coindre, J.-M., Blakemore, S.J., Clawson, A., Suttle, B., et al. (2018). Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol* 19, 649–659. 10.1016/S1470-2045(18)30145-1.
299. Morschhauser, F., Salles, G., McKay, P., Tilly, H., Schmitt, A., Gerecitano, J., Johnson, P., Le Gouill, S., Dickinson, M. J., Fruchart, C., et al. (2017). Interim Report from a Phase 2 Multicenter Study of Tazemetostat, an Ezh2 Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Hematological Oncology* 35, 24–25. 10.1002/hon.2437_3.
300. Sarkozy, C., Morschhauser, F., Dubois, S., Molina, T., Michot, J.M., Cullières-Dartigues, P., Suttle, B., Karlin, L., Le Gouill, S., Picquenot, J.-M., et al. (2020). A LYSA Phase Ib Study of Tazemetostat (EPZ-6438) plus R-CHOP in Patients with Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) with Poor Prognosis Features. *Clin Cancer Res* 26, 3145–3153. 10.1158/1078-0432.CCR-19-3741.
302. Morin, R.D., Mendez-Lago, M., Mungall, A.J., Goya, R., Mungall, K.L., Corbett, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Chiu, R., Field, M., et al. (2011). Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476, 298–303. 10.1038/nature10351.
303. Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2018). Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 131, 2307–2319. 10.1182/blood-2017-11-764332.
304. Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7837–7841. 10.1073/pnas.79.24.7837.
305. Reddy, A., Zhang, J., Davis, N.S., Moffitt, A.B., Love, C.L., Waldrop, A., Leppa, S., Pasanen, A., Meriranta, L., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., et al. (2017). Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* 171, 481–494.e15. 10.1016/j.cell.2017.09.027.
306. Pasqualucci, L., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., Wells, V.A., Grunn, A., Messina, M., Elliot, O., et al. (2011). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.* 43, 830–837. 10.1038/ng.892.
307. Pasqualucci, L., Dominguez-Sola, D., Chiarenza, A., Fabbri, G., Grunn, A., Trifonov, V., Kasper, L.H., Lerach, S., Tang, H., Ma, J., et al. (2011). Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 471, 189–195. 10.1038/nature09730.
308. Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A.A., Wang, K., Lim, W.-K., Kitagawa, Y., Schneider, C., Alvarez, M.J., Califano, A., et al. (2010). Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* 115, 975–984. 10.1182/blood-2009-06-227017.
309. Phan, R.T., and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432, 635–639. 10.1038/nature03147.
310. Phan, R.T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., and Dalla-Favera, R. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 6, 1054–1060. 10.1038/ni1245.
311. Ranuncolo, S.M., Polo, J.M., Dierov, J., Singer, M., Kuo, T., Greally, J., Green, R., Carroll, M., and Melnick, A. (2007). Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol* 8, 705–714. 10.1038/ni1478.

312. Ranuncolo, S.M., Polo, J.M., and Melnick, A. (2008). BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. *Blood Cells Mol Dis* 41, 95–99. 10.1016/j.bcmd.2008.02.003.
313. Saito, M., Novak, U., Piovan, E., Basso, K., Sumazin, P., Schneider, C., Crespo, M., Shen, Q., Bhagat, G., Califano, A., et al. (2009). BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11294–11299. 10.1073/pnas.0903854106.
314. Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltneane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51–62. 10.1016/s1074-7613(02)00335-7.
315. Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 173, 1158–1165. 10.4049/jimmunol.173.2.1158.
316. Iqbal, J., Greiner, T.C., Patel, K., Dave, B.J., Smith, L., Ji, J., Wright, G., Sanger, W.G., Pickering, D.L., Jain, S., et al. (2007). Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 21, 2332–2343. 10.1038/sj.leu.2404856.
317. Ye, B.H., Chaganti, S., Chang, C.C., Niu, H., Corradini, P., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1995). Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J* 14, 6209–6217. 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00311.x.
318. Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R.S.K., and Dalla-Favera, R. (2003). Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101, 2914–2923. 10.1182/blood-2002-11-3387.
319. Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2007). A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* 12, 280–292. 10.1016/j.ccr.2007.08.011.
320. Wang, X., Li, Z., Naganuma, A., and Ye, B.H. (2002). Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15018–15023. 10.1073/pnas.232581199.
321. Challa-Malladi, M., Lieu, Y.K., Califano, O., Holmes, A.B., Bhagat, G., Murty, V.V., Dominguez-Sola, D., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2011). Combined genetic inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 20, 728–740. 10.1016/j.ccr.2011.11.006.
322. Rimsza, L.M., Roberts, R.A., Miller, T.P., Unger, J.M., LeBlanc, M., Braziel, R.M., Weisenberger, D.D., Chan, W.C., Muller-Hermelink, H.K., Jaffe, E.S., et al. (2004). Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 103, 4251–4258. 10.1182/blood-2003-07-2365.
323. Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltneane, J.M., et al. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346, 1937–1947. 10.1056/NEJMoa012914.
324. Chong, L.C., Twa, D.D.W., Mottok, A., Ben-Neriah, S., Woolcock, B.W., Zhao, Y., Savage, K.J., Marra, M.A., Scott, D.W., Gascoyne, R.D., et al. (2016). Comprehensive characterization of programmed death ligand structural rearrangements in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 128, 1206–1213. 10.1182/blood-2015-11-683003.
325. Georgiou, K., Chen, L., Berglund, M., Ren, W., de Miranda, N.F.C.C., Lisboa, S., Fangazio, M., Zhu, S., Hou, Y., Wu, K., et al. (2016). Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 127, 3026–3034. 10.1182/blood-2015-12-686550.
326. Godfrey, J., Tumuluru, S., Bao, R., Leukam, M., Venkataraman, G., Phillip, J., Fitzpatrick, C., McElherne, J., MacNabb, B.W., Orłowski, R., et al. (2019). PD-L1 gene alterations identify a subset of diffuse large B-cell lymphoma harboring a T-cell-inflamed phenotype. *Blood* 133, 2279–2290. 10.1182/blood-2018-10-879015.
327. Morin, R.D., Assouline, S., Alcaide, M., Mohajeri, A., Johnston, R.L., Chong, L., Grewal, J., Yu, S., Fornika, D., Bushell, K., et al. (2016). Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res* 22, 2290–2300. 10.1158/1078-0432.CCR-15-2123.
328. Dominguez-Sola, D., Kung, J., Holmes, A.B., Wells, V.A., Mo, T., Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2015). The FOXO1 Transcription Factor Instructs the Germinal Center Dark Zone Program. *Immunity* 43, 1064–1074. 10.1016/j.immuni.2015.10.015.
329. Sander, S., Chu, V.T., Yasuda, T., Franklin, A., Graf, R., Calado, D.P., Li, S., Imami, K., Selbach, M., Di Virgilio, M., et al. (2015). PI3 Kinase and FOXO1 Transcription Factor Activity Differentially Control B Cells in the Germinal Center Light and Dark Zones. *Immunity* 43, 1075–1086. 10.1016/j.immuni.2015.10.021.
330. Barrans, S.L., Evans, P.A.S., O'Connor, S.J.M., Kendall, S.J., Owen, R.G., Haynes, A.P., Morgan, G.J., and Jack, A.S. (2003). The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res* 9, 2133–2139.

331. Iqbal, J., Sanger, W.G., Horsman, D.E., Rosenwald, A., Pickering, D.L., Dave, B., Dave, S., Xiao, L., Cao, K., Zhu, Q., et al. (2004). BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 165, 159–166. 10.1016/s0002-9440(10)63284-1.
332. Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., and Eisenman, R.N. (2014). An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a014357. 10.1101/cshperspect.a014357.
333. Dominguez-Sola, D., Vitorica, G.D., Ying, C.Y., Phan, R.T., Saito, M., Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2012). The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol* 13, 1083–1091. 10.1038/ni.2428.
334. Karube, K., and Campo, E. (2015). MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol* 52, 97–106. 10.1053/j.seminhematol.2015.01.009.
335. Barrans, S., Crouch, S., Smith, A., Turner, K., Owen, R., Patmore, R., Roman, E., and Jack, A. (2010). Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 28, 3360–3365. 10.1200/JCO.2009.26.3947.
336. Burotto, M., Berkovits, A., and Dunleavy, K. (2016). Double hit lymphoma: from biology to therapeutic implications. *Expert Rev Hematol* 9, 669–678. 10.1080/17474086.2016.1182858.
337. Béguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K.L., Rosen, M., Shen, H., Yang, S.N., Wang, L., Ezponda, T., et al. (2013). EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell* 23, 677–692. 10.1016/j.ccr.2013.04.011.
338. Caganova, M., Carrisi, C., Varano, G., Mainoldi, F., Zanardi, F., Germain, P.-L., George, L., Alberghini, F., Ferrarini, L., Talukder, A.K., et al. (2013). Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest* 123, 5009–5022. 10.1172/JCI70626.
339. Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 42, 181–185. 10.1038/ng.518.
340. Sneeringer, C.J., Scott, M.P., Kuntz, K.W., Knutson, S.K., Pollock, R.M., Richon, V.M., and Copeland, R.A. (2010). Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20980–20985. 10.1073/pnas.1012525107.
341. Green, J.A., and Cyster, J.G. (2012). S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunol Rev* 247, 36–51. 10.1111/j.1600-065X.2012.01114.x.
342. Muppidi, J.R., Schmitz, R., Green, J.A., Xiao, W., Larsen, A.B., Braun, S.E., An, J., Xu, Y., Rosenwald, A., Ott, G., et al. (2014). Loss of signalling via Gα13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature* 516, 254–258. 10.1038/nature13765.
343. Cattoretti, G., Mandelbaum, J., Lee, N., Chaves, A.H., Mahler, A.M., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L., and MacLennan, A.J. (2009). Targeted disruption of the S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor gene leads to diffuse large B-cell lymphoma formation. *Cancer Res* 69, 8686–8692. 10.1158/0008-5472.CAN-09-1110.
344. Steinberg, M.W., Cheung, T.C., and Ware, C.F. (2011). The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev* 244, 169–187. 10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x.
345. Boice, M., Salloum, D., Mourcin, F., Sanghvi, V., Amin, R., Oricchio, E., Jiang, M., Mottok, A., Denis-Lagache, N., Ciriello, G., et al. (2016). Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell* 167, 405–418.e13. 10.1016/j.cell.2016.08.032.
346. Lenz, G., Wright, G.W., Emre, N.C.T., Kohlhammer, H., Dave, S.S., Davis, R.E., Carty, S., Lam, L.T., Shaffer, A.L., Xiao, W., et al. (2008). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13520–13525. 10.1073/pnas.0804295105.
347. Davis, R.E., Ngo, V.N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R.M., Romesser, P.B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., et al. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463, 88–92. 10.1038/nature08638.
348. Young, R.M., Wu, T., Schmitz, R., Dawood, M., Xiao, W., Phelan, J.D., Xu, W., Menard, L., Meffre, E., Chan, W.-C.C., et al. (2015). Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 13447–13454. 10.1073/pnas.1514944112.
349. Lam, L.T., Wright, G., Davis, R.E., Lenz, G., Farinha, P., Dang, L., Chan, J.W., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., and Staudt, L.M. (2008). Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor-κB pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 111, 3701–3713. 10.1182/blood-2007-09-111948.
350. Ngo, V.N., Young, R.M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K.-H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., et al. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470, 115–119. 10.1038/nature09671.

351. Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.-C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., et al. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 5, 1052–1060. 10.1038/ni1110.
352. Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., et al. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459, 717–721. 10.1038/nature07968.
353. Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., et al. (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459, 712–716. 10.1038/nature07969.
354. Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S.V., Aster, J.C., Murty, V.V., Shipp, M.A., and Dalla-Favera, R. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 203, 311–317. 10.1084/jem.20052204.
355. Sujobert, P., and Salles, G. (2019). [Follicular lymphoma: An update]. *Presse Med*. 10.1016/j.lpm.2019.07.024.
356. Le Guyader-Peyrou, S., Belot, A., Maynadié, M., Binder-Foucard, F., Remontet, L., Troussard, X., Bossard, N., Monnereau, A., and French network of cancer registries (Francim) (2016). Cancer incidence in France over the 1980-2012 period: Hematological malignancies. *Rev Epidemiol Sante Publique* 64, 103–112. 10.1016/j.respe.2015.12.017.
357. Agopian, J., Navarro, J.-M., Gac, A.-C., Lecluse, Y., Briand, M., Grenot, P., Gauduchon, P., Ruminy, P., Lebailly, P., Nadel, B., et al. (2009). Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J Exp Med* 206, 1473–1483. 10.1084/jem.20082842.
358. Meloni, F., Satta, G., Padoan, M., Montagna, A., Pilia, I., Argiolas, A., Piro, S., Magnani, C., Gambelunghe, A., Muzi, G., et al. (2021). Occupational exposure to glyphosate and risk of lymphoma: results of an Italian multicenter case-control study. *Environ Health* 20, 49. 10.1186/s12940-021-00729-8.
359. Roulland, S., Lebailly, P., Lecluse, Y., Briand, M., Pottier, D., and Gauduchon, P. (2004). Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res* 64, 2264–2269. 10.1158/0008-5472.can-03-3604.
360. Carbone, A., Roulland, S., Gloghini, A., Younes, A., von Keudell, G., López-Guillermo, A., and Fitzgibbon, J. (2019). Follicular lymphoma. *Nat Rev Dis Primers* 5, 83. 10.1038/s41572-019-0132-x.
361. Freedman, A., and Jacobsen, E. (2019). Follicular lymphoma: 2019 update on diagnosis and management. *Am. J. Hematol*. 10.1002/ajh.25696.
362. Gordon, M.J., Smith, M.R., and Nastoupil, L.J. (2022). Follicular lymphoma: The long and winding road leading to your cure? *Blood Reviews*, 100992. 10.1016/j.blre.2022.100992.
363. Freedman, A., and Jacobsen, E. (2020). Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management. *Am J Hematol* 95, 316–327. 10.1002/ajh.25696.
364. Solal-Céligny, P., Roy, P., Colombat, P., White, J., Armitage, J.O., Arranz-Saez, R., Au, W.Y., Bellei, M., Brice, P., Caballero, D., et al. (2004). Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 104, 1258–1265. 10.1182/blood-2003-12-4434.
365. Federico, M., Bellei, M., Marcheselli, L., Luminari, S., Lopez-Guillermo, A., Vitolo, U., Pro, B., Pileri, S., Pulsoni, A., Soubeyran, P., et al. (2009). Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol* 27, 4555–4562. 10.1200/JCO.2008.21.3991.
366. Bachy, E., Maurer, M.J., Habermann, T.M., Gelas-Dore, B., Maucort-Boulch, D., Estell, J.A., Van den Neste, E., Bouabdallah, R., Gyan, E., Feldman, A.L., et al. (2018). A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. *Blood* 132, 49–58. 10.1182/blood-2017-11-816405.
367. Bolen, C.R., Mattiello, F., Herold, M., Hiddemann, W., Huet, S., Klapper, W., Marcus, R., Mir, F., Salles, G., Weigert, O., et al. (2021). Treatment dependence of prognostic gene expression signatures in de novo follicular lymphoma. *Blood* 137, 2704–2707. 10.1182/blood.2020008119.
368. Pastore, A., Jurinovic, V., Kridel, R., Hoster, E., Staiger, A.M., Szczepanowski, M., Pott, C., Kopp, N., Murakami, M., Horn, H., et al. (2015). Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* 16, 1111–1122. 10.1016/S1470-2045(15)00169-2.
369. González-Rincón, J., Méndez, M., Gómez, S., García, J.F., Martín, P., Bellas, C., Pedrosa, L., Rodríguez-Pinilla, S.M., Camacho, F.I., Quero, C., et al. (2019). Unraveling transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS ONE* 14, e0212813. 10.1371/journal.pone.0212813.
370. Sarkozy, C., Trneny, M., Xerri, L., Wickham, N., Feugier, P., Leppa, S., Brice, P., Soubeyran, P., Gomes Da Silva, M., Mounier, C., et al. (2016). Risk Factors and Outcomes for Patients With Follicular Lymphoma Who Had Histologic Transformation After Response to First-Line Immunochemotherapy in the PRIMA Trial. *J Clin Oncol* 34, 2575–2582. 10.1200/JCO.2015.65.7163.

371. Sarkozy, C., Maurer, M.J., Link, B.K., Ghesquieres, H., Nicolas, E., Thompson, C.A., Traverse-Glehen, A., Feldman, A.L., Allmer, C., Slager, S.L., et al. (2018). Cause of Death in Follicular Lymphoma in the First Decade of the Rituximab Era: A Pooled Analysis of French and US Cohorts. *J. Clin. Oncol.*, JCO1800400. 10.1200/JCO.18.00400.
372. Hiddemann, W., Kneba, M., Dreyling, M., Schmitz, N., Lengfelder, E., Schmits, R., Reiser, M., Metzner, B., Harder, H., Hegewisch-Becker, S., et al. (2005). Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 106, 3725–3732. 10.1182/blood-2005-01-0016.
373. Marcus, R., Imrie, K., Belch, A., Cunningham, D., Flores, E., Catalano, J., Solal-Celigny, P., Offner, F., Walewski, J., Raposo, J., et al. (2005). CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 105, 1417–1423. 10.1182/blood-2004-08-3175.
374. Marcus, R., Davies, A., Ando, K., Klapper, W., Opat, S., Owen, C., Phillips, E., Sangha, R., Schlag, R., Seymour, J.F., et al. (2017). Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. *N Engl J Med* 377, 1331–1344. 10.1056/NEJMoa1614598.
375. Leonard, J.P., Trneny, M., Izutsu, K., Fowler, N.H., Hong, X., Zhu, J., Zhang, H., Offner, F., Scheliga, A., Nowakowski, G.S., et al. (2019). AUGMENT: A Phase III Study of Lenalidomide Plus Rituximab Versus Placebo Plus Rituximab in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 37, 1188–1199. 10.1200/JCO.19.00010.
376. Morschhauser, F., Fowler, N.H., Feugier, P., Bouabdallah, R., Tilly, H., Palomba, M.L., Fruchart, C., Libby, E.N., Casasnovas, R.-O., Flinn, I.W., et al. (2018). Rituximab plus Lenalidomide in Advanced Untreated Follicular Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 379, 934–947. 10.1056/NEJMoa1805104.
377. Morschhauser, F., Nastoupil, L., Feugier, P., Schiano de Colella, J.-M., Tilly, H., Palomba, M.L., Bachy, E., Fruchart, C., Libby, E.N., Casasnovas, R.-O., et al. (2022). Six-Year Results From RELEVANCE: Lenalidomide Plus Rituximab (R2) Versus Rituximab-Chemotherapy Followed by Rituximab Maintenance in Untreated Advanced Follicular Lymphoma. *J Clin Oncol*, JCO2200843. 10.1200/JCO.22.00843.
378. Strati, P., Jain, P., Johnson, R.J., Forbes, S., Feng, L., Samaniego, F., Rodriguez, M.A., Fayad, L.E., Hagemester, F., Westin, J., et al. (2021). Long-term follow-up of lenalidomide and rituximab as initial treatment of follicular lymphoma. *Blood* 137, 1124–1129. 10.1182/blood.2020007994.
379. Zucca, E., Rondeau, S., Vanazzi, A., Østenstad, B., Mey, U.J.M., Rauch, D., Wahlin, B.E., Hitz, F., Hernberg, M., Johansson, A.-S., et al. (2019). Short regimen of rituximab plus lenalidomide in follicular lymphoma patients in need of first-line therapy. *Blood* 134, 353–362. 10.1182/blood-2018-10-879643.
380. Martinelli, G., Schmitz, S.-F.H., Utiger, U., Cerny, T., Hess, U., Bassi, S., Okkinga, E., Stupp, R., Stahel, R., Heizmann, M., et al. (2010). Long-term follow-up of patients with follicular lymphoma receiving single-agent rituximab at two different schedules in trial SAKK 35/98. *J Clin Oncol* 28, 4480–4484. 10.1200/JCO.2010.28.4786.
381. Radford, J., Davies, A., Cartron, G., Morschhauser, F., Salles, G., Marcus, R., Wenger, M., Lei, G., Wassner-Fritsch, E., and Vitolo, U. (2013). Obinutuzumab (GA101) plus CHOP or FC in relapsed/refractory follicular lymphoma: results of the GAUDI study (BO21000). *Blood* 122, 1137–1143. 10.1182/blood-2013-01-481341.
382. Leonard, J.P., Jung, S.-H., Johnson, J., Pitcher, B.N., Bartlett, N.L., Blum, K.A., Czuczman, M., Giguere, J.K., and Cheson, B.D. (2015). Randomized Trial of Lenalidomide Alone Versus Lenalidomide Plus Rituximab in Patients With Recurrent Follicular Lymphoma: CALGB 50401 (Alliance). *J Clin Oncol* 33, 3635–3640. 10.1200/JCO.2014.59.9258.
383. Sureda, A., Zhang, M.-J., Dreger, P., Carreras, J., Fenske, T., Finel, H., Schouten, H., Montoto, S., Robinson, S., Smith, S.M., et al. (2018). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular lymphoma: A combined analysis on behalf of the Lymphoma Working Party of the EBMT and the Lymphoma Committee of the CIBMTR. *Cancer* 124, 1733–1742. 10.1002/cncr.31264.
384. Bartlett, N.L., Costello, B.A., LaPlant, B.R., Ansell, S.M., Kuruvilla, J.G., Reeder, C.B., Thye, L.S., Anderson, D.M., Krysiak, K., Ramirez, C., et al. (2018). Single-agent ibrutinib in relapsed or refractory follicular lymphoma: a phase 2 consortium trial. *Blood* 131, 182–190. 10.1182/blood-2017-09-804641.
385. Gopal, A.K., Schuster, S.J., Fowler, N.H., Trotman, J., Hess, G., Hou, J.-Z., Yacoub, A., Lill, M., Martin, P., Vitolo, U., et al. (2018). Ibrutinib as Treatment for Patients With Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma: Results From the Open-Label, Multicenter, Phase II DAWN Study. *J Clin Oncol* 36, 2405–2412. 10.1200/JCO.2017.76.8853.
386. Fowler, N.H., Nastoupil, L., De Vos, S., Knapp, M., Flinn, I.W., Chen, R., Advani, R.H., Bhatia, S., Martin, P., Mena, R., et al. (2020). The combination of ibrutinib and rituximab demonstrates activity in first-line follicular lymphoma. *Br J Haematol* 189, 650–660. 10.1111/bjh.16424.
387. Fowler, N.H., Coleman, M., Stevens, D.A., Smith, S.M., Venugopal, P., Martin, P., Phillips, T.J., Agajanian, R., Stephens, D.M., Izumi, R., et al. (2018). Acalabrutinib alone or in combination with rituximab (R) in follicular lymphoma (FL). *JCO* 36, 7549–7549. 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.7549.

388. Burris, H.A., Flinn, I.W., Patel, M.R., Fenske, T.S., Deng, C., Brander, D.M., Gutierrez, M., Essell, J.H., Kuhn, J.G., Miskin, H.P., et al. (2018). Umbralisib, a novel PI3K δ and casein kinase-1 ϵ inhibitor, in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia and lymphoma: an open-label, phase 1, dose-escalation, first-in-human study. *Lancet Oncol* 19, 486–496. 10.1016/S1470-2045(18)30082-2.
389. Dreyling, M., Santoro, A., Mollica, L., Leppä, S., Follows, G.A., Lenz, G., Kim, W.S., Nagler, A., Panayiotidis, P., Demeter, J., et al. (2017). Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Copanlisib in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *J Clin Oncol* 35, 3898–3905. 10.1200/JCO.2017.75.4648.
390. Dreyling, M., Santoro, A., Mollica, L., Leppä, S., Follows, G., Lenz, G., Kim, W.S., Nagler, A., Dimou, M., Demeter, J., et al. (2020). Long-term safety and efficacy of the PI3K inhibitor copanlisib in patients with relapsed or refractory indolent lymphoma: 2-year follow-up of the CHRONOS-1 study. *American Journal of Hematology* 95, 362–371. 10.1002/ajh.25711.
391. Flinn, I.W., Miller, C.B., Ardeschna, K.M., Tetreault, S., Assouline, S.E., Mayer, J., Merli, M., Lunin, S.D., Pettitt, A.R., Nagy, Z., et al. (2019). DYNAMO: A Phase II Study of Duvelisib (IPI-145) in Patients With Refractory Indolent Non-Hodgkin Lymphoma. *JCO* 37, 912–922. 10.1200/JCO.18.00915.
392. Fowler, N.H., Samaniego, F., Jurczak, W., Ghosh, N., Derenzini, E., Reeves, J.A., Knopińska-Postuszny, W., Cheah, C.Y., Phillips, T., Lech-Maranda, E., et al. (2021). Umbralisib, a Dual PI3K δ /CK1 ϵ Inhibitor in Patients With Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *JCO* 39, 1609–1618. 10.1200/JCO.20.03433.
393. Gopal, A.K., Kahl, B.S., de Vos, S., Wagner-Johnston, N.D., Schuster, S.J., Jurczak, W.J., Flinn, I.W., Flowers, C.R., Martin, P., Viardot, A., et al. (2014). PI3K δ inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med* 370, 1008–1018. 10.1056/NEJMoa1314583.
394. Morschhauser, F., Tilly, H., Chaidos, A., McKay, P., Phillips, T., Assouline, S., Batlevi, C.L., Campbell, P., Ribrag, V., Damaj, G.L., et al. (2020). Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 21, 1433–1442. 10.1016/S1470-2045(20)30441-1.
395. Zinzani, P.L., Flinn, I.W., Yuen, S.L.S., Topp, M.S., Rusconi, C., Fleury, I., Le Dû, K., Arthur, C., Pro, B., Gritti, G., et al. (2020). Venetoclax-rituximab with or without bendamustine vs bendamustine-rituximab in relapsed/refractory follicular lymphoma. *Blood* 136, 2628–2637. 10.1182/blood.2020005588.
396. Fowler, N.H., Dickinson, M., Dreyling, M., Martinez-Lopez, J., Kolstad, A., Butler, J., Ghosh, M., Popplewell, L., Chavez, J.C., Bachy, E., et al. (2022). Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial. *Nat Med* 28, 325–332. 10.1038/s41591-021-01622-0.
397. Hirayama, A.V., Gauthier, J., Hay, K.A., Voutsinas, J.M., Wu, Q., Pender, B.S., Hawkins, R.M., Vakil, A., Steinmetz, R.N., Riddell, S.R., et al. (2019). High rate of durable complete remission in follicular lymphoma after CD19 CAR-T cell immunotherapy. *Blood* 134, 636–640. 10.1182/blood.2019000905.
398. Jacobson, C.A., Chavez, J.C., Sehgal, A.R., William, B.M., Munoz, J., Salles, G.A., Casulo, C., Munshi, P.N., Maloney, D.G., De Vos, S., et al. (2020). Interim analysis of ZUMA-5: A phase II study of axicabtagene ciloleucel (axi-cel) in patients (pts) with relapsed/refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (R/R iNHL). *JCO* 38, 8008–8008. 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.8008.
399. Jacobson, C.A., Chavez, J.C., Sehgal, A.R., William, B.M., Munoz, J., Salles, G., Munshi, P.N., Casulo, C., Maloney, D.G., de Vos, S., et al. (2022). Axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 23, 91–103. 10.1016/S1470-2045(21)00591-X.
400. Salles, G.A., Schuster, S.J., Dreyling, M., Fischer, L., Kuruville, J., Patten, P.E., von Tresckow, B., Smith, S.M., Jiménez-Ubieto, A., Davis, K.L., et al. (2022). Efficacy comparison of tisagenlecleucel vs usual care in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma. *Blood Adv*, bloodadvances.2022008150. 10.1182/bloodadvances.2022008150.
401. Schuster, S.J., Svoboda, J., Chong, E.A., Nasta, S.D., Mato, A.R., Anak, Ö., Brogdon, J.L., Pruteanu-Malinici, I., Bhoj, V., Landsburg, D., et al. (2017). Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* 377, 2545–2554. 10.1056/NEJMoa1708566.
402. Budde, L.E., Sehn, L.H., Matasar, M.J., Schuster, S.J., Assouline, S., Giri, P., Kuruville, J., Canales, M., Dietrich, S., Fay, K., et al. (2021). Mosunetuzumab Monotherapy Is an Effective and Well-Tolerated Treatment Option for Patients with Relapsed/Refractory (R/R) Follicular Lymphoma (FL) Who Have Received ≥ 2 Prior Lines of Therapy: Pivotal Results from a Phase I/II Study. *Blood* 138, 127. 10.1182/blood-2021-145872.
403. Falchi, L., Leppä, S., Wahlin, B.E., Nijland, M., Christensen, J.H., De Vos, S., Holte, H., Linton, K.M., Abbas, A., Wang, L., et al. (2022). Subcutaneous epcoritamab with rituximab + lenalidomide (R2) in patients (pts) with relapsed or refractory (R/R) follicular lymphoma (FL): Update from phase 1/2 trial. *JCO* 40, 7524–7524. 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.7524.
404. Morschhauser, F., Carlo-Stella, C., Dickinson, M., Phillips, T., Houot, R., Offner, F., Haioun, C., Corradini, P., Hutchings, M., Sureda, A., et al. (2021). Glofitamab As Monotherapy and in Combination with Obinutuzumab Induces High Complete Response Rates in Patients (pts) with Multiple Relapsed or Refractory (R/R) Follicular Lymphoma (FL). *Blood* 138, 128. 10.1182/blood-2021-148778.

405. Morschhauser, F., Bishton, M., Eyre, T.A., Bachy, E., Cartron, G., Ysebaert, L., Bobillo, S., Gutierrez, N.C., Budde, L.E., Fox, C.P., et al. (2021). Mosunetuzumab in Combination with Lenalidomide Has a Manageable Safety Profile and Encouraging Activity in Patients with Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma: Initial Results from a Phase Ib Study. *Blood* *138*, 129. 10.1182/blood-2021-145694.
406. Küppers, R., and Stevenson, F.K. (2018). Critical influences on the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* *131*, 2297–2306. 10.1182/blood-2017-11-764365.
407. Roulland, S., Faroudi, M., Mamessier, E., Sungalee, S., Salles, G., and Nadel, B. (2011). Early Steps of Follicular Lymphoma Pathogenesis. In *Advances in Immunology*, F. W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 1–46.
408. Cleary, M.L., and Sklar, J. (1985). Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 7439–7443. 10.1073/pnas.82.21.7439.
409. Zinkel, S., Gross, A., and Yang, E. (2006). BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* *13*, 1351–1359. 10.1038/sj.cdd.4401987.
410. Roulland, S., Lebailly, P., Lecluse, Y., Heutte, N., Nadel, B., and Gauduchon, P. (2006). Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia* *20*, 158–162. 10.1038/sj.leu.2404035.
411. Schüler, F., Dölken, L., Hirt, C., Kiefer, T., Berg, T., Fusch, G., Weitmann, K., Hoffmann, W., Fusch, C., Janz, S., et al. (2009). Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J Cancer* *124*, 958–963. 10.1002/ijc.23958.
412. Sungalee, S., Mamessier, E., Morgado, E., Grégoire, E., Brohawn, P.Z., Morehouse, C.A., Jouve, N., Monvoisin, C., Menard, C., Debros, G., et al. (2014). Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. *The Journal of Clinical Investigation* *124*, 5337. 10.1172/JCI72415.
413. Choi, S.M., Betz, B.L., and Perry, A.M. (2018). Follicular Lymphoma Diagnostic Caveats and Updates. *Arch Pathol Lab Med* *142*, 1330–1340. 10.5858/arpa.2018-0217-RA.
414. Araf, S., Wang, J., Korfi, K., Pangault, C., Kotsiou, E., Rio-Machin, A., Rahim, T., Heward, J., Clear, A., Iqbal, S., et al. (2018). Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. *Leukemia*, 1. 10.1038/s41375-018-0043-y.
415. Bödör, C., Grossmann, V., Popov, N., Okosun, J., O’Riain, C., Tan, K., Marzec, J., Araf, S., Wang, J., Lee, A.M., et al. (2013). EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* *122*, 3165–3168. 10.1182/blood-2013-04-496893.
416. Krysiak, K., Gomez, F., White, B.S., Matlock, M., Miller, C.A., Trani, L., Fronick, C.C., Fulton, R.S., Kreisel, F., Cashen, A.F., et al. (2017). Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma. *Blood* *129*, 473–483. 10.1182/blood-2016-07-729954.
417. Mendez-Lago, M., Morin, R.D., Mungall, A.J., Chan, S., Chittaranjan, S., Severson, T., Goya, R., Mungall, K., Johnson, N.A., Boyle, M., et al. (2010). Mutations In MLL2 and MEF2B Genes In Follicular Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood* *116*, 473. 10.1182/blood.V116.21.473.473.
418. Okosun, J., Bödör, C., Wang, J., Araf, S., Yang, C.-Y., Pan, C., Boller, S., Cittaro, D., Bozek, M., Iqbal, S., et al. (2014). Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet* *46*, 176–181. 10.1038/ng.2856.
419. Zhang, J., Dominguez-Sola, D., Hussein, S., Lee, J.-E., Holmes, A.B., Bansal, M., Vlasevska, S., Mo, T., Tang, H., Basso, K., et al. (2015). Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med* *21*, 1190–1198. 10.1038/nm.3940.
420. Jiang, Y., Ortega-Molina, A., Geng, H., Ying, H.-Y., Hatzi, K., Parsa, S., McNally, D., Wang, L., Doane, A.S., Agirre, X., et al. (2017). CREBBP Inactivation Promotes the Development of HDAC3-Dependent Lymphomas. *Cancer Discov* *7*, 38–53. 10.1158/2159-8290.CD-16-0975.
421. Zhang, J., Vlasevska, S., Wells, V.A., Nataraj, S., Holmes, A.B., Duval, R., Meyer, S.N., Mo, T., Basso, K., Brindle, P.K., et al. (2017). The CREBBP Acetyltransferase Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in B-cell Lymphoma. *Cancer Discov* *7*, 322–337. 10.1158/2159-8290.CD-16-1417.
422. Li, H., Kaminski, M.S., Li, Y., Yildiz, M., Ouillette, P., Jones, S., Fox, H., Jacobi, K., Saiya-Cork, K., Bixby, D., et al. (2014). Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* *123*, 1487–1498. 10.1182/blood-2013-05-500264.
423. Green, M.R., Gentles, A.J., Nair, R.V., Irish, J.M., Kihira, S., Liu, C.L., Kela, I., Hopmans, E.S., Myklebust, J.H., Ji, H., et al. (2013). Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood* *121*, 1604–1611. 10.1182/blood-2012-09-457283.
424. Huet, S., Sujobert, P., and Salles, G. (2018). From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. *Nature Reviews Cancer*. 10.1038/nrc.2017.127.

425. Milpied, P., Cervera-Marzal, I., Mollichella, M.-L., Tesson, B., Brisou, G., Traverse-Glehen, A., Salles, G., Spinelli, L., and Nadel, B. (2018). Human germinal center transcriptional programs are de-synchronized in B cell lymphoma. *Nat Immunol* 19, 1013–1024. 10.1038/s41590-018-0181-4.
426. Milpied, P., Nadel, B., and Roulland, S. (2015). Premalignant cell dynamics in indolent B-cell malignancies. *Curr Opin Hematol* 22, 388–396. 10.1097/MOH.000000000000159.
427. Bahler, D.W., and Levy, R. (1992). Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6770–6774. 10.1073/pnas.89.15.6770.
428. Zuckerman, N.S., McCann, K.J., Ottensmeier, C.H., Barak, M., Shahaf, G., Edelman, H., Dunn-Walters, D., Abraham, R.S., Stevenson, F.K., and Mehr, R. (2010). Ig gene diversification and selection in follicular lymphoma, diffuse large B cell lymphoma and primary central nervous system lymphoma revealed by lineage tree and mutation analyses. *Int Immunol* 22, 875–887. 10.1093/intimm/dxq441.
429. Niemann, C.U., and Wiestner, A. (2013). B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin Cancer Biol* 23, 410–421. 10.1016/j.semcancer.2013.09.001.
430. Sachen, K.L., Strohmaier, M.J., Singletary, J., Alizadeh, A.A., Kattah, N.H., Lossos, C., Mellins, E.D., Levy, S., and Levy, R. (2012). Self-antigen recognition by follicular lymphoma B-cell receptors. *Blood* 120, 4182–4190. 10.1182/blood-2012-05-427534.
431. Zhu, D., McCarthy, H., Ottensmeier, C.H., Johnson, P., Hamblin, T.J., and Stevenson, F.K. (2002). Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood* 99, 2562–2568. 10.1182/blood.v99.7.2562.
432. Coelho, V., Krysov, S., Ghaemmaghami, A.M., Emara, M., Potter, K.N., Johnson, P., Packham, G., Martinez-Pomares, L., and Stevenson, F.K. (2010). Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18587–18592. 10.1073/pnas.1009388107.
433. Radcliffe, C.M., Arnold, J.N., Suter, D.M., Wormald, M.R., Harvey, D.J., Royle, L., Mimura, Y., Kimura, Y., Sim, R.B., Inogès, S., et al. (2007). Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor. *J Biol Chem* 282, 7405–7415. 10.1074/jbc.M602690200.
434. Amin, R., Mourcin, F., Uhel, F., Pangault, C., Ruminy, P., Dupré, L., Guirriec, M., Marchand, T., Fest, T., Lamy, T., et al. (2015). DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood* 126, 1911–1920. 10.1182/blood-2015-04-640912.
435. Linley, A., Krysov, S., Ponzoni, M., Johnson, P.W., Packham, G., and Stevenson, F.K. (2015). Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood* 126, 1902–1910. 10.1182/blood-2015-04-640805.
436. Odabashian, M., Carlotti, E., Araf, S., Okosun, J., Spada, F., Gribben, J.G., Forconi, F., Stevenson, F.K., Calaminici, M., and Krysov, S. (2020). IGHV sequencing reveals acquired N-glycosylation sites as a clonal and stable event during follicular lymphoma evolution. *Blood* 135, 834–844. 10.1182/blood.2019002279.
437. Ruminy, P., Jardin, F., Penther, D., Picquenot, J.-M., Parmentier, F., Buchonnet, G., Bertrand, P., Tilly, H., and Bastard, C. (2007). Recurrent disruption of the Imu splice donor site in t(14;18) positive lymphomas: a potential molecular basis for aberrant downstream class switch recombination. *Genes Chromosomes Cancer* 46, 735–744. 10.1002/gcc.20453.
438. Vaandrager, J.W., Schuurin, E., Kluijn-Nelemans, H.C., Dyer, M.J., Raap, A.K., and Kluijn, P.M. (1998). DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. *Blood* 92, 2871–2878.
439. Jardin, F., and Sahota, S.S. (2005). Targeted somatic mutation of the BCL6 proto-oncogene and its impact on lymphomagenesis. *Hematology* 10, 115–129. 10.1080/10245330400026105.
440. Verdière, L., Mourcin, F., and Tarte, K. (2018). Microenvironment signaling driving lymphomagenesis: Current Opinion in Hematology 25, 335–345. 10.1097/MOH.0000000000000440.
441. Béguelin, W., Teater, M., Meydan, C., Hoehn, K.B., Phillip, J.M., Soshnev, A.A., Venturutti, L., Rivas, M.A., Calvo-Fernández, M.T., Gutierrez, J., et al. (2020). Mutant EZH2 Induces a Pre-malignant Lymphoma Niche by Reprogramming the Immune Response. *Cancer Cell* 37, 655–673.e11. 10.1016/j.ccell.2020.04.004.
442. Cheung, K.-J.J., Johnson, N.A., Affleck, J.G., Severson, T., Steidl, C., Ben-Neriah, S., Schein, J., Morin, R.D., Moore, R., Shah, S.P., et al. (2010). Acquired TNFRSF14 mutations in follicular lymphoma are associated with worse prognosis. *Cancer Res* 70, 9166–9174. 10.1158/0008-5472.CAN-10-2460.
443. Amé-Thomas, P., and Tarte, K. (2014). The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: Role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Seminars in Cancer Biology* 24, 23–32. 10.1016/j.semcancer.2013.08.001.

444. Dave, S.S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Rimsza, L.M., Grogan, T.M., et al. (2004). Prediction of Survival in Follicular Lymphoma Based on Molecular Features of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *New England Journal of Medicine* *351*, 2159–2169. 10.1056/NEJMoa041869.
445. Nicholas, N.S., Apollonio, B., and Ramsay, A.G. (2016). Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* *1863*, 471–482. 10.1016/j.bbamcr.2015.11.003.
446. Canioni, D., Salles, G., Mounier, N., Brousse, N., Keuppens, M., Morchhauser, F., Lamy, T., Sonet, A., Rousselet, M.-C., Foussard, C., et al. (2008). High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. *J. Clin. Oncol.* *26*, 440–446. 10.1200/JCO.2007.12.8298.
447. Farinha, P., Masoudi, H., Skinnider, B.F., Shumansky, K., Spinelli, J.J., Gill, K., Klasa, R., Voss, N., Connors, J.M., and Gascoyne, R.D. (2005). Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* *106*, 2169–2174. 10.1182/blood-2005-04-1565.
448. Kridel, R., Xerri, L., Gelas-Dore, B., Tan, K., Feugier, P., Vawda, A., Canioni, D., Farinha, P., Boussetta, S., Moccia, A.A., et al. (2015). The Prognostic Impact of CD163-Positive Macrophages in Follicular Lymphoma: A Study from the BC Cancer Agency and the Lymphoma Study Association. *Clin. Cancer Res.* *21*, 3428–3435. 10.1158/1078-0432.CCR-14-3253.
449. Steidl, C., Lee, T., Shah, S.P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S.J., Iqbal, J., Weisenburger, D.D., et al. (2010). Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *362*, 875–885. 10.1056/NEJMoa0905680.
450. Stevens, W.B.C., Mendeville, M., Redd, R., Clear, A.J., Bladergroen, R., Calaminici, M., Rosenwald, A., Hoster, E., Hiddemann, W., Gaulard, P., et al. (2017). Prognostic relevance of CD163 and CD8 combined with EZH2 and gain of chromosome 18 in follicular lymphoma: a study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Haematologica* *102*, 1413–1423. 10.3324/haematol.2017.165415.
451. Taskinen, M., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Nyman, H., Eerola, L.-M., and Leppä, S. (2007). A High Tumor-Associated Macrophage Content Predicts Favorable Outcome in Follicular Lymphoma Patients Treated with Rituximab and Cyclophosphamide-Doxorubicin-Vincristine-Prednisone. *Clin. Cancer Res.* *13*, 5784–5789. 10.1158/1078-0432.CCR-07-0778.
452. Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* *12*, 252–264. 10.1038/nrc3239.
453. Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science* *348*, 56–61. 10.1126/science.aaa8172.
454. Ansell, S.M., Lesokhin, A.M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E.C., Gutierrez, M., Schuster, S.J., Millenson, M.M., Cattray, D., Freeman, G.J., et al. (2015). PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* *372*, 311–319. 10.1056/NEJMoa1411087.
455. Chen, R., Zinzani, P.L., Fanale, M.A., Armand, P., Johnson, N.A., Brice, P., Radford, J., Ribrag, V., Molin, D., Vassilakopoulos, T.P., et al. (2017). Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* *35*, 2125–2132. 10.1200/JCO.2016.72.1316.
456. Younes, A., Santoro, A., Shipp, M., Zinzani, P.L., Timmerman, J.M., Ansell, S., Armand, P., Fanale, M., Ratanatharathorn, V., Kuruvilla, J., et al. (2016). Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol* *17*, 1283–1294. 10.1016/S1470-2045(16)30167-X.
457. Zinzani, P.L., Ribrag, V., Moskowitz, C.H., Michot, J.-M., Kuruvilla, J., Balakumaran, A., Zhang, Y., Chlosta, S., Shipp, M.A., and Armand, P. (2017). Safety and tolerability of pembrolizumab in patients with relapsed/refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* *130*, 267–270. 10.1182/blood-2016-12-758383.
458. Casulo, C., Santoro, A., Cartron, G., Ando, K., Munoz, J., Le Gouill, S., Izutsu, K., Rule, S., Lugtenburg, P., Ruan, J., et al. (2022). Durvalumab as monotherapy and in combination therapy in patients with lymphoma or chronic lymphocytic leukemia: The FUSION NHL 001 trial. *Cancer Rep (Hoboken)*, e1662. 10.1002/cnr2.1662.
459. Lesokhin, A.M., Ansell, S.M., Armand, P., Scott, E.C., Halwani, A., Gutierrez, M., Millenson, M.M., Cohen, A.D., Schuster, S.J., Lebovic, D., et al. (2016). Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J Clin Oncol* *34*, 2698–2704. 10.1200/JCO.2015.65.9789.
460. Wellenstein, M.D., and de Visser, K.E. (2018). Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity* *48*, 399–416. 10.1016/j.immuni.2018.03.004.
461. Green, M.R., Monti, S., Rodig, S.J., Juszczynski, P., Currie, T., O'Donnell, E., Chapuy, B., Takeyama, K., Neuberg, D., Golub, T.R., et al. (2010). Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* *116*, 3268–3277. 10.1182/blood-2010-05-282780.

462. Roemer, M.G.M., Advani, R.H., Ligon, A.H., Natkunam, Y., Redd, R.A., Homer, H., Connelly, C.F., Sun, H.H., Daadi, S.E., Freeman, G.J., et al. (2016). PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol* 34, 2690–2697. 10.1200/JCO.2016.66.4482.
463. Kline, J., Godfrey, J., and Ansell, S.M. (2020). The immune landscape and response to immune checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Blood* 135, 523–533. 10.1182/blood.2019000847.
464. Hammerich, L., Marron, T.U., Upadhyay, R., Svensson-Arvelund, J., Dhainaut, M., Hussein, S., Zhan, Y., Ostrowski, D., Yellin, M., Marsh, H., et al. (2019). Systemic clinical tumor regressions and potentiation of PD1 blockade with in situ vaccination. *Nat Med* 25, 814–824. 10.1038/s41591-019-0410-x.
465. Kotlov, N., Bagaev, A., Revuelta, M.V., Phillip, J.M., Cacciapuoti, M.T., Antysheva, Z., Svekolkin, V., Tikhonova, E., Mihecheva, N., Kuzkina, N., et al. (2021). Clinical and Biological Subtypes of B-cell Lymphoma Revealed by Microenvironmental Signatures. *Cancer Discov* 11, 1468–1489. 10.1158/2159-8290.CD-20-0839.
466. Ennishi, D., Takata, K., Béguelin, W., Duns, G., Mottok, A., Farinha, P., Bashashati, A., Saberi, S., Boyle, M., Meissner, B., et al. (2019). Molecular and Genetic Characterization of MHC Deficiency Identifies EZH2 as Therapeutic Target for Enhancing Immune Recognition. *Cancer Discov* 9, 546–563. 10.1158/2159-8290.CD-18-1090.
467. Feuerhake, F., Kutok, J.L., Monti, S., Chen, W., LaCasce, A.S., Cattoretti, G., Kurtin, P., Pinkus, G.S., de Leval, L., Harris, N.L., et al. (2005). NFκB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 106, 1392–1399. 10.1182/blood-2004-12-4901.
468. Monti, S., Savage, K.J., Kutok, J.L., Feuerhake, F., Kurtin, P., Mihm, M., Wu, B., Pasqualucci, L., Neuberger, D., Aguiar, R.C.T., et al. (2005). Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 105, 1851–1861. 10.1182/blood-2004-07-2947.
469. Huang, Y.-H., Cai, K., Xu, P.-P., Wang, L., Huang, C.-X., Fang, Y., Cheng, S., Sun, X.-J., Liu, F., Huang, J.-Y., et al. (2021). CREBBP/EP300 mutations promoted tumor progression in diffuse large B-cell lymphoma through altering tumor-associated macrophage polarization via FBXW7-NOTCH-CCL2/CSF1 axis. *Signal Transduct Target Ther* 6, 10. 10.1038/s41392-020-00437-8.
470. Apollonio, B., Ioannou, N., Papazoglou, D., and Ramsay, A.G. (2021). Understanding the Immune-Stroma Microenvironment in B Cell Malignancies for Effective Immunotherapy. *Frontiers in Oncology* 11.
471. Serganova, I., Chakraborty, S., Yamshon, S., Isshiki, Y., Bucktrout, R., Melnick, A., Béguelin, W., and Zappasodi, R. (2022). Epigenetic, Metabolic, and Immune Crosstalk in Germinal-Center-Derived B-Cell Lymphomas: Unveiling New Vulnerabilities for Rational Combination Therapies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9.
472. Chang, K.-C., Huang, G.-C., Jones, D., and Lin, Y.-H. (2007). Distribution patterns of dendritic cells and T cells in diffuse large B-cell lymphomas correlate with prognoses. *Clin. Cancer Res.* 13, 6666–6672. 10.1158/1078-0432.CCR-07-0504.
473. Ahearne, M.J., Bhuller, K., Hew, R., Ibrahim, H., Naresh, K., and Wagner, S.D. (2014). Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Virchows Arch* 465, 351–358. 10.1007/s00428-014-1615-5.
474. Coutinho, R., Clear, A.J., Mazzola, E., Owen, A., Greaves, P., Wilson, A., Matthews, J., Lee, A., Alvarez, R., Silva, M.G. da, et al. (2015). Revisiting the immune microenvironment of diffuse large B-cell lymphoma using a tissue microarray and immunohistochemistry: robust semi-automated analysis reveals CD3 and FoxP3 as potential predictors of response to R-CHOP. *1 100*, 363–369. 10.3324/haematol.2014.110189.
475. Fang, X., Xiu, B., Yang, Z., Qiu, W., Zhang, L., Zhang, S., Wu, Y., Zhu, X., Chen, X., Xie, S., et al. (2017). The expression and clinical relevance of PD-1, PD-L1, and TP63 in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Medicine (Baltimore)* 96, e6398. 10.1097/MD.0000000000006398.
476. Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S.A., and Dirnhofer, S. (2008). Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *1 93*, 193–200. 10.3324/haematol.11702.
477. Autio, M., Leivonen, S.-K., Brück, O., Mustjoki, S., Mészáros Jørgensen, J., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Beiske, K., Holte, H., Pellinen, T., and Leppä, S. (2021). Immune cell constitution in the tumor microenvironment predicts the outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 106, 718–729. 10.3324/haematol.2019.243626.
478. Roussel, M., Le, K.-S., Granier, C., Llamas Gutierrez, F., Foucher, E., Le Gallou, S., Pangault, C., Xerri, L., Launay, V., Lamy, T., et al. (2021). Functional characterization of PD1+TIM3+ tumor-infiltrating T cells in DLBCL and effects of PD1 or TIM3 blockade. *Blood Adv* 5, 1816–1829. 10.1182/bloodadvances.2020003080.
479. Keane, C., Law, S.C., Gould, C., Birch, S., Sabdia, M.B., Merida de Long, L., Thillaiampalam, G., Abro, E., Tobin, J.W., Tan, X., et al. (2020). LAG3: a novel immune checkpoint expressed by multiple lymphocyte subsets in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 4, 1367–1377. 10.1182/bloodadvances.2019001390.
480. Josefsson, S.E., Beiske, K., Blaker, Y.N., Førsund, M.S., Holte, H., Østenstad, B., Kimby, E., Köksal, H., Wälchli, S., Bai, B., et al. (2019). TIGIT and PD-1 Mark Intratumoral T Cells with Reduced Effector Function in B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Immunol Res* 7, 355–362. 10.1158/2326-6066.CIR-18-0351.

481. Mintz, M.A., Felce, J.H., Chou, M.Y., Mayya, V., Xu, Y., Shui, J.-W., An, J., Li, Z., Marson, A., Okada, T., et al. (2019). The HVEM-BTLA Axis Restrains T Cell Help to Germinal Center B Cells and Functions as a Cell-Extrinsic Suppressor in Lymphomagenesis. *Immunity* 51, 310-323.e7. 10.1016/j.immuni.2019.05.022.
482. Mittal, S., Marshall, N.A., Duncan, L., Culligan, D.J., Barker, R.N., and Vickers, M.A. (2008). Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 111, 5359-5370. 10.1182/blood-2007-08-105395.
483. McCord, R., Bolen, C.R., Koeppen, H., Kadel, E.E., Oestergaard, M.Z., Nielsen, T., Sehn, L.H., and Venstrom, J.M. (2019). PD-L1 and tumor-associated macrophages in de novo DLBCL. *Blood Adv* 3, 531-540. 10.1182/bloodadvances.2018020602.
484. Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Tang, C., Myklebust, J.H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A.C., Chan, C.K., Tan, B.T., et al. (2010). Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 142, 699-713. 10.1016/j.cell.2010.07.044.
485. Shen, L., Li, H., Shi, Y., Wang, D., Gong, J., Xun, J., Zhou, S., Xiang, R., and Tan, X. (2016). M2 tumour-associated macrophages contribute to tumour progression via legumain remodelling the extracellular matrix in diffuse large B cell lymphoma. *Sci Rep* 6, 30347. 10.1038/srep30347.
486. Serafini, P., Mgebrouff, S., Noonan, K., and Borrello, I. (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res.* 68, 5439-5449. 10.1158/0008-5472.CAN-07-6621.
487. Grégoire, M., Guilloton, F., Pangault, C., Mourcin, F., Sok, P., Latour, M., Amé-Thomas, P., Flecher, E., Fest, T., Tarte, K., et al. (2015). Neutrophils trigger a NF- κ B dependent polarization of tumor-supportive stromal cells in germinal center B-cell lymphomas. *Oncotarget* 6, 16471-16487. 10.18632/oncotarget.4106.
488. Manfroi, B., McKee, T., Mayol, J.F., Tabruyn, S., Moret, S., Villiers, C., Righini, C., Dyer, M., Callanan, M., Schneider, P., et al. (2017). CXCL-8/IL8 Produced by Diffuse Large B-cell Lymphomas Recruits Neutrophils Expressing a Proliferation-Inducing Ligand APRIL. *Cancer Res* 77, 1097-1107. 10.1158/0008-5472.CAN-16-0786.
489. Lee, M.J., Park, S.Y., Ko, J.H., Lee, H.J., Ryu, J.S., Park, J.W., Khwarg, S.I., Yoon, S.O., and Oh, J.Y. (2017). Mesenchymal stromal cells promote B-cell lymphoma in lacrimal glands by inducing immunosuppressive microenvironment. *Oncotarget* 8, 66281-66292. 10.18632/oncotarget.19971.
490. Dierks, C., Grbic, J., Zirlik, K., Beigi, R., Englund, N.P., Guo, G.-R., Veelken, H., Engelhardt, M., Mertelsmann, R., Kelleher, J.F., et al. (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med* 13, 944-951. 10.1038/nm1614.
491. Kim, J.E., Singh, R.R., Cho-Vega, J.H., Drakos, E., Davuluri, Y., Khokhar, F.A., Fayad, L., Medeiros, L.J., and Vega, F. (2009). Sonic hedgehog signaling proteins and ATP-binding cassette G2 are aberrantly expressed in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 22, 1312-1320. 10.1038/modpathol.2009.98.
492. Rehm, A., Mensen, A., Schradi, K., Gerlach, K., Wittstock, S., Winter, S., Büchner, G., Dörken, B., Lipp, M., and Höpken, U.E. (2011). Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs. *Blood* 118, 1020-1033. 10.1182/blood-2010-11-321265.
493. Singh, R.R., Kim, J.E., Davuluri, Y., Drakos, E., Cho-Vega, J.H., Amin, H.M., and Vega, F. (2010). Hedgehog signaling pathway is activated in diffuse large B-cell lymphoma and contributes to tumor cell survival and proliferation. *Leukemia* 24, 1025-1036. 10.1038/leu.2010.35.
494. Apollonio, B., Jarvis, P., Phillips, B., Kuhn, A., Salisbury, J., Zacharioudakis, G., Sutton, L.-A., Rosenquist, R., Jarrett, R., Amini, R.-M., et al. (2018). Diffuse Large B-Cell Lymphoma Remodels the Fibroblastic Reticular Network That Acquires Aberrant Immunosuppressive Capabilities; Implications for the Regulation of Anti-Tumor Immunity in the Immuno-Oncology Era. *Blood* 132, 675. 10.1182/blood-2018-99-116409.
495. Chlenski, A., and Cohn, S.L. (2010). Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Semin Cell Dev Biol* 21, 55-65. 10.1016/j.semcdb.2009.11.018.
496. Sangaletti, S., Tripodo, C., Portararo, P., Dugo, M., Vitali, C., Botti, L., Guarnotta, C., Cappetti, B., Gulino, A., Torselli, I., et al. (2014). Stromal niche communalities underscore the contribution of the matricellular protein SPARC to B-cell development and lymphoid malignancies. *Oncoimmunology* 3, e28989. 10.4161/onci.28989.
497. Shevde, L.A., and Samant, R.S. (2014). Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol* 37, 131-141. 10.1016/j.matbio.2014.03.001.
498. Kossakowska, A.E., Urbanski, S.J., and Janowska-Wieczorek, A. (2000). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors - expression, role and regulation in human malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 39, 485-493. 10.3109/10428190009113379.
499. Malaponte, G., Hafsi, S., Polesel, J., Castellano, G., Spessotto, P., Guarneri, C., Canevari, S., Signorelli, S.S., McCubrey, J.A., and Libra, M. (2016). Tumor microenvironment in diffuse large B-cell lymphoma: Matrixmetalloproteinases activation is mediated by osteopontin overexpression. *Biochim Biophys Acta* 1863, 483-489. 10.1016/j.bbamcr.2015.09.018.

500. Cacciatore, M., Guarnotta, C., Calvaruso, M., Sangaletti, S., Florena, A.M., Franco, V., Colombo, M.P., and Tripodo, C. (2012). Microenvironment-Centred Dynamics in Aggressive B-Cell Lymphomas. *Advances in Hematology* 2012, e138079. 10.1155/2012/138079.
501. Choi, J.-W., An, J.-S., Lee, J.-H., Lee, E.-S., Kim, K.H., and Kim, Y.-S. (2006). Clinicopathologic implications of tissue inhibitor of metalloproteinase-1-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 19, 963–973. 10.1038/modpathol.3800615.
502. Weissmann, M., Arvatz, G., Horowitz, N., Feld, S., Naroditsky, I., Zhang, Y., Ng, M., Hammond, E., Nevo, E., Vlodavsky, I., et al. (2016). Heparanase-neutralizing antibodies attenuate lymphoma tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 704–709. 10.1073/pnas.1519453113.
503. Passalidou, E., Stewart, M., Trivella, M., Steers, G., Pillai, G., Dogan, A., Leigh, I., Hatton, C., Harris, A., Gatter, K., et al. (2003). Vascular patterns in reactive lymphoid tissue and in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 88, 553–559. 10.1038/sj.bjc.6600742.
504. Ruan, J., Hyjek, E., Kermani, P., Christos, P.J., Hooper, A.T., Coleman, M., Hempstead, B., Leonard, J.P., Chadburn, A., and Rafii, S. (2006). Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 12, 5622–5631. 10.1158/1078-0432.CCR-06-1204.
505. Menzel, L., Zschummel, M., Crowley, T., Franke, V., Grau, M., Ulbricht, C., Hauser, A., Siffrin, V., Bajénoff, M., Acton, S.E., et al. (2021). Lymphocyte access to lymphoma is impaired by high endothelial venule regression. *Cell Rep* 37, 109878. 10.1016/j.celrep.2021.109878.
506. Gloger, M., Menzel, L., Grau, M., Vion, A.-C., Anagnostopoulos, I., Zapukhlyak, M., Gerlach, K., Kammertöns, T., Hehlhans, T., Zschummel, M., et al. (2020). Lymphoma Angiogenesis Is Orchestrated by Noncanonical Signaling Pathways. *Cancer Res* 80, 1316–1329. 10.1158/0008-5472.CAN-19-1493.
507. Pangarsa, E.A., Wuryantoro, P., Naibaho, R.M., Setiawan, B., Santosa, D., Istiadi, H., Puspasari, D., and Suharti, C. (2022). Preliminary study of hypoxia markers in diffuse large B-cell lymphoma. *Mol Clin Oncol* 17, 140. 10.3892/mco.2022.2573.
508. Yang, J., Li, W., He, X., Zhang, G., Yue, L., and Chai, Y. (2015). VEGF overexpression is a valuable prognostic factor for non-Hodgkin's lymphoma evidence from a systemic meta-analysis. *Dis Markers* 2015, 786790. 10.1155/2015/786790.
509. Ethiraj, P., Sasi, B., Holder, K.N., Lin, A.-P., Qiu, Z., Jaafar, C., Elkhaili, A., Desai, P., Saksena, A., Ritter, J.P., et al. Cyclic-AMP signalling, MYC and hypoxia-inducible factor 1 α intersect to regulate angiogenesis in B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology* n/a. 10.1111/bjh.18196.
510. Huang, X., Bai, X., Cao, Y., Wu, J., Huang, M., Tang, D., Tao, S., Zhu, T., Liu, Y., Yang, Y., et al. (2010). Lymphoma endothelium preferentially expresses Tim-3 and facilitates the progression of lymphoma by mediating immune evasion. *J Exp Med* 207, 505–520. 10.1084/jem.20090397.
511. Colombo, A.R., Hav, M., Singh, M., Xu, A., Gamboa, A., Lemos, T., Gerdtsen, E., Chen, D., Houldsworth, J., Shaknovich, R., et al. (2022). Single-cell spatial analysis of tumor immune architecture in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Advances* 6, 4675–4690. 10.1182/bloodadvances.2022007493.
512. Alvaro, T., Lejeune, M., Salvadó, M.-T., Lopez, C., Jaén, J., Bosch, R., and Pons, L.E. (2006). Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 24, 5350–5357. 10.1200/JCO.2006.06.4766.
513. Laurent, C., Müller, S., Do, C., Al-Saati, T., Allart, S., Larocca, L.M., Hohaus, S., Duchez, S., Quillet-Mary, A., Laurent, G., et al. (2011). Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. *Blood* 118, 5371–5379. 10.1182/blood-2011-04-345777.
514. Lamaison, C., and Tarte, K. (2019). Impact of B cell/lymphoid stromal cell crosstalk in B-cell physiology and malignancy. *Immunol. Lett.* 10.1016/j.imlet.2019.02.005.
515. Lamaison, C., and Tarte, K. (2021). B cell/stromal cell crosstalk in health, disease, and treatment: Follicular lymphoma as a paradigm. *Immunol Rev.* 10.1111/imr.12983.
516. Guilloton, F., Caron, G., Ménard, C., Pangault, C., Amé-Thomas, P., Dulong, J., Vos, J.D., Rossille, D., Henry, C., Lamy, T., et al. (2012). Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood* 119, 2556–2567. 10.1182/blood-2011-08-370908.
517. Pandey, S., Mourcin, F., Marchand, T., Nayar, S., Guirriec, M., Pangault, C., Monvoisin, C., Amé-Thomas, P., Guilloton, F., Dulong, J., et al. (2017). IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood* 129, 2507–2518. 10.1182/blood-2016-08-737239.
518. Rajnai, H., Bödör, C., Balogh, Z., Gagy, E., Csomor, J., Krenács, T., Tóth, E., and Matolcsy, A. (2012). Impact of the reactive microenvironment on the bone marrow involvement of follicular lymphoma. *Histopathology* 60, E66–75. 10.1111/j.1365-2559.2012.04187.x.

519. Vega, F., Medeiros, L.J., Lang, W.-H., Mansoor, A., Bueso-Ramos, C., and Jones, D. (2002). The stromal composition of malignant lymphoid aggregates in bone marrow: variations in architecture and phenotype in different B-cell tumours. *Br J Haematol* *117*, 569–576. 10.1046/j.1365-2141.2002.03497.x.
520. Abe, Y., Sakata-Yanagimoto, M., Fujisawa, M., Miyoshi, H., Suehara, Y., Hattori, K., Kusakabe, M., Sakamoto, T., Nishikii, H., Nguyen, T.B., et al. (2022). A single-cell atlas of non-haematopoietic cells in human lymph nodes and lymphoma reveals a landscape of stromal remodelling. *Nat Cell Biol* *24*, 565–578. 10.1038/s41556-022-00866-3.
521. Mourcin, F., Verdière, L., Roulois, D., Amin, R., Lamaison, C., Sibut, V., Thamphya, B., Pangault, C., Monvoisin, C., Huet, S., et al. (2021). Follicular lymphoma triggers phenotypic and functional remodeling of the human lymphoid stromal cell landscape. *Immunity*, S1074761321002259. 10.1016/j.immuni.2021.05.019.
522. Gallouet, A.-S., Travert, M., Bresson-Bepoldin, L., Guilloton, F., Pangault, C., Caulet-Maugendre, S., Lamy, T., Tarte, K., and Guillaudeux, T. (2014). COX-2–Independent Effects of Celecoxib Sensitize Lymphoma B Cells to TRAIL-Mediated Apoptosis. *Clin Cancer Res* *20*, 2663–2673. 10.1158/1078-0432.CCR-13-2305.
523. Mraz, M., Zent, C.S., Church, A.K., Jelinek, D.F., Wu, X., Pospisilova, S., Ansell, S.M., Novak, A.J., Kay, N.E., Witzig, T.E., et al. (2011). Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol* *155*, 53–64. 10.1111/j.1365-2141.2011.08794.x.
524. Munoz, O., Fend, F., de Beaumont, R., Husson, H., Astier, A., and Freedman, A.S. (2004). TGFbeta-mediated activation of Smad1 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma and effect on cell proliferation. *Leukemia* *18*, 2015–2025. 10.1038/sj.leu.2403485.
525. Yagi, K., Yamamoto, K., Umeda, S., Abe, S., Suzuki, S., Onishi, I., Kirimura, S., Fukayama, M., Arai, A., Kitagawa, M., et al. (2013). Expression of multidrug resistance 1 gene in B-cell lymphomas: association with follicular dendritic cells. *Histopathology* *62*, 414–420. 10.1111/his.12035.
526. Brady, M.T., Hilchey, S.P., Hyrien, O., Spence, S.A., and Bernstein, S.H. (2014). Mesenchymal stromal cells support the viability and differentiation of follicular lymphoma-infiltrating follicular helper T-cells. *PLoS One* *9*, e97597. 10.1371/journal.pone.0097597.
527. Lukacs-Kornek, V., Malhotra, D., Fletcher, A.L., Acton, S.E., Elpek, K.G., Tayalia, P., Collier, A., and Turley, S.J. (2011). Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol* *12*, 1096–1104. 10.1038/ni.2112.
528. Maby-El Hajjami, H., Amé-Thomas, P., Pangault, C., Tribut, O., DeVos, J., Jean, R., Bescher, N., Monvoisin, C., Dulong, J., Lamy, T., et al. (2009). Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res.* *69*, 3228–3237. 10.1158/0008-5472.CAN-08-3000.
529. Travert, M., Ame-Thomas, P., Pangault, C., Morizot, A., Micheau, O., Semana, G., Lamy, T., Fest, T., Tarte, K., and Guillaudeux, T. (2008). CD40 Ligand Protects from TRAIL-Induced Apoptosis in Follicular Lymphomas through NF- κ B Activation and Up-Regulation of c-FLIP and Bcl-xL. *J Immunol* *181*, 1001–1011. 10.4049/jimmunol.181.2.1001.
530. Amé-Thomas, P., Hajjami, H.M.-E., Monvoisin, C., Jean, R., Monnier, D., Caulet-Maugendre, S., Guillaudeux, T., Lamy, T., Fest, T., and Tarte, K. (2007). Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* *109*, 693–702. 10.1182/blood-2006-05-020800.
531. Pangault, C., Amé-Thomas, P., Rossille, D., Dulong, J., Caron, G., Nonn, C., Chatonnet, F., Desmots, F., Launay, V., Lamy, T., et al. (2020). Integrative Analysis of Cell Crosstalk within Follicular Lymphoma Cell Niche: Towards a Definition of the FL Supportive Synapse. *Cancers (Basel)* *12*. 10.3390/cancers12102865.
532. Warzocha, K., Ribeiro, P., Renard, N., Bienvenu, J., Charlot, C., Coiffier, B., and Salles, G. (2000). Expression of genes coding for the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system in non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Immunol Immunother* *49*, 469–475. 10.1007/s002620000127.
533. Amé-Thomas, P., Le Priol, J., Yssel, H., Caron, G., Pangault, C., Jean, R., Martin, N., Marafioti, T., Gaulard, P., Lamy, T., et al. (2012). Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. *Leukemia* *26*, 1053–1063. 10.1038/leu.2011.301.
534. Dumontet, E., Pangault, C., Roulois, D., Desoteux, M., Léonard, S., Marchand, T., LaTour, M., Legoix, P., Loew, D., Dingli, F., et al. (2021). Extracellular vesicles shed by follicular lymphoma B cells promote the polarization of bone marrow stromal cell niche. *Blood*, blood.2020008791. 10.1182/blood.2020008791.
535. Chang, K.-C., Huang, X., Medeiros, L.J., and Jones, D. (2003). Germinal centre-like versus undifferentiated stromal immunophenotypes in follicular lymphoma. *J Pathol* *201*, 404–412. 10.1002/path.1478.
536. Pepe, G., Di Napoli, A., Cippitelli, C., Scarpino, S., Pillozzi, E., and Ruco, L. (2018). Reduced lymphotoxin-beta production by tumour cells is associated with loss of follicular dendritic cell phenotype and diffuse growth in follicular lymphoma. *J Pathol Clin Res* *4*, 124–134. 10.1002/cjp2.97.

537. Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., et al. (2018). Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* 33, 463-479. [10.1016/j.ccell.2018.01.011](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011).
538. Kiaii, S., Clear, A.J., Ramsay, A.G., Davies, D., Sangaralingam, A., Lee, A., Calaminici, M., Neuberg, D.S., and Gribben, J.G. (2013). Follicular lymphoma cells induce changes in T-cell gene expression and function: potential impact on survival and risk of transformation. *J Clin Oncol* 31, 2654-2661. [10.1200/JCO.2012.44.2137](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.2137).
539. Ramsay, A.G., Clear, A.J., Kelly, G., Fatah, R., Matthews, J., Macdougall, F., Lister, T.A., Lee, A.M., Calaminici, M., and Gribben, J.G. (2009). Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood* 114, 4713-4720. [10.1182/blood-2009-04-217687](https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-217687).
540. Josefsson, S.E., Huse, K., Kolstad, A., Beiske, K., Pende, D., Steen, C.B., Inderberg, E.M., Lingjærde, O.C., Østenstad, B., Smeland, E.B., et al. (2018). T Cells Expressing Checkpoint Receptor TIGIT Are Enriched in Follicular Lymphoma Tumors and Characterized by Reversible Suppression of T-cell Receptor Signaling. *Clin Cancer Res* 24, 870-881. [10.1158/1078-0432.CCR-17-2337](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2337).
541. Yang, Z.-Z., Grote, D.M., Ziesmer, S.C., Niki, T., Hirashima, M., Novak, A.J., Witzig, T.E., and Ansell, S.M. (2012). IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* 122, 1271-1282. [10.1172/JCI59806](https://doi.org/10.1172/JCI59806).
542. Yang, Z.-Z., Grote, D.M., Ziesmer, S.C., Xiu, B., Novak, A.J., and Ansell, S.M. (2015). PD-1 expression defines two distinct T-cell sub-populations in follicular lymphoma that differentially impact patient survival. *Blood Cancer J* 5, e281. [10.1038/bcj.2015.1](https://doi.org/10.1038/bcj.2015.1).
543. Yang, Z.-Z., Kim, H.J., Villasboas, J.C., Chen, Y.-P., Price-Troska, T., Jalali, S., Wilson, M., Novak, A.J., and Ansell, S.M. (2017). Expression of LAG-3 defines exhaustion of intratumoral PD-1+ T cells and correlates with poor outcome in follicular lymphoma. *Oncotarget* 8, 61425-61439. [10.18632/oncotarget.18251](https://doi.org/10.18632/oncotarget.18251).
544. Yang, Z.-Z., Kim, H.J., Wu, H., Jalali, S., Tang, X., Krull, J.E., Ding, W., Novak, A.J., and Ansell, S.M. (2020). TIGIT Expression Is Associated with T-cell Suppression and Exhaustion and Predicts Clinical Outcome and Anti-PD-1 Response in Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res* 26, 5217-5231. [10.1158/1078-0432.CCR-20-0558](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0558).
545. Germain, C., Guillaudeux, T., Galsgaard, E.D., Hervouet, C., Tekaya, N., Gallouet, A.-S., Fassy, J., Bihl, F., Poupon, G., Lazzari, A., et al. (2015). Lectin-like transcript 1 is a marker of germinal center-derived B-cell non-Hodgkin's lymphomas dampening natural killer cell functions. *Oncoimmunology* 4, e1026503. [10.1080/2162402X.2015.1026503](https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1026503).
546. Myklebust, J.H., Irish, J.M., Brody, J., Czerwinski, D.K., Houot, R., Kohrt, H.E., Timmerman, J., Said, J., Green, M.R., Delabie, J., et al. (2013). High PD-1 expression and suppressed cytokine signaling distinguish T cells infiltrating follicular lymphoma tumors from peripheral T cells. *Blood* 121, 1367-1376. [10.1182/blood-2012-04-421826](https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-421826).
547. Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30, 324-335. [10.1016/j.immuni.2009.03.003](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.003).
548. Serrat, N., Guerrero-Hernández, M., Matas-Céspedes, A., Yahiaoui, A., Valero, J.G., Nadeu, F., Clot, G., Di Re, M., Corbera-Bellalta, M., Magnano, L., et al. (2020). PI3Kδ inhibition reshapes follicular lymphoma-immune microenvironment cross talk and unleashes the activity of venetoclax. *Blood Adv* 4, 4217-4231. [10.1182/bloodadvances.2020001584](https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001584).
549. Townsend, W., Pasikowska, M., Yallop, D., Phillips, E.H., Patten, P.E.M., Salisbury, J.R., Marcus, R., Pepper, A., and Devereux, S. (2019). The architecture of neoplastic follicles in follicular lymphoma; analysis of the relationship between the tumor and follicular helper T-cells. *Haematologica*. [10.3324/haematol.2019.220160](https://doi.org/10.3324/haematol.2019.220160).
550. Calvo, K.R., Dabir, B., Kovach, A., Devor, C., Bandle, R., Bond, A., Shih, J.H., and Jaffe, E.S. (2008). IL-4 protein expression and basal activation of Erk in vivo in follicular lymphoma. *Blood* 112, 3818-3826. [10.1182/blood-2008-02-138933](https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-138933).
551. Pangault, C., Amé-Thomas, P., Ruminy, P., Rossille, D., Caron, G., Baia, M., De Vos, J., Roussel, M., Monvoisin, C., Lamy, T., et al. (2010). Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent T(FH)-B cell axis. *Leukemia* 24, 2080-2089. [10.1038/leu.2010.223](https://doi.org/10.1038/leu.2010.223).
552. Misiak, J., Jean, R., Rodriguez, S., Deleurme, L., Lamy, T., Tarte, K., and Amé-Thomas, P. (2020). Human Lymphoid Stromal Cells Contribute to Polarization of Follicular T Cells Into IL-4 Secreting Cells. *Front Immunol* 11, 559866. [10.3389/fimmu.2020.559866](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.559866).
553. Le, K.-S., Thibult, M.-L., Just-Landi, S., Pastor, S., Gondois-Rey, F., Granjeaud, S., Broussais, F., Bouabdallah, R., Colisson, R., Caux, C., et al. (2016). Follicular B Lymphomas Generate Regulatory T Cells via the ICOS/ICOSL Pathway and Are Susceptible to Treatment by Anti-ICOS/ICOSL Therapy. *Cancer Res* 76, 4648-4660. [10.1158/0008-5472.CAN-15-0589](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0589).
554. Yang, Z.-Z., Novak, A.J., Stenson, M.J., Witzig, T.E., and Ansell, S.M. (2006). Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107, 3639-3646. [10.1182/blood-2005-08-3376](https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3376).

555. Yang, Z.-Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E., and Ansell, S.M. (2009). Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 69, 5522–5530. 10.1158/0008-5472.CAN-09-0266.
556. Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 17, 975–982. 10.1038/nm.2425.
557. Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2016). T follicular regulatory cells. *Immunol Rev* 271, 246–259. 10.1111/imr.12411.
558. Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Fox, B.C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., Montserrat, E., Campo, E., and Banham, A.H. (2006). High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 108, 2957–2964. 10.1182/blood-2006-04-018218.
559. Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Roncador, G., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., Hamoudi, R., Howat, W.J., Montserrat, E., and Campo, E. (2009). High Numbers of Tumor-Infiltrating Programmed Cell Death 1-Positive Regulatory Lymphocytes Are Associated With Improved Overall Survival in Follicular Lymphoma. *JCO* 27, 1470–1476. 10.1200/JCO.2008.18.0513.
560. Farinha, P., Al-Tourah, A., Gill, K., Klasa, R., Connors, J.M., and Gascoyne, R.D. (2010). The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood* 115, 289–295. 10.1182/blood-2009-07-235598.
561. Yang, Z.-Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E., and Ansell, S.M. (2006). Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 66, 10145–10152. 10.1158/0008-5472.CAN-06-1822.
562. Epron, G., Ame-Thomas, P., Priol, J.L., Pangault, C., Dulong, J., Lamy, T., Fest, T., and Tarte, K. (2012). Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia* 26, 139–148. 10.1038/leu.2011.179.
563. Domínguez-Soto, A., Sierra-Filardi, E., Puig-Kröger, A., Pérez-Maceda, B., Gómez-Aguado, F., Corcuera, M.T., Sánchez-Mateos, P., and Corbí, A.L. (2011). Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J Immunol* 186, 2192–2200. 10.4049/jimmunol.1000475.
564. Hirz, T., Matera, E.-L., Chettab, K., Jordheim, L.P., Mathé, D., Evesque, A., Esmenjaud, J., Salles, G., and Dumontet, C. (2017). Neutrophils protect lymphoma cells against cytotoxic and targeted therapies through CD11b/ICAM-1 binding. *Oncotarget* 8, 72818–72834. 10.18632/oncotarget.20350.
565. Haebe, S., Shree, T., Sathe, A., Day, G., Czerwinski, D.K., Grimes, S.M., Lee, H., Binkley, M.S., Long, S.R., Martin, B., et al. (2021). Single-cell analysis can define distinct evolution of tumor sites in follicular lymphoma. *Blood* 137, 2869–2880. 10.1182/blood.2020009855.
566. Han, G., Deng, Q., Marques-Piubelli, M.L., Dai, E., Dang, M., Ma, M.C.J., Li, X., Yang, H., Henderson, J., Kudryashova, O., et al. (2022). Follicular Lymphoma Microenvironment Characteristics Associated with Tumor Cell Mutations and MHC Class II Expression. *Blood Cancer Discovery*, OF1–OF16. 10.1158/2643-3230.BCD-21-0075.
567. Roeder, T., Seufert, J., Uvarovskii, A., Frauhammer, F., Bordas, M., Abedpour, N., Stolarczyk, M., Mallm, J.-P., Herbst, S.A., Bruch, P.-M., et al. (2020). Dissecting intratumour heterogeneity of nodal B-cell lymphomas at the transcriptional, genetic and drug-response levels. *Nat Cell Biol* 22, 896–906. 10.1038/s41556-020-0532-x.
568. Girard, J.-P., Moussion, C., and Förster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 12, 762–773. 10.1038/nri3298.
569. Gray, E.E., and Cyster, J.G. (2012). Lymph Node Macrophages. *JIN* 4, 424–436. 10.1159/000337007.
570. Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14, 667–685. 10.1038/nri3738.
571. Mueller, S.N., and Germain, R.N. (2009). Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 618–629. 10.1038/nri2588.
572. Jalkanen, S., and Salmi, M. (2020). Lymphatic endothelial cells of the lymph node. *Nat Rev Immunol* 20, 566–578. 10.1038/s41577-020-0281-x.
573. Carrasco, Y.R., and Batista, F.D. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 160–171. 10.1016/j.immuni.2007.06.007.
574. Grigorova, I.L., Panteleev, M., and Cyster, J.G. (2010). Lymph node cortical sinus organization and relationship to lymphocyte egress dynamics and antigen exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20447–20452. 10.1073/pnas.1009968107.
575. Junt, T., Moseman, E.A., Iannaccone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., et al. (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450, 110–114. 10.1038/nature06287.

576. Phan, T.G., Grigorova, I., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat Immunol* 8, 992–1000. 10.1038/ni1494.
577. Phan, T.G., Green, J.A., Gray, E.E., Xu, Y., and Cyster, J.G. (2009). Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nat Immunol* 10, 786–793. 10.1038/ni.1745.
578. Gerner, M.Y., Torabi-Parizi, P., and Germain, R.N. (2015). Strategically localized dendritic cells promote rapid T cell responses to lymph-borne particulate antigens. *Immunity* 42, 172–185. 10.1016/j.immuni.2014.12.024.
579. Sinha, R.K., Park, C., Hwang, I.-Y., Davis, M.D., and Kehrl, J.H. (2009). B lymphocytes exit lymph nodes through cortical lymphatic sinusoids by a mechanism independent of sphingosine-1-phosphate-mediated chemotaxis. *Immunity* 30, 434–446. 10.1016/j.immuni.2008.12.018.
580. Braun, A., Worbs, T., Moschovakis, G.L., Halle, S., Hoffmann, K., Bölter, J., Münk, A., and Förster, R. (2011). Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nat Immunol* 12, 879–887. 10.1038/ni.2085.
581. Baptista, A.P., Gola, A., Huang, Y., Milanez-Almeida, P., Torabi-Parizi, P., Urban, J.F., Shapiro, V.S., Gerner, M.Y., and Germain, R.N. (2019). The Chemoattractant Receptor Ebi2 Drives Intranodal Naive CD4+ T Cell Peripheralization to Promote Effective Adaptive Immunity. *Immunity* 50, 1188–1201.e6. 10.1016/j.immuni.2019.04.001.
582. Gerner, M.Y., Casey, K.A., Kastenmuller, W., and Germain, R.N. (2017). Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity. *J Exp Med* 214, 3105–3122. 10.1084/jem.20170335.
583. Grigorova, I.L., Schwab, S.R., Phan, T.G., Pham, T.H.M., Okada, T., and Cyster, J.G. (2009). Cortical sinus probing, S1P1-dependent entry and flow-based capture of egressing T cells. *Nat Immunol* 10, 58–65. 10.1038/ni.1682.
584. Pham, T.H.M., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C.G., and Cyster, J.G. (2008). S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* 28, 122–133. 10.1016/j.immuni.2007.11.017.
585. von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3, 867–878. 10.1038/nri1222.
586. Rodrigues, P.F., Alberti-Servera, L., Eremin, A., Grajales-Reyes, G.E., Ivanek, R., and Tussiwand, R. (2018). Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 19, 711–722. 10.1038/s41590-018-0136-9.
587. Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H., and Haberman, A.M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34, 947–960. 10.1016/j.immuni.2011.03.024.
588. Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., and Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34, 961–972. 10.1016/j.immuni.2011.03.025.
589. Liu, Z., Gerner, M.Y., Van Panhuys, N., Levine, A.G., Rudensky, A.Y., and Germain, R.N. (2015). Immune homeostasis enforced by co-localized effector and regulatory T cells. *Nature* 528, 225–230. 10.1038/nature16169.
590. Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355–360. 10.1038/nature02284.
591. Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2007). Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol* 8, 1295–1301. 10.1038/ni1545.
592. Bellomo, A., Gentek, R., Bajénoff, M., and Baratin, M. (2018). Lymph node macrophages: Scavengers, immune sentinels and trophic effectors. *Cellular Immunology* 330, 168–174. 10.1016/j.cellimm.2018.01.010.
593. Gupta, P., Lai, S.M., Sheng, J., Tetlak, P., Balachander, A., Claser, C., Renia, L., Karjalainen, K., and Ruedl, C. (2016). Tissue-Resident CD169(+) Macrophages Form a Crucial Front Line against Plasmodium Infection. *Cell Rep* 16, 1749–1761. 10.1016/j.celrep.2016.07.010.
594. Kuka, M., and Iannaccone, M. (2014). The role of lymph node sinus macrophages in host defense. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1319, 38–46. 10.1111/nyas.12387.
595. van Dinther, D., Veninga, H., Iborra, S., Borg, E.G.F., Hoogterp, L., Olesek, K., Beijer, M.R., Schetters, S.T.T., Kalay, H., Garcia-Vallejo, J.J., et al. (2018). Functional CD169 on Macrophages Mediates Interaction with Dendritic Cells for CD8+ T Cell Cross-Priming. *Cell Rep* 22, 1484–1495. 10.1016/j.celrep.2018.01.021.
596. Asano, K., Nabeyama, A., Miyake, Y., Qiu, C.-H., Kurita, A., Tomura, M., Kanagawa, O., Fujii, S., and Tanaka, M. (2011). CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity* 34, 85–95. 10.1016/j.immuni.2010.12.011.

597. Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Horlacher, O.C., Winkler, S., John, T., Browning, J., MacGregor, D., Cebon, J., and Dunbar, P.R. (2009). Distinctive localization of antigen-presenting cells in human lymph nodes. *Blood* *113*, 1257–1267. 10.1182/blood-2008-06-165266.
598. Hartnell, A., Steel, J., Turley, H., Jones, M., Jackson, D.G., and Crocker, P.R. (2001). Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. *Blood* *97*, 288–296. 10.1182/blood.V97.1.288.
599. Granelli-Piperno, A., Pritsker, A., Pack, M., Shimeliovich, I., Arrighi, J.-F., Park, C.G., Trumpfheller, C., Piguet, V., Moran, T.M., and Steinman, R.M. (2005). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol* *175*, 4265–4273. 10.4049/jimmunol.175.7.4265.
600. Gaya, M., Castello, A., Montaner, B., Rogers, N., Reis e Sousa, C., Bruckbauer, A., and Batista, F.D. (2015). Host response. Inflammation-induced disruption of SCS macrophages impairs B cell responses to secondary infection. *Science* *347*, 667–672. 10.1126/science.aaa1300.
601. Barral, P., Polzella, P., Bruckbauer, A., van Rooijen, N., Besra, G.S., Cerundolo, V., and Batista, F.D. (2010). CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. *Nat Immunol* *11*, 303–312. 10.1038/ni.1853.
602. Iannacone, M., Moseman, E.A., Tonti, E., Bosurgi, L., Junt, T., Henrickson, S.E., Whelan, S.P., Guidotti, L.G., and von Andrian, U.H. (2010). Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* *465*, 1079–1083. 10.1038/nature09118.
603. Sagoo, P., Garcia, Z., Breart, B., Lemaître, F., Michonneau, D., Albert, M.L., Levy, Y., and Bousso, P. (2016). In vivo imaging of inflammasome activation reveals a subcapsular macrophage burst response that mobilizes innate and adaptive immunity. *Nat Med* *22*, 64–71. 10.1038/nm.4016.
604. Martens, J.-H., Kzhyshkowska, J., Falkowski-Hansen, M., Schledzewski, K., Gratchev, A., Mansmann, U., Schmutzmaier, C., Dippel, E., Koenen, W., Riedel, F., et al. (2006). Differential expression of a gene signature for scavenger/lectin receptors by endothelial cells and macrophages in human lymph node sinuses, the primary sites of regional metastasis. *J Pathol* *208*, 574–589. 10.1002/path.1921.
605. Lichtenstein, L., Mattijssen, F., de Wit, N.J., Georgiadi, A., Hooiveld, G.J., van der Meer, R., He, Y., Qi, L., Köster, A., Tamsma, J.T., et al. (2010). Angptl4 protects against severe proinflammatory effects of saturated fat by inhibiting fatty acid uptake into mesenteric lymph node macrophages. *Cell Metab* *12*, 580–592. 10.1016/j.cmet.2010.11.002.
606. Steer, H.W., and Foot, R.A. (1987). Changes in the medulla of the parathyroid lymph nodes of the rat during acute gastro-intestinal inflammation. *J Anat* *152*, 23–36.
607. Mohr, E., Serre, K., Manz, R.A., Cunningham, A.F., Khan, M., Hardie, D.L., Bird, R., and MacLennan, I.C.M. (2009). Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. *J Immunol* *182*, 2113–2123. 10.4049/jimmunol.0802771.
608. Swartzendruber, D.C., and Congdon, C.C. (1963). ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATIONS ON TINGIBLE BODY MACROPHAGES IN MOUSE SPLEEN. *Journal of Cell Biology* *19*, 641–646. 10.1083/jcb.19.3.641.
609. Baratin, M., Simon, L., Jorquera, A., Ghigo, C., Dembele, D., Nowak, J., Gentek, R., Wienert, S., Klauschen, F., Malissen, B., et al. (2017). T Cell Zone Resident Macrophages Silently Dispose of Apoptotic Cells in the Lymph Node. *Immunity* *47*, 349–362.e5. 10.1016/j.immuni.2017.07.019.
610. Mondor, I., Baratin, M., Lagueyrie, M., Saro, L., Henri, S., Gentek, R., Suerinck, D., Kastenmuller, W., Jiang, J.X., and Bajénoff, M. (2019). Lymphatic Endothelial Cells Are Essential Components of the Subcapsular Sinus Macrophage Niche. *Immunity* *50*, 1453–1466.e4. 10.1016/j.immuni.2019.04.002.
611. Delemarre, F.G., Kors, N., Kraal, G., and van Rooijen, N. (1990). Repopulation of macrophages in popliteal lymph nodes of mice after liposome-mediated depletion. *J Leukoc Biol* *47*, 251–257. 10.1002/jlb.47.3.251.
612. Roozendaal, R., and Mebius, R.E. (2011). Stromal Cell–Immune Cell Interactions. *Annual Review of Immunology* *29*, 23–43. 10.1146/annurev-immunol-031210-101357.
613. Chang, J.E., and Turley, S.J. (2015). Stromal infrastructure of the lymph node and coordination of immunity. *Trends Immunol* *36*, 30–39. 10.1016/j.it.2014.11.003.
614. Krishnamurthy, A.T., and Turley, S.J. (2020). Lymph node stromal cells: cartographers of the immune system. *Nat Immunol* *21*, 369–380. 10.1038/s41590-020-0635-3.
615. Rodda, L.B., Lu, E., Bennett, M.L., Sokol, C.L., Wang, X., Luther, S.A., Barres, B.A., Luster, A.D., Ye, C.J., and Cyster, J.G. (2018). Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. *Immunity* *48*, 1014–1028.e6. 10.1016/j.immuni.2018.04.006.

616. Rodda, L.B., Bannard, O., Ludewig, B., Nagasawa, T., and Cyster, J.G. (2015). Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12-Expressing Reticular Cells. *J Immunol* *195*, 4781–4791. 10.4049/jimmunol.1501191.
617. Pikor, N.B., Mörbe, U., Lütge, M., Gil-Cruz, C., Perez-Shibayama, C., Novkovic, M., Cheng, H.-W., Nombela-Arrieta, C., Nagasawa, T., Linterman, M.A., et al. (2020). Remodeling of light and dark zone follicular dendritic cells governs germinal center responses. *Nat Immunol* *21*, 649–659. 10.1038/s41590-020-0672-y.
618. Pikor, N.B., Cheng, H.-W., Onder, L., and Ludewig, B. (2021). Development and Immunological Function of Lymph Node Stromal Cells. *J Immunol* *206*, 257–263. 10.4049/jimmunol.2000914.
619. Huang, H.-Y., Rivas-Caicedo, A., Renevey, F., Cannelle, H., Peranzoni, E., Scarpellino, L., Hardie, D.L., Pommier, A., Schaeuble, K., Favre, S., et al. (2018). Identification of a new subset of lymph node stromal cells involved in regulating plasma cell homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, E6826–E6835. 10.1073/pnas.1712628115.
620. Li, L., Wu, J., Abdi, R., Jewell, C.M., and Bromberg, J.S. (2021). Lymph node fibroblastic reticular cells steer immune responses. *Trends in Immunology*, S1471490621001204. 10.1016/j.it.2021.06.006.
621. Banks, T.A., Rouse, B.T., Kerley, M.K., Blair, P.J., Godfrey, V.L., Kuklin, N.A., Bouley, D.M., Thomas, J., Kanangat, S., and Mucenski, M.L. (1995). Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol* *155*, 1685–1693.
622. De Togni, P., Goellner, J., Ruddle, N.H., Streeter, P.R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S.C., Carlson, R., Shornick, L.P., and Strauss-Schoenberger, J. (1994). Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* *264*, 703–707. 10.1126/science.8171322.
623. Fütterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M.H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* *9*, 59–70. 10.1016/s1074-7613(00)80588-9.
624. Huber, C., Thielen, C., Seeger, H., Schwarz, P., Montrasio, F., Wilson, M.R., Heinen, E., Fu, Y.-X., Miele, G., and Aguzzi, A. (2005). Lymphotoxin-beta receptor-dependent genes in lymph node and follicular dendritic cell transcriptomes. *J Immunol* *174*, 5526–5536. 10.4049/jimmunol.174.9.5526.
625. Koni, P.A., Sacca, R., Lawton, P., Browning, J.L., Ruddle, N.H., and Flavell, R.A. (1997). Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* *6*, 491–500. 10.1016/s1074-7613(00)80292-7.
626. Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., and Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* *184*, 1397–1411. 10.1084/jem.184.4.1397.
627. Bajénoff, M., Egen, J.G., Koo, L.Y., Laugier, J.P., Brau, F., Glaichenhaus, N., and Germain, R.N. (2006). Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* *25*, 989–1001. 10.1016/j.immuni.2006.10.011.
628. Wang, X., Cho, B., Suzuki, K., Xu, Y., Green, J.A., An, J., and Cyster, J.G. (2011). Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J Exp Med* *208*, 2497–2510. 10.1084/jem.20111449.
629. Allen, C.D.C., and Cyster, J.G. (2008). Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* *20*, 14–25. 10.1016/j.smim.2007.12.001.
630. Allen, C.D.C., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* *27*, 190–202. 10.1016/j.immuni.2007.07.009.
631. Koopman, G., Keehnen, R.M., Lindhout, E., Newman, W., Shimizu, Y., van Seventer, G.A., de Groot, C., and Pals, S.T. (1994). Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol* *152*, 3760–3767.
632. Victora, G.D., and Mesin, L. (2014). Clonal and cellular dynamics in germinal centers. *Curr Opin Immunol* *28*, 90–96. 10.1016/j.coi.2014.02.010.
633. Bajénoff, M., and Germain, R.N. (2009). B-cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells. *Blood* *114*, 4989–4997. 10.1182/blood-2009-06-229567.
634. Heesters, B.A., Chatterjee, P., Kim, Y.-A., Gonzalez, S.F., Kuligowski, M.P., Kirchhausen, T., and Carroll, M.C. (2013). Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* *38*, 1164–1175. 10.1016/j.immuni.2013.02.023.
635. Heesters, B.A., Myers, R.C., and Carroll, M.C. (2014). Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* *14*, 495–504. 10.1038/nri3689.
636. Sacedón, R., Díez, B., Nuñez, V., Hernández-López, C., Gutierrez-Frías, C., Cejalvo, T., Outram, S.V., Crompton, T., Zapata, A.G., Vicente, A., et al. (2005). Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol* *174*, 1456–1461. 10.4049/jimmunol.174.3.1456.

637. Yoon, S.-O., Zhang, X., Berner, P., Blom, B., and Choi, Y.S. (2009). Notch ligands expressed by follicular dendritic cells protect germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol* *183*, 352–358. 10.4049/jimmunol.0803183.
638. Gorelik, L., Gilbride, K., Dobles, M., Kalled, S.L., Zandman, D., and Scott, M.L. (2003). Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J Exp Med* *198*, 937–945. 10.1084/jem.20030789.
639. Hase, H., Kanno, Y., Kojima, M., Hasegawa, K., Sakurai, D., Kojima, H., Tsuchiya, N., Tokunaga, K., Masawa, N., Azuma, M., et al. (2004). BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. *Blood* *103*, 2257–2265. 10.1182/blood-2003-08-2694.
640. Park, C.-S., Yoon, S.-O., Armitage, R.J., and Choi, Y.S. (2004). Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J Immunol* *173*, 6676–6683. 10.4049/jimmunol.173.11.6676.
641. Tjin, E.P.M., Groen, R.W.J., Vogelzang, I., Derksen, P.W.B., Klok, M.D., Meijer, H.P., van Eeden, S., Pals, S.T., and Spaargaren, M. (2006). Functional analysis of HGF/MET signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* *107*, 760–768. 10.1182/blood-2005-05-1929.
642. Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* *9*, 15–27. 10.1038/nri2454.
643. Tew, J.G., Wu, J., Fakher, M., Szakal, A.K., and Qin, D. (2001). Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol* *22*, 361–367. 10.1016/s1471-4906(01)01942-1.
644. Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Goodnow, C.C., and Randall, K.L. (2010). T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol Rev* *237*, 72–89. 10.1111/j.1600-065X.2010.00937.x.
645. Kranich, J., Krautler, N.J., Heinen, E., Polymenidou, M., Bridel, C., Schildknecht, A., Huber, C., Kosco-Vilbois, M.H., Zinkernagel, R., Miele, G., et al. (2008). Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. *J Exp Med* *205*, 1293–1302. 10.1084/jem.20071019.
646. Garin, A., Meyer-Hermann, M., Contie, M., Figge, M.T., Buatois, V., Gunzer, M., Toellner, K.-M., Elson, G., and Kosco-Vilbois, M.H. (2010). Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity* *33*, 84–95. 10.1016/j.immuni.2010.07.005.
647. Hannum, L.G., Haberman, A.M., Anderson, S.M., and Shlomchik, M.J. (2000). Germinal center initiation, variable gene region hypermutation, and mutant B cell selection without detectable immune complexes on follicular dendritic cells. *J Exp Med* *192*, 931–942. 10.1084/jem.192.7.931.
648. Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S., Sitnik, K., Kitamura, H., Agace, W.W., and Fagarasan, S. (2010). The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* *33*, 71–83. 10.1016/j.immuni.2010.07.003.
649. Heesters, B.A., van Megesen, K., Tomris, I., de Vries, R.P., Magri, G., and Spits, H. (2021). Characterization of human FDCs reveals regulation of T cells and antigen presentation to B cells. *J Exp Med* *218*, e20210790. 10.1084/jem.20210790.
650. Bannard, O., Horton, R.M., Allen, C.D.C., An, J., Nagasawa, T., and Cyster, J.G. (2013). Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* *39*, 912–924. 10.1016/j.immuni.2013.08.038.
651. Alexandre, Y.O., and Mueller, S.N. (2018). Stromal cell networks coordinate immune response generation and maintenance. *Immunol Rev* *283*, 77–85. 10.1111/imr.12641.
652. Cremasco, V., Woodruff, M.C., Onder, L., Cupovic, J., Nieves-Bonilla, J.M., Schildberg, F.A., Chang, J., Cremasco, F., Harvey, C.J., Wucherpfennig, K., et al. (2014). B cell homeostasis and follicle confinement are governed by fibroblastic reticular cells. *Nat Immunol* *15*, 973–981. 10.1038/ni.2965.
653. Bénézech, C., Mader, E., Desanti, G., Khan, M., Nakamura, K., White, A., Ware, C.F., Anderson, G., and Caamaño, J.H. (2012). Lymphotoxin- β receptor signaling through NF- κ B2-RelB pathway reprograms adipocyte precursors as lymph node stromal cells. *Immunity* *37*, 721–734. 10.1016/j.immuni.2012.06.010.
654. Yoshida, H., Naito, A., Inoue, J.-I., Satoh, M., Santee-Cooper, S.M., Ware, C.F., Togawa, A., Nishikawa, S., and Nishikawa, S.-I. (2002). Different cytokines induce surface lymphotoxin- α on IL-7 receptor- α cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches. *Immunity* *17*, 823–833. 10.1016/s1074-7613(02)00479-x.
655. Junt, T., Scandella, E., and Ludewig, B. (2008). Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* *8*, 764–775. 10.1038/nri2414.
656. Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., and Luther, S.A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* *8*, 1255–1265. 10.1038/ni1513.

657. Tomei, A.A., Siegert, S., Britschgi, M.R., Luther, S.A., and Swartz, M.A. (2009). Fluid flow regulates stromal cell organization and CCL21 expression in a tissue-engineered lymph node microenvironment. *J Immunol* *183*, 4273–4283. 10.4049/jimmunol.0900835.
658. Novkovic, M., Onder, L., Cupovic, J., Abe, J., Bomze, D., Cremasco, V., Scandella, E., Stein, J.V., Bocharov, G., Turley, S.J., et al. (2016). Topological Small-World Organization of the Fibroblastic Reticular Cell Network Determines Lymph Node Functionality. *PLoS Biol* *14*, e1002515. 10.1371/journal.pbio.1002515.
659. Cyster, J.G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* *23*, 127–159. 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115628.
660. Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., and Cyster, J.G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 12694–12699. 10.1073/pnas.97.23.12694.
661. Worbs, T., Bernhardt, G., and Förster, R. (2008). Factors governing the intranodal migration behavior of T lymphocytes. *Immunol Rev* *221*, 44–63. 10.1111/j.1600-065X.2008.00580.x.
662. Brown, F.D., Sen, D.R., LaFleur, M.W., Godec, J., Lukacs-Kornek, V., Schildberg, F.A., Kim, H.-J., Yates, K.B., Ricoult, S.J.H., Bi, K., et al. (2019). Fibroblastic reticular cells enhance T cell metabolism and survival via epigenetic remodeling. *Nat Immunol* *20*, 1668–1680. 10.1038/s41590-019-0515-x.
663. Malhotra, D., Fletcher, A.L., Astarita, J., Lukacs-Kornek, V., Tayalia, P., Gonzalez, S.F., Elpek, K.G., Chang, S.K., Knoblich, K., Hemler, M.E., et al. (2012). Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol* *13*, 499–510. 10.1038/ni.2262.
664. Khan, O., Headley, M., Gerard, A., Wei, W., Liu, L., and Krummel, M.F. (2011). Regulation of T cell priming by lymphoid stroma. *PLoS One* *6*, e26138. 10.1371/journal.pone.0026138.
665. Siegert, S., Huang, H.-Y., Yang, C.-Y., Scarpellino, L., Carrie, L., Essex, S., Nelson, P.J., Heikenwalder, M., Acha-Orbea, H., Buckley, C.D., et al. (2011). Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide. *PLoS One* *6*, e27618. 10.1371/journal.pone.0027618.
666. Knoblich, K., Cruz Migoni, S., Siew, S.M., Jinks, E., Kaul, B., Jeffery, H.C., Baker, A.T., Suliman, M., Vrzalikova, K., Mehenna, H., et al. (2018). The human lymph node microenvironment unilaterally regulates T-cell activation and differentiation. *PLoS Biol* *16*, e2005046. 10.1371/journal.pbio.2005046.
667. Abe, J., Shichino, S., Ueha, S., Hashimoto, S., Tomura, M., Inagaki, Y., Stein, J.V., and Matsushima, K. (2014). Lymph node stromal cells negatively regulate antigen-specific CD4⁺ T cell responses. *J Immunol* *193*, 1636–1644. 10.4049/jimmunol.1302946.
668. Baptista, A.P., Roozendaal, R., Reijmers, R.M., Koning, J.J., Unger, W.W., Greuter, M., Keuning, E.D., Molenaar, R., Goverse, G., Sneebouer, M.M.S., et al. (2014). Lymph node stromal cells constrain immunity via MHC class II self-antigen presentation. *Elife* *3*. 10.7554/eLife.04433.
669. Dubrot, J., Duraes, F.V., Potin, L., Capotosti, F., Brighthouse, D., Suter, T., LeibundGut-Landmann, S., Garbi, N., Reith, W., Swartz, M.A., et al. (2014). Lymph node stromal cells acquire peptide-MHCII complexes from dendritic cells and induce antigen-specific CD4⁺ T cell tolerance. *J Exp Med* *211*, 1153–1166. 10.1084/jem.20132000.
670. Fletcher, A.L., Lukacs-Kornek, V., Reynoso, E.D., Pinner, S.E., Bellemare-Pelletier, A., Curry, M.S., Collier, A.-R., Boyd, R.L., and Turley, S.J. (2010). Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med* *207*, 689–697. 10.1084/jem.20092642.
671. Fletcher, A.L., Malhotra, D., and Turley, S.J. (2011). Lymph node stroma broaden the peripheral tolerance paradigm. *Trends Immunol* *32*, 12–18. 10.1016/j.it.2010.11.002.
672. Fletcher, A.L., Acton, S.E., and Knoblich, K. (2015). Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 350–361. 10.1038/nri3846.
673. Lee, J.-W., Epardaud, M., Sun, J., Becker, J.E., Cheng, A.C., Yonekura, A., Heath, J.K., and Turley, S.J. (2007). Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* *8*, 181–190. 10.1038/ni1427.
674. Magnusson, F.C., Liblau, R.S., von Boehmer, H., Pittet, M.J., Lee, J.-W., Turley, S.J., and Khazaie, K. (2008). Direct presentation of antigen by lymph node stromal cells protects against CD8 T-cell-mediated intestinal autoimmunity. *Gastroenterology* *134*, 1028–1037. 10.1053/j.gastro.2008.01.070.
675. Nichols, L.A., Chen, Y., Colella, T.A., Bennett, C.L., Clausen, B.E., and Engelhard, V.H. (2007). Deletional self-tolerance to a melanocyte/melanoma antigen derived from tyrosinase is mediated by a radio-resistant cell in peripheral and mesenteric lymph nodes. *J Immunol* *179*, 993–1003. 10.4049/jimmunol.179.2.993.
676. Vezys, V., Olson, S., and Lefrançois, L. (2000). Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity* *12*, 505–514. 10.1016/s1074-7613(00)80202-2.
677. Acton, S.E., Astarita, J.L., Malhotra, D., Lukacs-Kornek, V., Franz, B., Hess, P.R., Jakus, Z., Kuligowski, M., Fletcher, A.L., Elpek, K.G., et al. (2012). Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity* *37*, 276–289. 10.1016/j.immuni.2012.05.022.

678. Kumar, V., Dasoveanu, D.C., Chyou, S., Tzeng, T.-C., Rozo, C., Liang, Y., Stohl, W., Fu, Y.-X., Ruddle, N.H., and Lu, T.T. (2015). A dendritic-cell-stromal axis maintains immune responses in lymph nodes. *Immunity* *42*, 719–730. 10.1016/j.immuni.2015.03.015.
679. Yang, C.-Y., Vogt, T.K., Favre, S., Scarpellino, L., Huang, H.-Y., Tacchini-Cottier, F., and Luther, S.A. (2014). Trapping of naive lymphocytes triggers rapid growth and remodeling of the fibroblast network in reactive murine lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, E109–118. 10.1073/pnas.1312585111.
680. Astarita, J.L., Cremasco, V., Fu, J., Darnell, M.C., Peck, J.R., Nieves-Bonilla, J.M., Song, K., Kondo, Y., Woodruff, M.C., Gogineni, A., et al. (2015). The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* *16*, 75–84. 10.1038/ni.3035.
681. Martinez, V.G., Pankova, V., Krasny, L., Singh, T., Makris, S., White, I.J., Benjamin, A.C., Dertschnig, S., Horsnell, H.L., Kriston-Vizi, J., et al. (2019). Fibroblastic Reticular Cells Control Conduit Matrix Deposition during Lymph Node Expansion. *Cell Rep* *29*, 2810–2822.e5. 10.1016/j.celrep.2019.10.103.
682. Benahmed, F., Chyou, S., Dasoveanu, D., Chen, J., Kumar, V., Iwakura, Y., and Lu, T.T. (2014). Multiple CD11c+ cells collaboratively express IL-1 β to modulate stromal vascular endothelial growth factor and lymph node vascular-stromal growth. *J Immunol* *192*, 4153–4163. 10.4049/jimmunol.1301765.
683. Chyou, S., Ekland, E.H., Carpenter, A.C., Tzeng, T.-C.J., Tian, S., Michaud, M., Madri, J.A., and Lu, T.T. (2008). Fibroblast-type reticular stromal cells regulate the lymph node vasculature. *J Immunol* *181*, 3887–3896. 10.4049/jimmunol.181.6.3887.
684. Zhang, Y., Tech, L., George, L.A., Acs, A., Durrett, R.E., Hess, H., Walker, L.S.K., Tarlinton, D.M., Fletcher, A.L., Hauser, A.E., et al. (2018). Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells. *J Exp Med* *215*, 1227–1243. 10.1084/jem.20160832.
685. Kapoor, V.N., Müller, S., Keerthivasan, S., Brown, M., Chalouni, C., Storm, E.E., Castiglioni, A., Lane, R., Nitschke, M., Dominguez, C.X., et al. (2021). Gremlin 1+ fibroblastic niche maintains dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues. *Nat Immunol* *22*, 571–585. 10.1038/s41590-021-00920-6.
686. Mionnet, C., Mondor, I., Jorquera, A., Loosveld, M., Maurizio, J., Arcangeli, M.-L., Ruddle, N.H., Nowak, J., Aurrand-Lions, M., Luche, H., et al. (2013). Identification of a new stromal cell type involved in the regulation of inflamed B cell follicles. *PLoS Biol* *11*, e1001672. 10.1371/journal.pbio.1001672.
687. Katakai, T., Hara, T., Lee, J.-H., Gonda, H., Sugai, M., and Shimizu, A. (2004). A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol* *16*, 1133–1142. 10.1093/intimm/dxh113.
688. Chai, Q., Onder, L., Scandella, E., Gil-Cruz, C., Perez-Shibayama, C., Cupovic, J., Danuser, R., Sparwasser, T., Luther, S.A., Thiel, V., et al. (2013). Maturation of lymph node fibroblastic reticular cells from myofibroblastic precursors is critical for antiviral immunity. *Immunity* *38*, 1013–1024. 10.1016/j.immuni.2013.03.012.
689. Krautler, N.J., Kana, V., Kranich, J., Tian, Y., Perera, D., Lemm, D., Schwarz, P., Armulik, A., Browning, J.L., Tallquist, M., et al. (2012). Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell* *150*, 194–206. 10.1016/j.cell.2012.05.032.
690. Sitnik, K.M., Wendland, K., Weishaupt, H., Uronen-Hansson, H., White, A.J., Anderson, G., Kotarsky, K., and Agace, W.W. (2016). Context-Dependent Development of Lymphoid Stroma from Adult CD34(+) Adventitial Progenitors. *Cell Rep* *14*, 2375–2388. 10.1016/j.celrep.2016.02.033.
691. Katakai, T., Suto, H., Sugai, M., Gonda, H., Togawa, A., Suematsu, S., Ebisuno, Y., Katagiri, K., Kinashi, T., and Shimizu, A. (2008). Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J Immunol* *181*, 6189–6200. 10.4049/jimmunol.181.9.6189.
692. Katakai, T. (2012). Marginal reticular cells: a stromal subset directly descended from the lymphoid tissue organizer. *Front Immunol* *3*, 200. 10.3389/fimmu.2012.00200.
693. Jarjour, M., Jorquera, A., Mondor, I., Wienert, S., Narang, P., Coles, M.C., Klauschen, F., and Bajénoff, M. (2014). Fate mapping reveals origin and dynamics of lymph node follicular dendritic cells. *J Exp Med* *211*, 1109–1122. 10.1084/jem.20132409.
694. Roozendaal, R., Mempel, T.R., Pitcher, L.A., Gonzalez, S.F., Verschoor, A., Mebius, R.E., von Andrian, U.H., and Carroll, M.C. (2009). Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity* *30*, 264–276. 10.1016/j.immuni.2008.12.014.
695. Camara, A., Cordeiro, O.G., Alloush, F., Sponcel, J., Chypre, M., Onder, L., Asano, K., Tanaka, M., Yagita, H., Ludewig, B., et al. (2019). Lymph Node Mesenchymal and Endothelial Stromal Cells Cooperate via the RANK-RANKL Cytokine Axis to Shape the Sinusoidal Macrophage Niche. *Immunity* *50*, 1467–1481.e6. 10.1016/j.immuni.2019.05.008.
696. Camara, A., Lavanant, A.C., Abe, J., Desforgues, H.L., Alexandre, Y.O., Girardi, E., Igamberdieva, Z., Asano, K., Tanaka, M., Hehlhans, T., et al. (2022). CD169+ macrophages in lymph node and spleen critically depend on dual RANK and LTbetaR signaling. *PNAS* *119*. 10.1073/pnas.2108540119.

697. Hoorweg, K., Narang, P., Li, Z., Thuery, A., Papazian, N., Withers, D.R., Coles, M.C., and Cupedo, T. (2015). A Stromal Cell Niche for Human and Mouse Type 3 Innate Lymphoid Cells. *J Immunol* *195*, 4257–4263. 10.4049/jimmunol.1402584.
698. Sato, K., Honda, S.-I., Shibuya, A., and Shibuya, K. (2018). Cutting Edge: Identification of Marginal Reticular Cells as Phagocytes of Apoptotic B Cells in Germinal Centers. *J. Immunol.* *200*, 3691–3696. 10.4049/jimmunol.1701293.
699. Fujimoto, N., He, Y., D'Addio, M., Tacconi, C., Detmar, M., and Dieterich, L.C. (2020). Single-cell mapping reveals new markers and functions of lymphatic endothelial cells in lymph nodes. *PLOS Biology* *18*, e3000704. 10.1371/journal.pbio.3000704.
700. Iftakhar-E-Khuda, I., Fair-Mäkelä, R., Kukkonen-Macchi, A., Elima, K., Karikoski, M., Rantakari, P., Miyasaka, M., Salmi, M., and Jalkanen, S. (2016). Gene-expression profiling of different arms of lymphatic vasculature identifies candidates for manipulation of cell traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 10643–10648. 10.1073/pnas.1602357113.
701. Takeda, A., Hollmén, M., Dermadi, D., Pan, J., Brulois, K.F., Kaukonen, R., Lönnberg, T., Boström, P., Koskivuo, I., Irtala, H., et al. (2019). Single-Cell Survey of Human Lymphatics Unveils Marked Endothelial Cell Heterogeneity and Mechanisms of Homing for Neutrophils. *Immunity* *51*, 561–572.e5. 10.1016/j.immuni.2019.06.027.
702. Xiang, M., Grosso, R.A., Takeda, A., Pan, J., Bekkhus, T., Brulois, K., Dermadi, D., Nordling, S., Vanlandewijck, M., Jalkanen, S., et al. (2020). A Single-Cell Transcriptional Roadmap of the Mouse and Human Lymph Node Lymphatic Vasculature. *Front Cardiovasc Med* *7*, 52. 10.3389/fcvm.2020.00052.
703. Esterházy, D., Canesso, M.C.C., Mesin, L., Muller, P.A., de Castro, T.B.R., Lockhart, A., Eljalby, M., Faria, A.M.C., and Mucida, D. (2019). Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature* *569*, 126–130. 10.1038/s41586-019-1125-3.
704. Marttila-Ichihara, F., Turja, R., Miiluniemi, M., Karikoski, M., Maksimow, M., Niemelä, J., Martinez-Pomares, L., Salmi, M., and Jalkanen, S. (2008). Macrophage mannose receptor on lymphatics controls cell trafficking. *Blood* *112*, 64–72. 10.1182/blood-2007-10-118984.
705. Ulvmar, M.H., Werth, K., Braun, A., Kelay, P., Hub, E., Eller, K., Chan, L., Lucas, B., Novitzky-Basso, I., Nakamura, K., et al. (2014). The atypical chemokine receptor CCRL1 shapes functional CCL21 gradients in lymph nodes. *Nat Immunol* *15*, 623–630. 10.1038/ni.2889.
706. Berendam, S.J., Koepfel, A.F., Godfrey, N.R., Rouhani, S.J., Woods, A.N., Rodriguez, A.B., Peske, J.D., Cummings, K.L., Turner, S.D., and Engelhard, V.H. (2019). Comparative Transcriptomic Analysis Identifies a Range of Immunologically Related Functional Elaborations of Lymph Node Associated Lymphatic and Blood Endothelial Cells. *Front Immunol* *10*, 816. 10.3389/fimmu.2019.00816.
707. Cohen, J.N., Guidi, C.J., Tewalt, E.F., Qiao, H., Rouhani, S.J., Ruddell, A., Farr, A.G., Tung, K.S., and Engelhard, V.H. (2010). Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J Exp Med* *207*, 681–688. 10.1084/jem.20092465.
708. Rouhani, S.J., Eccles, J.D., Riccardi, P., Peske, J.D., Tewalt, E.F., Cohen, J.N., Liblau, R., Mäkinen, T., and Engelhard, V.H. (2015). Roles of lymphatic endothelial cells expressing peripheral tissue antigens in CD4 T-cell tolerance induction. *Nat Commun* *6*, 6771. 10.1038/ncomms6771.
709. Tewalt, E.F., Cohen, J.N., Rouhani, S.J., Guidi, C.J., Qiao, H., Fahl, S.P., Conaway, M.R., Bender, T.P., Tung, K.S., Vella, A.T., et al. (2012). Lymphatic endothelial cells induce tolerance via PD-L1 and lack of costimulation leading to high-level PD-1 expression on CD8 T cells. *Blood* *120*, 4772–4782. 10.1182/blood-2012-04-427013.
710. Kedl, R.M., Lindsay, R.S., Finlon, J.M., Lucas, E.D., Friedman, R.S., and Tamburini, B.A.J. (2017). Migratory dendritic cells acquire and present lymphatic endothelial cell-archived antigens during lymph node contraction. *Nat Commun* *8*, 2034. 10.1038/s41467-017-02247-z.
711. Tamburini, B.A., Burchill, M.A., and Kedl, R.M. (2014). Antigen capture and archiving by lymphatic endothelial cells following vaccination or viral infection. *Nat Commun* *5*, 3989. 10.1038/ncomms4989.
712. Bovay, E., Sabine, A., Prat-Luri, B., Kim, S., Son, K., Willrodt, A.-H., Olsson, C., Halin, C., Kiefer, F., Betsholtz, C., et al. (2018). Multiple roles of lymphatic vessels in peripheral lymph node development. *J Exp Med* *215*, 2760–2777. 10.1084/jem.20180217.
713. Qu, C., Edwards, E.W., Tacke, F., Angeli, V., Llodrá, J., Sanchez-Schmitz, G., Garin, A., Haque, N.S., Peters, W., van Rooijen, N., et al. (2004). Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* *200*, 1231–1241. 10.1084/jem.20032152.
714. Blanchard, L., and Girard, J.-P. (2021). High endothelial venules (HEVs) in immunity, inflammation and cancer. *Angiogenesis* *24*, 719–753. 10.1007/s10456-021-09792-8.
715. Thomé, R. (1898). Endothelien als Phagocyten (aus den Lymphdrüsen von *Macacus cynomolgus*). *Archiv f. mikrosk. Anat.* *52*, 820–842. 10.1007/BF02977038.

716. Marchesi, V.T., and Gowans, J.L. (1964). THE MIGRATION OF LYMPHOCYTES THROUGH THE ENDOTHELIUM OF VENULES IN LYMPH NODES: AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159, 283–290. 10.1098/rspb.1964.0002.
717. Kawashima, H., Petryniak, B., Hiraoka, N., Mitoma, J., Huckaby, V., Nakayama, J., Uchimura, K., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Lowe, J.B., et al. (2005). N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases 1 and 2 cooperatively control lymphocyte homing through L-selectin ligand biosynthesis in high endothelial venules. *Nat Immunol* 6, 1096–1104. 10.1038/ni1259.
718. Mitsuoka, C., Sawada-Kasugai, M., Ando-Furui, K., Izawa, M., Nakanishi, H., Nakamura, S., Ishida, H., Kiso, M., and Kannagi, R. (1998). Identification of a major carbohydrate capping group of the L-selectin ligand on high endothelial venules in human lymph nodes as 6-sulfo sialyl Lewis X. *J Biol Chem* 273, 11225–11233. 10.1074/jbc.273.18.11225.
719. Uchimura, K., Gauguet, J.-M., Singer, M.S., Tsay, D., Kannagi, R., Muramatsu, T., von Andrian, U.H., and Rosen, S.D. (2005). A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules. *Nat Immunol* 6, 1105–1113. 10.1038/ni1258.
720. Rosen, S.D. (2004). Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 22, 129–156. 10.1146/annurev.immunol.21.090501.080131.
721. Umemoto, E., Tanaka, T., Kanda, H., Jin, S., Tohya, K., Otani, K., Matsutani, T., Matsumoto, M., Ebisuno, Y., Jang, M.H., et al. (2006). Nepmucin, a novel HEV sialomucin, mediates L-selectin-dependent lymphocyte rolling and promotes lymphocyte adhesion under flow. *J Exp Med* 203, 1603–1614. 10.1084/jem.20052543.
722. Boscacci, R.T., Pfeiffer, F., Gollmer, K., Sevilla, A.I.C., Martin, A.M., Soriano, S.F., Natale, D., Henrickson, S., von Andrian, U.H., Fukui, Y., et al. (2010). Comprehensive analysis of lymph node stroma-expressed Ig superfamily members reveals redundant and nonredundant roles for ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in lymphocyte homing. *Blood* 116, 915–925. 10.1182/blood-2009-11-254334.
723. Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguet, J.-M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M.K., Staunton, D.E., von Andrian, U.H., and Alon, R. (2005). Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* 6, 497–506. 10.1038/ni1194.
724. Mionnet, C., Sanos, S.L., Mondor, I., Jorquera, A., Laugier, J.-P., Germain, R.N., and Bajénoff, M. (2011). High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes. *Blood* 118, 6115–6122. 10.1182/blood-2011-07-367409.
725. Shulman, Z., Shinder, V., Klein, E., Grabovsky, V., Yeager, O., Geron, E., Montresor, A., Bolomini-Vittori, M., Feigelson, S.W., Kirchhausen, T., et al. (2009). Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity* 30, 384–396. 10.1016/j.immuni.2008.12.020.
726. Ueha, S., Yoneyama, H., Hontsu, S., Kurachi, M., Kitabatake, M., Abe, J., Yoshie, O., Shibayama, S., Sugiyama, T., and Matsushima, K. (2007). CCR7 mediates the migration of Foxp3+ regulatory T cells to the paracortical areas of peripheral lymph nodes through high endothelial venules. *J Leukoc Biol* 82, 1230–1238. 10.1189/jlb.0906574.
727. Chen, S., Kawashima, H., Lowe, J.B., Lanier, L.L., and Fukuda, M. (2005). Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med* 202, 1679–1689. 10.1084/jem.20051473.
728. Liu, K., Vitoria, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392–397. 10.1126/science.1170540.
729. Seth, S., Oberdörfer, L., Hyde, R., Hoff, K., Thies, V., Worbs, T., Schmitz, S., and Förster, R. (2011). CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *J Immunol* 186, 3364–3372. 10.4049/jimmunol.1002598.
730. Rossi, A., Belmonte, B., Carnevale, S., Liotti, A., De Rosa, V., Jaillon, S., Piconese, S., and Tripodo, C. (2022). Stromal and Immune Cell Dynamics in Tumor Associated Tertiary Lymphoid Structures and Anti-Tumor Immune Responses. *Front Cell Dev Biol* 10, 933113. 10.3389/fcell.2022.933113.
731. Asrir, A., Tardiveau, C., Coudert, J., Laffont, R., Blanchard, L., Bellard, E., Veerman, K., Bettini, S., Lafouresse, F., Vina, E., et al. (2022). Tumor-associated high endothelial venules mediate lymphocyte entry into tumors and predict response to PD-1 plus CTLA-4 combination immunotherapy. *Cancer Cell* 40, 318–334.e9. 10.1016/j.ccell.2022.01.002.
732. Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Le Guellec, S., Bellard, E., Fournie, J.-J., Rochaix, P., and Girard, J.-P. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 71, 5678–5687. 10.1158/0008-5472.CAN-11-0431.
733. Martinet, L., Le Guellec, S., Filleron, T., Lamant, L., Meyer, N., Rochaix, P., Garrido, I., and Girard, J.-P. (2012). High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology* 1, 829–839. 10.4161/onci.20492.
734. Chitu, V., and Stanley, E.R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 18, 39–48. 10.1016/j.coi.2005.11.006.

735. Ryan, G.R., Dai, X.M., Dominguez, M.G., Tong, W., Chuan, F., Chisholm, O., Russell, R.G., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (2001). Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood* 98, 74–84. 10.1182/blood.v98.1.74.
736. Boehme, S.A., Lio, F.M., Maciejewski-Lenoir, D., Bacon, K.B., and Conlon, P.J. (2000). The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J Immunol* 165, 397–403. 10.4049/jimmunol.165.1.397.
737. Lionakis, M.S., Swamydas, M., Fischer, B.G., Plantinga, T.S., Johnson, M.D., Jaeger, M., Green, N.M., Masedunskas, A., Weigert, R., Mikelis, C., et al. (2013). CX3CR1-dependent renal macrophage survival promotes *Candida* control and host survival. *J Clin Invest* 123, 5035–5051. 10.1172/JCI171307.
738. MacDonald, K.P.A., Palmer, J.S., Cronau, S., Seppanen, E., Olver, S., Raffelt, N.C., Kuns, R., Pettit, A.R., Clouston, A., Wainwright, B., et al. (2010). An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* 116, 3955–3963. 10.1182/blood-2010-02-266296.
739. Dasoveanu, D.C., Park, H.J., Ly, C.L., Shipman, W.D., Chyou, S., Kumar, V., Tarlinton, D., Ludewig, B., Mehrara, B.J., and Lu, T.T. (2020). Lymph node stromal CCL2 limits antibody responses. *Sci Immunol* 5, eaaw0693. 10.1126/sciimmunol.aaw0693.
740. Kataru, R.P., Jung, K., Jang, C., Yang, H., Schwendener, R.A., Baik, J.E., Han, S.H., Alitalo, K., and Koh, G.Y. (2009). Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood* 113, 5650–5659. 10.1182/blood-2008-09-176776.
741. Ferrant, J., Lhomme, F., Le Gallou, S., Irish, J.M., and Roussel, M. (2020). Circulating Myeloid Regulatory Cells: Promising Biomarkers in B-Cell Lymphomas. *Front Immunol* 11, 623993. 10.3389/fimmu.2020.623993.
742. Tadmor, T., Fell, R., Polliack, A., and Attias, D. (2013). Absolute monocytosis at diagnosis correlates with survival in diffuse large B-cell lymphoma-possible link with monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Hematol Oncol* 31, 65–71. 10.1002/hon.2019.
743. Tadmor, T., Bari, A., Sacchi, S., Marcheselli, L., Liardo, E.V., Avivi, I., Benyamini, N., Attias, D., Pozzi, S., Cox, M.C., et al. (2014). Monocyte count at diagnosis is a prognostic parameter in diffuse large B-cell lymphoma: results from a large multicenter study involving 1191 patients in the pre- and post-rituximab era. *Haematologica* 99, 125–130. 10.3324/haematol.2013.088161.
744. Wilcox, R.A., Ristow, K., Habermann, T.M., Inwards, D.J., Micallef, I.N.M., Johnston, P.B., Colgan, J.P., Nowakowski, G.S., Ansell, S.M., Witzig, T.E., et al. (2011). The absolute monocyte and lymphocyte prognostic score predicts survival and identifies high-risk patients in diffuse large-B-cell lymphoma. *Leukemia* 25, 1502–1509. 10.1038/leu.2011.112.
745. Wilcox, R.A., Ristow, K., Habermann, T.M., Inwards, D.J., Micallef, I.N.M., Johnston, P.B., Colgan, J.P., Nowakowski, G.S., Ansell, S.M., Witzig, T.E., et al. (2012). The absolute monocyte count is associated with overall survival in patients newly diagnosed with follicular lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 53, 575–580. 10.3109/10428194.2011.637211.
746. Wu, C., Wu, X., Liu, X., Yang, P., Xu, J., Chai, Y., Guo, Q., Wang, Z., and Zhang, L. (2016). Prognostic Significance of Monocytes and Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP. *Cell. Physiol. Biochem*. 39, 521–530. 10.1159/000445644.
747. Wang, J., Gao, K., Lei, W., Dong, L., Xuan, Q., Feng, M., Wang, J., Ye, X., Jin, T., Zhang, Z., et al. (2017). Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma: correlation with CD163 positive M2 type tumor-associated macrophages, not PD-1 positive tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncotarget* 8, 5414–5425. 10.18632/oncotarget.14289.
748. Vajavaara, H., Leivonen, S.-K., Jørgensen, J., Holte, H., and Leppä, S. (2022). Low lymphocyte-to-monocyte ratio predicts poor outcome in high-risk aggressive large B-cell lymphoma. *EJHaem* 3, 681–687. 10.1002/jha2.409.
749. Azzaoui, I., Uhel, F., Rossille, D., Pangault, C., Dulong, J., Le Priol, J., Lamy, T., Houot, R., Le Guill, S., Cartron, G., et al. (2016). T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 128, 1081–1092. 10.1182/blood-2015-08-662783.
750. Yhim, H.-Y., Kim, J.-A., Ko, S.-H., Park, Y., Yim, E., Kim, H.S., and Kwak, J.-Y. (2017). The prognostic significance of CD11b+CX3CR1+ monocytes in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 8, 92289–92299. 10.18632/oncotarget.21241.
751. Khalifa, K.A., Badawy, H.M., Radwan, W.M., Shehata, M.A., and Bassuoni, M.A. (2014). CD14(+) HLA-DR low/(-) monocytes as indicator of disease aggressiveness in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Int J Lab Hematol* 36, 650–655. 10.1111/ijlh.12203.
752. Lin, Y., Gustafson, M.P., Bulur, P.A., Gastineau, D.A., Witzig, T.E., and Dietz, A.B. (2011). Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 117, 872–881. 10.1182/blood-2010-05-283820.

753. Wang, Z., Jiang, R., Li, Q., Wang, H., Tao, Q., and Zhai, Z. (2021). Elevated M-MDSCs in Circulation Are Indicative of Poor Prognosis in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients. *J Clin Med* *10*, 1768. 10.3390/jcm10081768.
754. Li, Y.-L., Shi, Z.-H., Wang, X., Gu, K.-S., and Zhai, Z.-M. (2019). Tumor-associated macrophages predict prognosis in diffuse large B-cell lymphoma and correlation with peripheral absolute monocyte count. *BMC Cancer* *19*, 1049. 10.1186/s12885-019-6208-x.
755. Manfroi, B., De Grandis, M., Moreaux, J., Tabruyn, S., Mayol, J.-F., Quintero, M., Righini, C., Sturm, N., Aurrand-Lions, M., and Huard, B. (2021). The microenvironment of DLBCL is characterized by noncanonical macrophages recruited by tumor-derived CCL5. *Blood Adv* *5*, 4338–4351. 10.1182/bloodadvances.2021004203.
756. Mueller, C.G., Boix, C., Kwan, W.-H., Daussy, C., Fournier, E., Fridman, W.H., and Molina, T.J. (2007). Critical role of monocytes to support normal B cell and diffuse large B cell lymphoma survival and proliferation. *J Leukoc Biol* *82*, 567–575. 10.1189/jlb.0706481.
757. Cai, Q., Liao, H., Lin, S., Xia, Y., Wang, X., Gao, Y., Lin, Z., Lu, J., and Huang, H. (2012). High expression of tumor-infiltrating macrophages correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Med. Oncol.* *29*, 2317–2322. 10.1007/s12032-011-0123-6.
758. Cencini, E., Fabbri, A., Schiattone, L., Sicuranza, A., Mecacci, B., Granai, M., Mancini, V., Lazzi, S., Bocchia, M., and Leoncini, L. (2020). Prognostic impact of tumor-associated macrophages, lymphocyte-to-monocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratio in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Blood Res* *10*, 97–108.
759. Gomez-Gelvez, J.C., Salama, M.E., Perkins, S.L., Leavitt, M., and Inamdar, K.V. (2016). Prognostic Impact of Tumor Microenvironment in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Uniformly Treated With R-CHOP Chemotherapy. *Am J Clin Pathol* *145*, 514–523. 10.1093/ajcp/aqw034.
760. Marchesi, F., Cirillo, M., Bianchi, A., Gately, M., Olimpieri, O.M., Cerchiara, E., Renzi, D., Micera, A., Balzamino, B.O., Bonini, S., et al. (2015). High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM) at diagnosis is significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* *33*, 110–112. 10.1002/hon.2142.
761. Marinaccio, C., Ingravallo, G., Gaudio, F., Perrone, T., Nico, B., Maoirano, E., Specchia, G., and Ribatti, D. (2014). Microvascular density, CD68 and tryptase expression in human diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res* *38*, 1374–1377. 10.1016/j.leukres.2014.09.007.
762. Meyer, P.N., Fu, K., Greiner, T., Smith, L., Delabie, J., Gascoyne, R., Ott, G., Rosenwald, A., Braziel, R., Campo, E., et al. (2011). The stromal cell marker SPARC predicts for survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Am. J. Clin. Pathol.* *135*, 54–61. 10.1309/AJCPJX4BJV9NLQHY.
763. Nam, S.J., Go, H., Paik, J.H., Kim, T.M., Heo, D.S., Kim, C.W., and Jeon, Y.K. (2014). An increase of M2 macrophages predicts poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *Leuk. Lymphoma* *55*, 2466–2476. 10.3109/10428194.2013.879713.
764. Riihijärvi, S., Fiskvik, I., Taskinen, M., Vajavaara, H., Tikkala, M., Yri, O., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Delabie, J., Smeland, E., Holte, H., et al. (2015). Prognostic influence of macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a correlative study from a Nordic phase II trial. *Haematologica* *100*, 238–245. 10.3324/haematol.2014.113472.
765. Wada, N., Zaki, M.A.A., Hori, Y., Hashimoto, K., Tsukaguchi, M., Tatsumi, Y., Ishikawa, J., Tominaga, N., Sakoda, H., Take, H., et al. (2012). Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology* *60*, 313–319. 10.1111/j.1365-2559.2011.04096.x.
766. Yamamoto, W., Nakamura, N., Tomita, N., Takeuchi, K., Ishii, Y., Takahashi, H., Watanabe, R., Takasaki, H., Motomura, S., Kobayashi, S., et al. (2014). Human leukocyte antigen-DR expression on flow cytometry and tumor-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma treated by rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone therapy: retrospective cohort study. *Leuk. Lymphoma* *55*, 2721–2727. 10.3109/10428194.2014.893311.
767. Los-de Vries, G.T., Stevens, W.B.C., van Dijk, E. van, Langois-Jacques, C., Clear, A.J., Stathi, P., Roemer, M.G.M., Mendeville, M., Hijmering, N.J., Sander, B., et al. (2022). Genomic and microenvironmental landscape of stage I follicular lymphoma, compared to stage III/IV. *Blood Adv*, bloodadvances.2022008355. 10.1182/bloodadvances.2022008355.
768. Blaker, Y.N., Spetalen, S., Brodtkorb, M., Lingjaerde, O.C., Beiske, K., Østenstad, B., Sander, B., Wahlin, B.E., Melen, C.M., Myklebust, J.H., et al. (2016). The tumour microenvironment influences survival and time to transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol* *175*, 102–114. 10.1111/bjh.14201.
769. Chen, Y.-P., Kim, H.J., Wu, H., Price-Troska, T., Villasboas, J.C., Jalali, S., Feldman, A.L., Novak, A.J., Yang, Z.-Z., and Ansell, S.M. (2019). SIRPα expression delineates subsets of intratumoral monocyte/macrophages with different functional and prognostic impact in follicular lymphoma. *Blood Cancer J* *9*, 84. 10.1038/s41408-019-0246-0.

770. Valero, J.G., Matas-Céspedes, A., Arenas, F., Rodriguez, V., Carreras, J., Serrat, N., Guerrero-Hernández, M., Yahiaoui, A., Balagué, O., Martin, S., et al. (2021). The receptor of the colony-stimulating factor-1 (CSF-1R) is a novel prognostic factor and therapeutic target in follicular lymphoma. *Leukemia*. 10.1038/s41375-021-01201-9.
771. Marques-Piubelli, M.L., Parra Cuentas, E.R., Feng, L., Solis Soto, L., Gallardo, M., Gouni, S., Samaniego, F., Noorani, M., Hagemester, F.B., Westin, J.R., et al. (2022). SIRP α macrophages are increased in patients with FL who progress or relapse after frontline lenalidomide and rituximab. *Blood Adv*, bloodadvances.2022007104. 10.1182/bloodadvances.2022007104.
772. Tobin, J.W.D., Keane, C., Gunawardana, J., Mollee, P., Birch, S., Hoang, T., Lee, J., Li, L., Huang, L., Murigneux, V., et al. (2019). Progression of Disease Within 24 Months in Follicular Lymphoma Is Associated With Reduced Intratumoral Immune Infiltration. *J. Clin. Oncol.*, JCO1802365. 10.1200/JCO.18.02365.
773. Cencini, E., Fabbri, A., Sicuranza, A., Gozzetti, A., and Bocchia, M. (2021). The Role of Tumor-Associated Macrophages in Hematologic Malignancies. *Cancers* 13, 3597. 10.3390/cancers13143597.
774. Kridel, R., Steidl, C., and Gascoyne, R.D. (2015). Tumor-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 100, 143–145. 10.3324/haematol.2015.124008.
775. Xu, X., Li, Z., Liu, J., Zhu, F., Wang, Z., Wang, J., Zhang, J., Wang, H., and Zhai, Z. (2020). The prognostic value of tumour-associated macrophages in Non-Hodgkin's lymphoma: A systematic review and meta-analysis. *Scand. J. Immunol.* 91, e12814. 10.1111/sji.12814.
776. Kazama, R., Miyoshi, H., Takeuchi, M., Miyawaki, K., Nakashima, K., Yoshida, N., Kawamoto, K., Yanagida, E., Yamada, K., Umeno, T., et al. (2020). Combination of CD47 and SIRP α constituting the “don't eat me signal” is a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 10.1111/cas.14437.
777. Autio, M., Leivonen, S.-K., Brück, O., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Pellinen, T., and Leppä, S. (2022). Clinical Impact of Immune Cells and Their Spatial Interactions in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Microenvironment. *Clin Cancer Res* 28, 781–792. 10.1158/1078-0432.CCR-21-3140.
778. Betsch, A., Rutgeerts, O., Fevery, S., Sprangers, B., Verhoef, G., Dierickx, D., and Beckers, M. (2018). Myeloid-derived suppressor cells in lymphoma: The good, the bad and the ugly. *Blood Rev.* 32, 490–498. 10.1016/j.blre.2018.04.006.
779. Xu, Z., Ji, J., Xu, J., Li, D., Shi, G., Liu, F., Ding, L., Ren, J., Dou, H., Wang, T., et al. (2017). MiR-30a increases MDSC differentiation and immunosuppressive function by targeting SOCS3 in mice with B-cell lymphoma. *FEBS J.* 284, 2410–2424. 10.1111/febs.14133.
780. Xiu, B., Lin, Y., Grote, D.M., Ziesmer, S.C., Gustafson, M.P., Maas, M.L., Zhang, Z., Dietz, A.B., Porrata, L.F., Novak, A.J., et al. (2015). IL-10 induces the development of immunosuppressive CD14(+)HLA-DR(low/-) monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J* 5, e328. 10.1038/bcj.2015.56.
781. Sato, Y., Shimizu, K., Shinga, J., Hidaka, M., Kawano, F., Kakimi, K., Yamasaki, S., Asakura, M., and Fujii, S.-I. (2015). Characterization of the myeloid-derived suppressor cell subset regulated by NK cells in malignant lymphoma. *Oncoimmunology* 4, e995541. 10.1080/2162402X.2014.995541.
782. Vari, F., Arpon, D., Keane, C., Hertzberg, M.S., Talaulikar, D., Jain, S., Cui, Q., Han, E., Tobin, J., Bird, R., et al. (2018). Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* 131, 1809–1819. 10.1182/blood-2017-07-796342.
783. Voss, J.J.L.P., Ford, C.A., Petrova, S., Melville, L., Paterson, M., Pound, J.D., Holland, P., Giotti, B., Freeman, T.C., and Gregory, C.D. (2017). Modulation of macrophage antitumor potential by apoptotic lymphoma cells. *Cell Death Differ.* 24, 971–983. 10.1038/cdd.2016.132.
784. Valle-Argos, B., Chiodin, G., Bryant, D.J., Taylor, J., Lemm, E., Duriez, P.J., Rock, P.J., Strefford, J.C., Forconi, F., Burack, R.W., et al. (2021). DC-SIGN binding to mannosylated B-cell receptors in follicular lymphoma down-modulates receptor signaling capacity. *Sci Rep* 11, 11676. 10.1038/s41598-021-91112-7.
785. Chiodin, G., Allen, J.D., Bryant, D., Rock, P., Martino, E.A., Valle-Argos, B., Duriez, P.J., Watanabe, Y., Henderson, I., Blachly, J.S., et al. (2021). Insertion of atypical glycans into the tumor antigen-binding site identifies DLBCLs with distinct origin and behavior. *Blood*. 10.1182/blood.2021012052.
786. Clear, A.J., Lee, A.M., Calaminici, M., Ramsay, A.G., Morris, K.J., Hallam, S., Kelly, G., Macdougall, F., Lister, T.A., and Gribben, J.G. (2010). Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood* 115, 5053–5056. 10.1182/blood-2009-11-253260.
787. Roussel, M., Lhomme, F., Roe, C.E., Bartkowiak, T., Gravelle, P., Laurent, C., Fest, T., and Irish, J.M. (2020). Mass cytometry defines distinct immune profile in germinal center B-cell lymphomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 69, 407–420. 10.1007/s00262-019-02464-z.
788. Zhao, F., Hoechst, B., Duffy, A., Gamrekelashvili, J., Fioravanti, S., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2012). S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells. *Immunology* 136, 176–183. 10.1111/j.1365-2567.2012.03566.x.

789. Glennie, M.J., French, R.R., Cragg, M.S., and Taylor, R.P. (2007). Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 44, 3823–3837. 10.1016/j.molimm.2007.06.151.
790. Minard-Colin, V., Xiu, Y., Poe, J.C., Horikawa, M., Magro, C.M., Hamaguchi, Y., Haas, K.M., and Tedder, T.F. (2008). Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood* 112, 1205–1213. 10.1182/blood-2008-01-135160.
791. Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J.A., Ravetch, J.V., Poe, J.C., Haas, K.M., and Tedder, T.F. (2004). The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 199, 1659–1669. 10.1084/jem.20040119.
792. Mellor, J.D., Brown, M.P., Irving, H.R., Zalberg, J.R., and Dobrovic, A. (2013). A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J Hematol Oncol* 6, 1. 10.1186/1756-8722-6-1.
793. Schuster, S.J., Venugopal, P., Kern, J.C., and McLaughlin, P. (2008). GM-CSF plus rituximab immunotherapy: translation of biologic mechanisms into therapy for indolent B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 49, 1681–1692. 10.1080/10428190802216731.
794. Leidi, M., Gotti, E., Bologna, L., Miranda, E., Rimoldi, M., Sica, A., Roncalli, M., Palumbo, G.A., Introna, M., and Golay, J. (2009). M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro. *J Immunol* 182, 4415–4422. 10.4049/jimmunol.0713732.
795. Herter, S., Herting, F., Mundigl, O., Waldhauer, I., Weinzierl, T., Fauti, T., Muth, G., Ziegler-Landesberger, D., Van Puijenbroek, E., Lang, S., et al. (2013). Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab in vitro and in xenograft models. *Mol Cancer Ther* 12, 2031–2042. 10.1158/1535-7163.MCT-12-1182.
796. Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., Püntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., et al. (2010). Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115, 4393–4402. 10.1182/blood-2009-06-225979.
797. Herter, S., Birk, M.C., Klein, C., Gerdes, C., Umana, P., and Bacac, M. (2014). Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity. *J Immunol* 192, 2252–2260. 10.4049/jimmunol.1301249.
798. van Bommel, P.E., He, Y., Schepel, I., Hendriks, M.A.J.M., Wiersma, V.R., van Ginkel, R.J., van Meerten, T., Ammatuna, E., Huls, G., Samplonius, D.F., et al. (2018). CD20-selective inhibition of CD47-SIRPα “don’t eat me” signaling with a bispecific antibody-derivative enhances the anticancer activity of daratumumab, alemtuzumab and obinutuzumab. *Oncoimmunology* 7, e1386361. 10.1080/2162402X.2017.1386361.
799. Cheadle, E.J., Lipowska-Bhalla, G., Dovedi, S.J., Fagnano, E., Klein, C., Honeychurch, J., and Illidge, T.M. (2017). A TLR7 agonist enhances the antitumor efficacy of obinutuzumab in murine lymphoma models via NK cells and CD4 T cells. *Leukemia* 31, 1611–1621. 10.1038/leu.2016.352.
800. Lossos, C., Liu, Y., Kolb, K.E., Christie, A.L., Scoyk, A.V., Prakadan, S.M., Shigemori, K., Stevenson, K.E., Morrow, S., Plana, O.D., et al. (2019). Mechanisms of Lymphoma Clearance Induced by High-Dose Alkylating Agents. *Cancer Discov* 9, 944–961. 10.1158/2159-8290.CD-18-1393.
801. Mantovani, A. (1977). In vitro and in vivo cytotoxicity of adriamycin and daunomycin for murine macrophages. *Cancer Res* 37, 815–820.
802. Mantovani, A., Polentarutti, N., Luini, W., Peri, G., and Spreafico, F. (1979). Role of Host Defense Mechanisms in the Antitumor Activity of Adriamycin and Daunomycin in Mice2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 63, 61–66. 10.1093/jnci/63.1.61.
803. Wong, J., Tran, L.T., Magun, E.A., Magun, B.E., and Wood, L.J. (2014). Production of IL-1β by bone marrow-derived macrophages in response to chemotherapeutic drugs: synergistic effects of doxorubicin and vincristine. *Cancer Biol Ther* 15, 1395–1403. 10.4161/cbt.29922.
804. Knoop, L., Haas, R., de Kemp, S., Majoor, D., Broeks, A., Eldering, E., de Boer, J.P., Verheij, M., van Ostrom, C., de Vries, A., et al. (2007). In vivo p53 response and immune reaction underlie highly effective low-dose radiotherapy in follicular lymphoma. *Blood* 110, 1116–1122. 10.1182/blood-2007-01-067579.
805. Busch, L., Mouggiakakos, D., Büttner-Herold, M., Müller, M.J., Volmer, D.A., Bach, C., Fabri, M., Bittenbring, J.T., Neumann, F., Boxhammer, R., et al. (2018). Lenalidomide enhances MOR202-dependent macrophage-mediated effector functions via the vitamin D pathway. *Leukemia* 32, 2445–2458. 10.1038/s41375-018-0114-0.
806. Wu, L., Adams, M., Carter, T., Chen, R., Muller, G., Stirling, D., Schafer, P., and Bartlett, J.B. (2008). lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res* 14, 4650–4657. 10.1158/1078-0432.CCR-07-4405.
807. Ping, L., Ding, N., Shi, Y., Feng, L., Li, J., Liu, Y., Lin, Y., Shi, C., Wang, X., Pan, Z., et al. (2017). The Bruton’s tyrosine kinase inhibitor ibrutinib exerts immunomodulatory effects through regulation of tumor-infiltrating macrophages. *Oncotarget* 8, 39218–39229. 10.18632/oncotarget.16836.

808. Stiff, A., Trikha, P., Wesolowski, R., Kendra, K., Hsu, V., Uppati, S., McMichael, E., Duggan, M., Campbell, A., Keller, K., et al. (2016). Myeloid-Derived Suppressor Cells Express Bruton's Tyrosine Kinase and Can Be Depleted in Tumor-Bearing Hosts by Ibrutinib Treatment. *Cancer Res.* 76, 2125–2136. 10.1158/0008-5472.CAN-15-1490.
809. Papin, A., Tessoulin, B., Bellanger, C., Moreau, A., Le Bris, Y., Maisonneuve, H., Moreau, P., Touzeau, C., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C., et al. (2019). CSF1R and BTK inhibitions as novel strategies to disrupt the dialog between mantle cell lymphoma and macrophages. *Leukemia* 33, 2442–2453. 10.1038/s41375-019-0463-3.
810. De Henau, O., Rausch, M., Winkler, D., Campesato, L.F., Liu, C., Cymerman, D.H., Budhu, S., Ghosh, A., Pink, M., Tchaicha, J., et al. (2016). Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3Ky in myeloid cells. *Nature* 539, 443–447. 10.1038/nature20554.
811. Horwitz, S.M., Koch, R., Porcu, P., Oki, Y., Moskowicz, A., Perez, M., Myskowski, P., Officer, A., Jaffe, J.D., Morrow, S.N., et al. (2018). Activity of the PI3K- δ,γ inhibitor duvelisib in a phase 1 trial and preclinical models of T-cell lymphoma. *Blood* 131, 888–898. 10.1182/blood-2017-08-802470.
812. Vogiatzi, F., Heymann, J., Müller, K., Winterberg, D., Drakul, A., Rösner, T., Lenk, L., Heib, M., Gehlert, C.L., Cario, G., et al. (2022). Venetoclax enhances the efficacy of therapeutic antibodies in B-cell malignancies by augmenting tumor cell phagocytosis. *Blood Adv*, bloodadvances.2022007364. 10.1182/bloodadvances.2022007364.
813. Abrisqueta, P., Sancho, J.-M., Cordoba, R., Persky, D.O., Andreadis, C., Huntington, S.F., Carpio, C., Morillo Giles, D., Wei, X., Li, Y.F., et al. (2019). Anti-CD47 Antibody, CC-90002, in Combination with Rituximab in Subjects with Relapsed and/or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma (R/R NHL). *Blood* 134, 4089. 10.1182/blood-2019-125310.
814. Ansell, S.M., Maris, M.B., Lesokhin, A.M., Chen, R.W., Flinn, I.W., Sawas, A., Minden, M.D., Villa, D., Percival, M.-E.M., Advani, A.S., et al. (2021). Phase I Study of the CD47 Blocker TTI-621 in Patients with Relapsed or Refractory Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* 27, 2190–2199. 10.1158/1078-0432.CCR-20-3706.
815. Giesen, C., Wang, H.A.O., Schapiro, D., Zivanovic, N., Jacobs, A., Hattendorf, B., Schöffler, P.J., Grolimund, D., Buhmann, J.M., Brandt, S., et al. (2014). Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat. Methods* 11, 417–422. 10.1038/nmeth.2869.
816. Li, Y., Cai, L., Wang, H., Wu, P., Gu, W., Chen, Y., Hao, H., Tang, K., Yi, P., Liu, M., et al. (2011). Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene* 30, 3887–3899. 10.1038/onc.2011.112.
817. Pujalis, D., Goetsch, J., Kottas, D.J., Gerke, V., and Rescher, U. (2011). Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling. *EMBO Mol Med* 3, 102–114. 10.1002/emmm.201000113.
818. Moraes, L.A., Kar, S., Foo, S.L., Gu, T., Toh, Y.Q., Ampomah, P.B., Sachaphibulkij, K., Yap, G., Zharkova, O., Lukman, H.M., et al. (2017). Annexin-A1 enhances breast cancer growth and migration by promoting alternative macrophage polarization in the tumour microenvironment. *Sci Rep* 7, 17925. 10.1038/s41598-017-17622-5.
819. McArthur, S., Juban, G., Gobbetti, T., Desgeorges, T., Theret, M., Gondin, J., Toller-Kawahisa, J.E., Reutelingsperger, C.P., Chazaud, B., Perretti, M., et al. (2020). Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *Journal of Clinical Investigation* 130, 1156–1167. 10.1172/JCI124635.

Annexes

Annexe 1 - Circulating Myeloid Regulatory Cells: Promising Biomarkers in B-Cell Lymphomas

Juliette Ferrant, Faustine Lhomme, Simon Le Gallou, Jonathan M. Irish, et Mikael Roussel, *Frontiers in Immunology*, 2021

Résumé : Il a été démontré que la lignée monocyte/macrophage est impliquée dans la promotion d'un microenvironnement protumoral et dans la résistance au traitement dans les lymphomes B. Ce compartiment est toutefois encore mal décrit à l'échelle de la cellule unique et les échantillons de tissus ne sont pas facilement accessibles. Une analyse détaillée des cellules myéloïdes circulantes dans les différents lymphomes B est donc nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes de résistance au traitement et identifier les patients à risque. Dans cette optique, nous faisons le point sur l'état de l'art de la description phénotypique et fonctionnelle des monocytes circulants dans les lymphomes B ; et nous proposons un premier aperçu de l'hétérogénéité de ces populations cellulaires en situation physiologique et dans le lymphome, en utilisant une approche par cytométrie de masse (CyTOF). En effet, le compartiment monocyttaire apparaît comme un continuum plutôt que constitué de sous-populations distinctes, comme le démontre notre approche à haute résolution, ce qui explique les conclusions parfois contradictoires sur l'impact pronostique des différentes populations, qui incluent monocytes et cellules myéloïdes régulatrices dérivées de monocytes (M-MDSC). En identifiant les cellules monocytaires exprimant fortement S100A9 comme un biomarqueur potentiel dans le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) dans cette étude preuve-de-concept incluant un nombre limité d'échantillons, nous soulignons le potentiel des cellules myéloïdes régulatrices circulantes comme biomarqueurs diagnostiques et pronostiques dans les lymphomes B.



Circulating Myeloid Regulatory Cells: Promising Biomarkers in B-Cell Lymphomas

Juliette Ferrant¹, Faustine Lhomme², Simon Le Gallou^{1,3}, Jonathan M. Irish^{4,5} and Mikael Roussel^{1,3*}

¹ UMR_S_1236, Univ Rennes, Inserm, Rennes, France, ² Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Service Hématologie, Rennes, France, ³ Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Laboratoire Hématologie, Pôle Biologie, Rennes, France, ⁴ Department of Cell and Developmental Biology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, United States, ⁵ Department of Pathology, Microbiology and Immunology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Martina Seiffert,
German Cancer Research Center
(DKFZ), Germany

Reviewed by:

Selcen Öztürk,
German Cancer Research Center
(DKFZ), Germany
Tiziana Schioppa,
University of Brescia, Italy

*Correspondence:

Mikael Roussel
mikael.roussel@chu-rennes.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Immunity and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 30 October 2020

Accepted: 14 December 2020

Published: 02 February 2021

Citation:

Ferrant J, Lhomme F, Le Gallou S,
Irish JM and Roussel M (2021)
Circulating Myeloid Regulatory
Cells: Promising Biomarkers
in B-Cell Lymphomas.
Front. Immunol. 11:623993.
doi: 10.3389/fimmu.2020.623993

The monocyte/macrophage lineage has been shown to be involved in the promotion of a protumoral tumor microenvironment and resistance to treatment in B cell lymphomas. However, it is still poorly described at the single cell level, and tissue samples are not easily accessible. Thus, a detailed analysis of the circulating myeloid cell compartment in the different B lymphomas is needed to better understand the mechanisms of resistance to treatment and identify at risk patients. In this Perspective, we review current knowledge on the phenotypic and functional description of the circulating monocytic lineage in B cell lymphomas and provide first insights into the heterogeneity of these cell populations in health and lymphoma, using mass cytometry. Indeed, the monocytic compartment is a continuum more than distinct subpopulations, as demonstrated by our high-resolution approach, explaining the sometimes confusing and contradictory conclusions on the prognostic impact of the different populations, including monocytes and monocytic myeloid derived suppressor cells (M-MDSC). By identifying S100A9^{high} monocytic cells as a potential biomarker in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) in this proof-of-concept preliminary study including a limited number of samples, we underline the potential of circulating myeloid regulatory cells as diagnostic and prognostic biomarkers in B-cell lymphomas.

Keywords: monocyte, myeloid-derived suppressor cells, lymphoma, biomarker, mass cytometry

INTRODUCTION

Lymphomas are malignancies that arise from the lymphoid system with an involvement of the B lineage in 90% of cases (1). The lymphoma nomenclature, based on clinical, pathological, genetic, and molecular description (2), is constantly evolving. Different subtypes are described, depending on the stage of maturation from which the tumoral B cell derives. Beside the first historically described Hodgkin lymphoma (HL), non-Hodgkin lymphomas (NHL) include essentially mantle cell lymphoma (MCL), follicular lymphoma (FL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), Burkitt lymphoma, and chronic lymphoid leukemia (CLL). As in many cancers, the importance of the tumor microenvironment (TME) in the development of the disease and response to treatment has

been emphasized in B-cell lymphoma, in particular, lymphomas can be defined by their dependence to the TME (1, 3–6). The TME is in particular composed of immune cells including T cell subsets (follicular helper T cells [T_{fh}], regulatory T cells [T_{reg}]), stromal cells, dendritic cells, and myeloid cells (monocytes, macrophages, myeloid derived suppressor cells [MDSC]) and is affected by the tumor localization (e.g. lymph node and bone marrow in FL or blood in CLL). The myeloid cell compartment has lately gained great interest and is extensively studied in several cancer types, including B lymphoma, due to its numerous key and ambivalent roles in pro-tumoral immune suppression, anti-tumor immunity, immunotherapy efficacy through antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP), or as a therapeutic target in immune-checkpoint blockade immunotherapy (1, 7). The monocyte/macrophage lineage has been shown to interact with tumoral and non-tumor B cells in lymphoma, and to be involved in the promotion of protumoral TME and resistance to treatment (8). However, the TME in lymphoma is heterogenous and still poorly described at the single cell level (9, 10). Moreover, there is currently an overall lack of biological material due to the popularity of the fine-needle aspiration for routine diagnosis. Thus, peripheral blood remains of interest for the analysis of immune cells and a fine knowledge of the circulating myeloid cell compartment in the different B lymphomas is needed to better understand the mechanisms of resistance to treatment and identify at risk patients. Herein, we propose to review current advances in the high-resolution description and functional role understanding of circulating monocytic lineage in B cell lymphomas and to discuss future perspectives.

Clinical Relevance of Circulating Myeloid Compartment in B Lymphoma Patients

Myeloid-cell related prognostic signatures have been demonstrated *in situ* in secondary lymphoid organs of DLBCL, FL, and HL by gene expression profiling studies (4–6), and several studies have shown an association between macrophage infiltration in lymphoma tissues and prognosis (5, 11–15), but the prognostic impact of myeloid cells in the blood is less clear in these pathologies. Nevertheless, soluble prognostic factors related to the biology of myeloid cells have been proposed to be of prognostic interest in these pathologies, including soluble PD-L1 (16, 17), soluble CD163 (18), CXCL10 (19), and IL-10 (19).

More recently, the circulating myeloid compartment, including in particular monocytes and MDSC, has been evaluated as prognostic biomarkers in B lymphoma. An increased monocyte count has been associated with poor prognosis in DLBCL (20–22), HL (23), MCL (24–26), and FL (27). A slightly different approach, with the lymphocyte/monocyte ratio, gives the same results in HL (23, 28, 29) and DLBCL (30). This could be linked to an increase in monocytic myeloid derived suppressor cells (M-MDSC), as it has been suggested in DLBCL (20, 31) and CLL, in which M-MDSC levels correlate with response to treatment (32–35). Concerning the granulocytic lineage, polymorphonuclear

MDSC (PMN-MDSC) have been proposed as a marker of poor prognosis in DLBCL (36), but other works did not find any association between PMN-MDSC and DLBCL prognosis (31, 37). In HL, the presence of a CD34^{pos} MDSC subtype in the blood has been associated with worsened prognosis (38).

Overall, there is ample evidence of the clinical relevance of the monocytic lineage, and in particular of circulating suppressor myeloid cells, in the prognosis of patients diagnosed with B lymphomas. However, the existence of conflicting data, largely due to inconsistent phenotype, highlights the need for an in-depth phenotypic study of these populations in order to better characterize them and evaluate their role in these pathologies.

Deciphering the Circulating Myeloid Regulatory Cell Phenotypes in B-cell Lymphomas

To fully understand the role of the monocytic lineage in the physiopathology of B-cell lymphomas, it is first necessary to clearly define these cell subsets. Unfortunately, this raises a pitfall in the different data available on the circulating myeloid compartment in B-cell lymphomas, indeed there is no consensus on the definition of M-MDSC and PMN-MDSC, and monocyte subsets are defined with a continuum of markers (CD14 and CD16). Nevertheless, some low-resolution phenotypical investigations have been performed on these cell subsets in B-cell lymphomas, using various and sometimes overlapping phenotypical definitions.

MDSC is a heterogeneous population of myeloid regulatory cells derived from polymorphonuclear cells (PMN-MDSC) and monocytes (M-MDSC) and defined by their immunosuppressive functions (39, 40). Their existence in inflammatory and cancerous diseases could reshape the TME or more distant sites. Since these cells were first described in mice and defined by their immunosuppressive functions, their identification and study in humans are challenging and discussed. In blood, PMN-MDSC (historically referred to as granulocytic MDSC [G-MDSC]) are classically identified as CD11b^{pos} CD14^{neg} CD15^{pos} or CD11b^{pos} CD14^{neg} CD66b^{pos}, and M-MDSCs as CD11b^{pos} CD14^{pos} HLA-DR^{neg/low} CD15^{neg}. It should be noted that these phenotypical definitions do not discriminate PMN-MDSC from normal neutrophils, as a consequence it is recommended to evaluate PMN-MDSC in the low density fraction after ficoll (39). Lin^{neg} HLA-DR^{neg} CD33^{pos} CD123^{neg} cells contain more immature progenitors named early-stage MDSC (e-MDSC) (39–41). Additional markers, including CD116, CD124, VEGF-R, CD11c, CD11b, PD-L1 are commonly used, and various phenotypes have been described in tumors (39, 40, 42).

In human B-cell lymphoma, various PMN-MDSC phenotypes were described. In particular, circulating Lin^{neg/low} HLA-DR^{neg} CD11b^{pos} CD33^{pos} cells were increased in HL, FL, DLBCL, and MCL, compared to healthy donors blood (31, 37, 38), whereas CD66b^{pos} CD33^{dim} HLA-DR^{neg} were more abundant in the blood of HL, and indolent or aggressive NHL B-cell lymphomas (36). Finally, immature MDSC defined as CD11b^{pos} CD33^{pos} CD14^{neg} CD34^{pos} HLA-DR^{neg} were more

abundant in HL compared to blood from healthy donors (38). M-MDSC phenotype is more consistent and CD14^{pos} HLA-DR^{low/neg} cells are accumulated in peripheral blood from FL, DLBCL, MCL, CLL, and HL when compared to healthy samples (20, 31–33, 43, 44). However, HLA-DR is expressed as a continuum and thus the M-MDSC identification remains subjective and will benefit from additional markers and high-resolution analysis.

Overall, comparing all these data is challenging due to the use of different and few phenotypic criteria to assess the myeloid compartment. To overcome these difficulties, high resolution tools, such as mass cytometry, could be of use to fully decipher at the phenotypic level these complex populations in tissue and in blood (45). Deep phenotyping of the circulating myeloid compartment in human blood in both healthy and B-cell lymphoma context is needed. Such data already exist for healthy donor blood, but have not been compared with blood samples obtained from lymphoma patients (9), and a clear landscape of blood mononuclear phagocytes in human health and B-cell lymphoma would allow relevant and reproducible functional experiments.

We propose here such analysis on blood monocytic cells from FL (n=3), DLBCL (n=5), and CLL patients (n=3), compared to healthy donors (n=3) (Table 1), using a previously described mass cytometry (CyTOF) panel dedicated to regulatory myeloid cell exploration (9, 46) (Figure 1). With one exception, all samples were obtained at diagnosis, before any treatment. Our analysis was performed on cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMC), thus allowing the exploration of monocytes and M-MDSC, but not PMN-MDSC. Using an unsupervised approach, we realized a dimension reduction followed by clustering, defining 8 monocytic clusters (Figure 1A). The tSNE representation shows all the CD14^{pos} myeloid cells compartment as a continuum, underlining the difficulty to clearly and consistently distinguish different subsets. Nevertheless, based on canonical markers expression, we can identify non-classical CD14^{dim} CD16^{pos} monocytes in cluster 1,

classical CD14^{pos} CD16^{neg} HLA-DR^{pos} monocytes in clusters 4, 6, and 8, and putative CD14^{pos} HLA-DR^{low} M-MDSC in clusters 2, 3, 5, and 7 (Figures 1A, B). Interestingly, the hierarchical clustering of all 8 clusters do not delineate these 3 clusters groups, emphasizing the importance of other less classical markers (Figure 1B). In particular, clusters 2, 3, and 4 display a strong expression of S100A9, a protein which is involved in MDSC metabolism (49). These three clusters are mainly found in DLBCL, the most aggressive disease of our panel, in which they represent up to more than 90% of the monocytic population (Figure 1B). Of note, the cells in cluster 4 highly express HLA-DR, and would usually be included in the classical monocytes subset, even though their phenotype and presence in DLBCL patients may indicate a regulatory M-MDSC-like function. If clusters 1, 5, and 6 are found in all sample types, half of the cells present in cluster 5 come from FL patients. This cluster exhibits an interesting CD14^{pos} HLA-DR^{low} CD36^{pos} S100A9^{high} M-MDSC like phenotype (Figure 1B). Surprisingly, the cells in cluster 6 display heterogenous and partly low levels of HLA-DR, even though they highly originate from healthy donors. This intriguing result emphasizes the need to not reduce M-MDSC evaluation to HLA-DR expression. Finally, an unsupervised clustering can hide some residual heterogeneity inside the clusters, and thus mask disparities between sample types in a given cluster. For example, the cluster 1 gathers all non-classical monocytes, but looking more precisely at their phenotype across the different sample types, we can see that the cells from DLBCL patients express less HLA-DR and CD36, or that FL cells express more CD32 (Figure 1C). Of course, this preliminary study requires further investigations with a larger number of samples to overcome the limitations due to inter-sample variability, as underlined by the peculiar profiles displayed by one of the HD and one of the CLL samples. It is also difficult to conclude from these findings what impact these phenotypic differences have on cell function, since, for example, the CD32 subtype, which could be an activator or inhibitor, is not known. Linking these phenotypes to cell functionality and pathogeny would therefore require further functional studies.

Altogether, these results suggest that circulating monocytic cells display diverse and sometimes specific phenotypes depending on the physiological or lymphomatous context, and that these phenotypes may be related to cell functionality and/or severity of the disease.

Assessing the Myeloid Cells Functional Roles in B-Cell Lymphomas

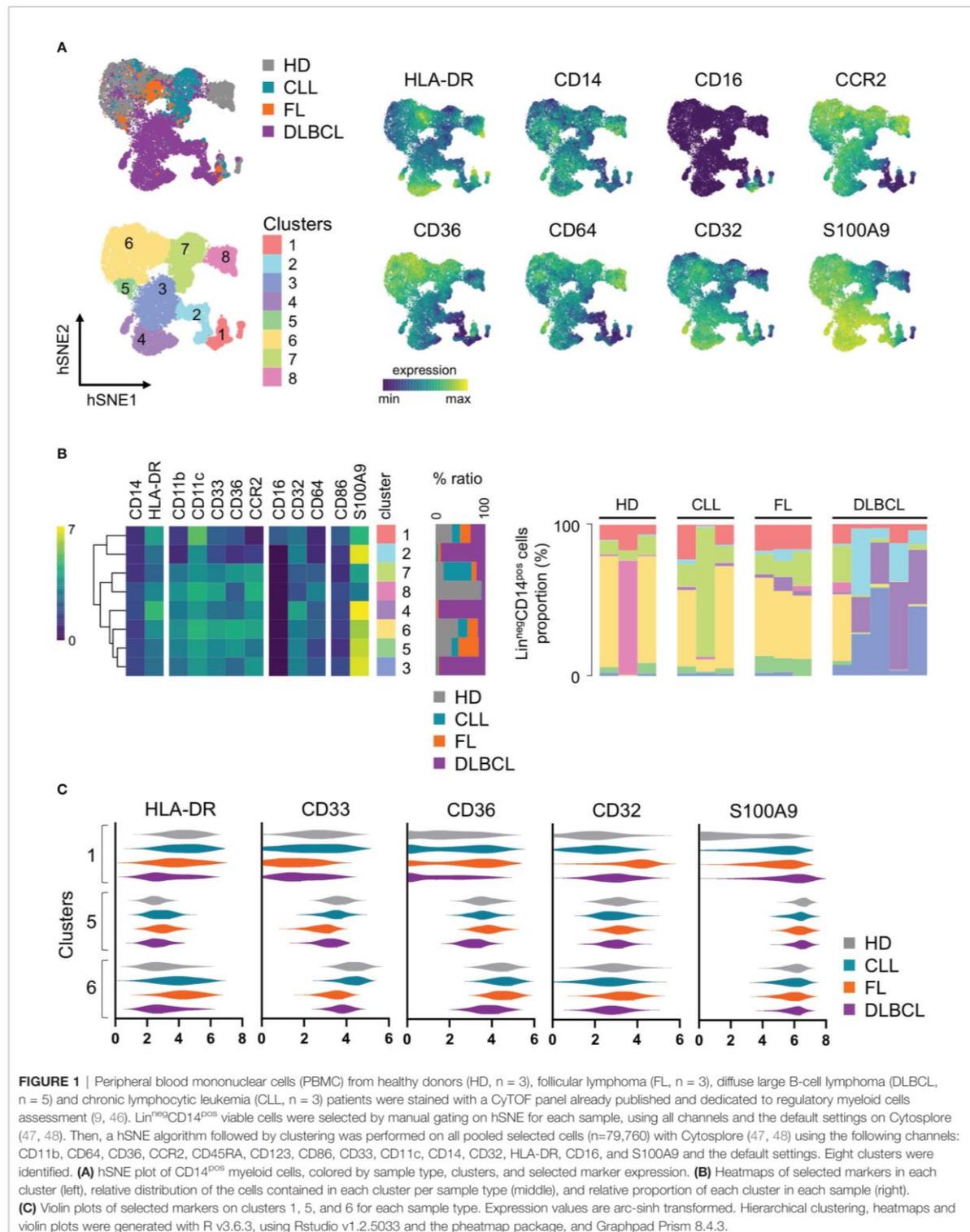
Even if their definition remains quite elusive, particularly at the phenotypic level, it is now clear that MDSC are important players in B-cell lymphoma pathogenesis. Since the characterization of MDSC, although challenging, is classically based on functional assays (39), we have data on their functional role in tumors, including lymphoma.

In cancer, induction and expansion of MDSC can be induced by factors produced by the tumour or the TME cells (T-cells, macrophages, stromal cells), such as VEGF, GM-CSF, M-CSF, S100A8/9, IL-4, IL-6, or IL-10 (49). MDSC could derive from

TABLE 1 | Patients' characteristics.

Disease/sample	Patient ID	Age at diagnosis (years)	Gender (Female/Male)	Cell of origin (DLBCL or grade (FL))
DLBCL	#1	76	F	ABC
	#2	66	M	GC
	#3	58	M	–
	#4	57	F	ABC
	#5	57	F	ABC
FL	#1	65	M	3a
	#2	80	F	1–2
	#3	76	F	1–2
CLL	#1	64	M	–
	#2	84	M	–
	#3	57	F	–
HD	#1	50	M	–
	#2	28	M	–
	#3	56	F	–

DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; ABC, activated B-cell; GC, germinal center; cHL, classical Hodgkin lymphoma; FL, follicular lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; HD, healthy donor.



myeloid progenitors from the bone marrow or the spleen, or arise from monocytes (M-MDSC) or activated mature or immature PMN (PMN-MDSC) (50), after the activation of genes implicated in myeloid differentiation blockade or immune regulation. The main signaling mechanism involved seems to be the phosphorylation of transcription factors known as signal transducer and activator of transcription (STAT) protein family members like STAT3, STAT6, STAT1, STAT5 (40, 51). The fate of these circulating myeloid cells is not completely elucidated. MDSC can differentiate into macrophages and DC (52, 53), especially under hypoxia (54). It has been demonstrated in murine models of solid tumors that MDSC can differentiate into TAM at the tumor site (51, 55–57). MDSC are defined by their immunosuppressive capabilities. They can impair effector T- and NK-cell functions and polarize macrophages into « M2 » phenotype *via* the expansion of regulatory T cells (Treg), amino acids depletion through arginase-1 (Arg1) and Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), ROS production through NOX2, expressions of immunoregulatory proteins PDL1, TGF β , IL-10, and S100A12 (42, 58, 59). The crosstalk between MDSC, macrophages, and DC could enhance the tumor-induced immune suppression (60). MDSC could induce a systemic immune suppression by affecting trafficking of T- and B-cells and reducing antigen response outside tumor sites (61).

Some of these immunosuppressive mechanisms have been demonstrated in B-cell lymphomas. The role of arginine metabolism has been demonstrated in lymphoma mice models (54, 62), where an upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and Arg1 is mediated in MDSC by hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1 α) (54). Another mechanism identified in mice in the upregulation of Arg1 in both PMN-MDSCs and M-MDSC is an increase in the microRNA miR-30a expression, which leads to a decrease in SOCS3 mRNA and the activation of the Janus kinase/STAT3 pathway (63). It has also been demonstrated that MDSC arising from the bone marrow are recruited to the tumor through blood circulation, and that tumor infiltrating M-MDSC mediate the recruitment of Treg in tumor-bearing mice *via* CCL4 and CCL5 production (64). High levels of ROS were also reported in PMN-MDSCs from the blood of this lymphoma murine model (64). The role of MDSC in IL-10 production is suggested by results in B-cell NHL patients and lymphoma murine models (65), but serum IL-10 could also be produced by lymphoma cells and contribute to an increased number of M-MDSC (66). In DLBCL patients, the release of IL-10, together with S100A12 and an increased PD-L1 expression, could explain the M-MDSC mediated T-cell immunosuppression (31). Accordingly, monocytes from NHL patients (including DLBCL, FL, MCL) induce less T-cell proliferation *in vitro* than HD monocytes, and the removal of these monocytes restore T cell functions (44). The role of arginine metabolism in the suppressive activity of MDSC from the blood of NHL patients is debated (31, 36, 44), as well as PMN-MDSC pathogeny. Even though no immunosuppressive effect of PMN-MDSC has been reported in a study including only DLBCL patients (31), another study including both HL and B-cell NHL patients showed that

in vitro depletion of lymphoma PMN-MDSC restored the proliferation of autologous T cells (36). This could be due to the different phenotypic definition of the cells studied, or to the pathologies included. In CLL, the efficacy of the depletion of monocytes to reduce tumorigenesis has been shown in mice models (67). CLL cells induce IDO^{high} MDSC *in vitro*, and CLL patients display an increase in M-MDSC, with suppressing T cell activity, *via* IDO and Treg expansion (33). Accordingly, monocytes from CLL patients inhibit T cell proliferation, an effect abrogated by anti-TGF β , anti-IL10 antibodies and IDO inhibitor, and support Treg expansion (68).

Overall, the sometimes conflicting results of the different works focusing on explaining the functional roles of myeloid cells in B-cell lymphomas highlight the need for a better and clearer definition of these different cells subsets.

DISCUSSION

Over the last few years, an increasing interest has been shown in the myeloid regulatory compartment in B cell lymphomas, and notably the circulating monocytic population. MDSC in particular were shown to be involved in disease prognosis and could have a pathogenic role. However, there is still no consensus on the phenotypic definition of the different circulating myeloid populations. Moreover, the monocytic compartment is more of a continuum than constituted of distinct subtypes, as highlighted by our results, resulting in sometimes contradictory conclusions on the prognostic impact of the different MDSC populations. We confirm here previous results, such as HLA-DR down regulation in B-cell lymphomas, and provide a first exhaustive phenotypic evaluation of the monocytic compartment in different B-cell lymphomas, identifying for example S100A9^{high} monocytic cells as a potential biomarker in DLBCL. This proof-of-concept preliminary study underlines the need to further assess the circulating myeloid compartment at the phenotypic level, on a larger panel of patients and possibly with more markers, to validate clinically relevant prognostic signatures.

The therapeutic management of lymphomas today largely relies on immunotherapy, including rituximab and immune checkpoint blockade. The efficacy of immunotherapy could be modulated by MDSC, as it has been shown in TAM, and their monitoring in the blood could help evaluate response to treatment. However, the characterization of MDSC is currently based on functional assays (39), preventing their monitoring in personalized medicine. Linking easily accessible and monitorable surface phenotypic markers to the functionality of these cells would help overcome this issue. A refined characterization through deep phenotyping of the myeloid compartment could also help identify potential new therapeutic targets (69) and study the immune response to treatment (70).

Altogether, the observations discussed in this article support the idea that circulating myeloid regulatory cells in B-cell lymphomas are promising diagnostic and prognostic biomarkers, and that a comprehensive phenotypic evaluation could serve as a surrogate biomarker of their pathological activity.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by IRB Rennes University Hospital. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JF analyzed data and wrote the manuscript; FL, SLG performed experiments; JMI analyzed data; MR designed and supervised research and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

- Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer* (2014) 14:517. doi: 10.1038/nrc3774
- 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. *Blood* (2016) 127:2375–90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569
- Amé-Thomas P, Tarte K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: Role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol* (2014) 24:23–32. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.001
- Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of Survival in Follicular Lymphoma Based on Molecular Features of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *N Engl J Med* (2004) 351:2159–69. doi: 10.1056/NEJMoa041869
- Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* (2008) 359:2313–23. doi: 10.1056/NEJMoa0802885
- Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* (2010) 362:875–85. doi: 10.1056/NEJMoa0905680
- Nicholas NS, Apollonio B, Ramsay AG. Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1863:471–82. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.003
- Pham LV, Pogue E, Ford RJ. The Role of Macrophage/B-Cell Interactions in the Pathophysiology of B-Cell Lymphomas. *Front Oncol* (2018) 8:147. doi: 10.3389/fonc.2018.00147
- Roussel M, Ferrell PB, Greenplate AR, Lhomme F, Gallou SL, Diggins KE, et al. Mass cytometry deep phenotyping of human mononuclear phagocytes and myeloid-derived suppressor cells from human blood and bone marrow. *J Leukoc Biol* (2017) 102:437–47. doi: 10.1189/jlb.5MA1116-457R
- Roussel M, Irish JM, Menard C, Lhomme F, Tarte K, Fest T. Regulatory myeloid cells: an underexplored continent in B-cell lymphomas. *Cancer Immunol Immunother* (2017) 66:1103–11. doi: 10.1007/s00262-017-2036-5
- Connors JM. Risk assessment in the management of newly diagnosed classical Hodgkin lymphoma. *Blood* (2015) 125:1693–702. doi: 10.1182/blood-2014-07-537480
- Keane C, Vari F, Hertzberg M, Cao K-AL, Green MR, Han E, et al. Ratios of T-cell immune effectors and checkpoint molecules as prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *Lancet Haematol* (2015) 2:e445–55. doi: 10.1016/S2352-3026(15)00150-7
- Marchesi F, Cirillo M, Bianchi A, Gately M, Olimpieri OM, Cerchiara E, et al. High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM)

FUNDING

This work was supported by a fellowship from the Nuovo-Soldati Foundation (Switzerland) [M.R.], from the FHU CAMIN (Federation Hospitalo-Universitaire Cancer Microenvironnement et Innovation) [J.F.], from the comité de la recherche clinique et translationnelle (CORECT), CHU of Rennes [F.L.], and from the association pour le développement de l'hématologie oncologie (ADHO) (F.L.).

ACKNOWLEDGMENT

We are indebted to the clinicians of the BREHAT network and to the French Blood Bank (EFS) of Rennes for providing samples. The authors acknowledge the Centre de Ressources Biologiques (CRB-santé) of Rennes (BB-0033-00056, <http://www.crb-sante-rennes.com>) for managing samples.

- at diagnosis is significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* (2015) 33:110–2. doi: 10.1002/hon.2142
- Riihijarvi S, Fiskvik I, Taskinen M, Vajavaara H, Tikkala M, Yri O, et al. Prognostic influence of macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a correlative study from a Nordic phase II trial. *Haematologica* (2015) 100:238–45. doi: 10.3324/haematol.2014.113472
 - Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* (2014) 25:2124–33. doi: 10.1093/annonc/mdu109
 - Rossille D, Gressier M, Damotte D, Maucort-Boulch D, Pangault C, Semana G, et al. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia* (2014) 28:2367–75. doi: 10.1038/leu.2014.137
 - Rossille D, Azzaoui I, Feldman AL, Maurer MJ, Labouré G, Parrens M, et al. Soluble programmed death-ligand 1 as a prognostic biomarker for overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a replication study and combined analysis of 508 patients. *Leukemia* (2017) 31:988–91. doi: 10.1038/leu.2016.385
 - Jones K, Vari F, Keane C, Crooks P, Nourse JP, Seymour LA, et al. Serum CD163 and TARC as disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2013) 19:731–42. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2693
 - Charbonneau B, Maurer MJ, Ansell SM, Slager SL, Fredericksen ZS, Ziesmer SC, et al. Pretreatment circulating serum cytokines associated with follicular and diffuse large B-cell lymphoma: a clinic-based case-control study. *Cytokine* (2012) 60:882–9. doi: 10.1016/j.cyto.2012.08.028
 - Tadmor T, Fell R, Polliack A, Attias D. Absolute monocytosis at diagnosis correlates with survival in diffuse large B-cell lymphoma-possible link with monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Hematol Oncol* (2013) 31:65–71. doi: 10.1002/hon.2019
 - Tadmor T, Bari A, Sacchi S, Marcheselli L, Liardo EV, Avivi I, et al. Monocyte count at diagnosis is a prognostic parameter in diffuse large B-cell lymphoma: results from a large multicenter study involving 1191 patients in the pre- and post-rituximab era. *Haematologica* (2014) 99:125–30. doi: 10.3324/haematol.2013.088161
 - Wu C, Wu X, Liu X, Yang P, Xu J, Chai Y, et al. Prognostic Significance of Monocytes and Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* (2016) 39:521–30. doi: 10.1159/000445644
 - Tadmor T, Bari A, Marcheselli L, Sacchi S, Aviv A, Baldini L, et al. Absolute Monocyte Count and Lymphocyte-Monocyte Ratio Predict Outcome in

- Nodular Sclerosis Hodgkin Lymphoma: Evaluation Based on Data From 1450 Patients. *Mayo Clin Proc* (2015) 90:756–64. doi: 10.1016/j.mayocp.2015.03.025
24. von Hohenstaufen KA, Conconi A, de Campos CP, Franceschetti S, Bertoni F, Margiotta Casaluci G, et al. Prognostic impact of monocyte count at presentation in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* (2013) 162:465–73. doi: 10.1111/bjh.12409
 25. Koh YW, Shin S-J, Park C, Yoon DH, Suh C, Huh J. Absolute monocyte count predicts overall survival in mantle cell lymphomas: correlation with tumour-associated macrophages. *Hematol Oncol* (2014) 32:178–86. doi: 10.1002/hon.2106
 26. Porrata LF, Ristow K, Markovic SN. Absolute monocyte count at diagnosis and survival in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* (2013) 163:545–7. doi: 10.1111/bjh.12531
 27. Wilcox RA, Ristow K, Habermann TM, Inwards DJ, Micallef INM, Johnston PB, et al. The absolute monocyte count is associated with overall survival in patients newly diagnosed with follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma* (2012) 53:575–80. doi: 10.3109/10428194.2011.637211
 28. Porrata LF, Ristow K, Colgan JP, Habermann TM, Witzig TE, Inwards DJ, et al. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at diagnosis and survival in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* (2012) 97:262–9. doi: 10.3324/haematol.2011.050138
 29. Wilcox RA, Ristow K, Habermann TM, Inwards DJ, Micallef INM, Johnston PB, et al. The absolute monocyte and lymphocyte prognostic score predicts survival and identifies high-risk patients in diffuse large-B-cell lymphoma. *Leukemia* (2011) 25:1502–9. doi: 10.1038/leu.2011.112
 30. Wang J, Gao K, Lei W, Dong L, Xuan Q, Feng M, et al. Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma: correlation with CD163 positive M2 type tumor-associated macrophages, not PD-1 positive tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncotarget* (2017) 8:5414–25. doi: 10.18632/oncotarget.14289
 31. Azzaoui I, Uhel F, Rossille D, Pangault C, Dulong J, Le Priol J, et al. T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood* (2016) 128:1081–92. doi: 10.1182/blood-2015-08-662783
 32. Gustafson MP, Abraham RS, Lin Y, Wu W, Gastineau DA, Zent CS, et al. Association of an increased frequency of CD14+ HLA-DR lo/neg monocytes with decreased time to progression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Br J Haematol* (2012) 156:674–6. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08902.x
 33. Jitschin R, Braun M, Büttner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood* (2014) 124:750–60. doi: 10.1182/blood-2013-12-546416
 34. Liu J, Zhou Y, Huang Q, Qiu L. CD14+HLA-DRlow/- expression: A novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett* (2015) 9:1167–72. doi: 10.3892/ol.2014.2808
 35. Zarobkiewicz M, Kowalska W, Chocholska S, Tomczak W, Szymańska A, Morawska I, et al. High M-MDSC Percentage as a Negative Prognostic Factor in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Cancers* (2020) 12:2614. doi: 10.3390/cancers12092614
 36. Marini O, Spina C, Mimiola E, Cassaro A, Malerba G, Todeschini G, et al. Identification of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in the peripheral blood of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients. *Oncotarget* (2016) 7:27676–88. doi: 10.18632/oncotarget.8507
 37. Amini R-M, Enblad G, Hollander P, Laszlo S, Eriksson E, Ayoola Gustafsson K, et al. Altered profile of immune regulatory cells in the peripheral blood of lymphoma patients. *BMC Cancer* (2019) 19:316. doi: 10.1186/s12885-019-5529-0
 38. Romano A, Parrinello NL, Vetro C, Forte S, Chiarenza A, Figuera A, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin Lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. *Br J Haematol* (2015) 168:689–700. doi: 10.1111/bjh.13198
 39. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* (2016) 7:12150. doi: 10.1038/ncomms12150
 40. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* (2017) 5:3–8. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0297
 41. Uhel F, Azzaoui I, Le Gallou S, Fest T, Tarte K, Roussel M. Early-stage myeloid-derived suppressor cell count: Basophil exclusion matters. *J Allergy Clin Immunol* (2019) 144:1125–7. doi: 10.1016/j.jaci.2019.06.027
 42. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res* (2015) 128:95–139. doi: 10.1016/bs.acr.2015.04.002
 43. Gustafson MP, Lin Y, Maas ML, Van Keulen VP, Johnston PB, Peikert T, et al. A method for identification and analysis of non-overlapping myeloid immunophenotypes in humans. *PLoS One* (2015) 10:e0121546. doi: 10.1371/journal.pone.0121546
 44. Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA, Gastineau DA, Witzig TE, Dietz AB. Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* (2011) 117:872–81. doi: 10.1182/blood-2010-05-283820
 45. Ferrant J, Le Gallou S, Manson G, Genebrier S, Mourcin F, Tarte K, Roussel M. High-Dimensional Phenotyping of Human Myeloid-Derived Suppressor Cells/Tumor-Associated Macrophages in Tissue by Mass Cytometry. *Methods Mol Biol* (2021) 2236:57–66. doi: 10.1007/978-1-0716-1060-2
 46. Roussel M, Lhomme F, Roe CE, Bartkowiak T, Gravelle P, Laurent C, et al. Mass cytometry defines distinct immune profile in germinal center B-cell lymphomas. *Cancer Immunol Immunother* (2020) 69:407–20. doi: 10.1007/s00262-019-02464-z
 47. Höllt T, Pezzotti N, van UV, Koning F, Eisemann E, Lelieveldt B, et al. Cytosplore: Interactive Immune Cell Phenotyping for Large Single-Cell Datasets. *Comput Graph Forum* (2016) 35:171–80. doi: 10.1111/cgf.12893
 48. van Unen V, Höllt T, Pezzotti N, Li N, Reinders MJT, Eisemann E, et al. Visual analysis of mass cytometry data by hierarchical stochastic neighbour embedding reveals rare cell types. *Nat Commun* (2017) 8:1740. doi: 10.1038/s41467-017-01689-9
 49. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* (2009) 9:162–74. doi: 10.1038/nri2506
 50. Bizymi N, Bjelica S, Kittang AO, Mojsilovic S, Velegriki M, Pontikoglou C, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hematologic Diseases: Promising Biomarkers and Treatment Targets. *HemaSphere* (2019) 3:e168. doi: 10.1097/HS9.0000000000000168
 51. Kumar V, Cheng P, Condamine T, Mony S, Languino LR, McCaffrey JC, et al. CD45 Phosphatase Inhibits STAT3 Transcription Factor Activity in Myeloid Cells and Promotes Tumor-Associated Macrophage Differentiation. *Immunity* (2016) 44:303–15. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.014
 52. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol* (2003) 74:186–96. doi: 10.1189/jlb.0103010
 53. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol Baltim Md 1950* (2005) 174:4880–91. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4880
 54. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn J-I, Cheng P, et al. HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* (2010) 207:2439–53. doi: 10.1084/jem.20100587
 55. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol* (2016) 37:208–20. doi: 10.1016/j.it.2016.01.004
 56. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* (2017) 14:399. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217
 57. Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, Bronte V. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* (2015) 125:3365–76. doi: 10.1172/JCI80006
 58. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* (2012) 12:253–68. doi: 10.1038/nri3175
 59. Nagaraj S, Schrum AG, Cho H-I, Celis E, Gabrilovich DI. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol Baltim Md 1950* (2010) 184:3106–16. doi: 10.4049/jimmunol.0902661
 60. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol* (2012) 22:275–81. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.01.011

61. Ku AW, Muhitch JB, Powers CA, Diehl M, Kim M, Fisher DT, et al. Tumor-induced MDSC act via remote control to inhibit L-selectin-dependent adaptive immunity in lymph nodes. *eLife* (2016) 5:e17375. doi: 10.7554/eLife.17375
62. Serafini P, Mgebhoff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* (2008) 68:5439–49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6621
63. Xu Z, Ji J, Xu J, Li D, Shi G, Liu F, et al. MiR-30a increases MDSC differentiation and immunosuppressive function by targeting SOCS3 in mice with B-cell lymphoma. *FEBS J* (2017) 284:2410–24. doi: 10.1111/febs.14133
64. Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol Baltim Md 1950* (2012) 189:5602–11. doi: 10.4049/jimmunol.1201018
65. Sato Y, Shimizu K, Shinga J, Hidaka M, Kawano F, Kakimi K, et al. Characterization of the myeloid-derived suppressor cell subset regulated by NK cells in malignant lymphoma. *Oncoimmunology* (2015) 4:e995541. doi: 10.1080/2162402X.2014.995541
66. Xiu B, Lin Y, Grote DM, Ziesmer SC, Gustafson MP, Maas ML, et al. IL-10 induces the development of immunosuppressive CD14(+)HLA-DR(low/-) monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J* (2015) 5:e328. doi: 10.1038/bcj.2015.56
67. Hanna BS, McClanahan F, Yazdanparast H, Zaborsky N, Kalter V, Rößner PM, et al. Depletion of CLL-associated patrolling monocytes and macrophages controls disease development and repairs immune dysfunction in vivo. *Leukemia* (2016) 30:570–9. doi: 10.1038/leu.2015.305
68. Giannoni P, Pietra G, Travaini G, Quarto R, Shyti G, Benelli R, et al. Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* (2014) 99:1078–87. doi: 10.3324/haematol.2013.091405
69. Engblom C, Pfirschke C, Pittet MJ. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer* (2016) 16:447–62. doi: 10.1038/nrc.2016.54
70. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir E -a. D, Krutzik PO, Finck R, et al. Single-Cell Mass Cytometry of Differential Immune and Drug Responses Across a Human Hematopoietic Continuum. *Science* (2011) 332:687–96. doi: 10.1126/science.1198704

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

Copyright © 2021 Ferrant, Lhomme, Le Gallou, Irish and Roussel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

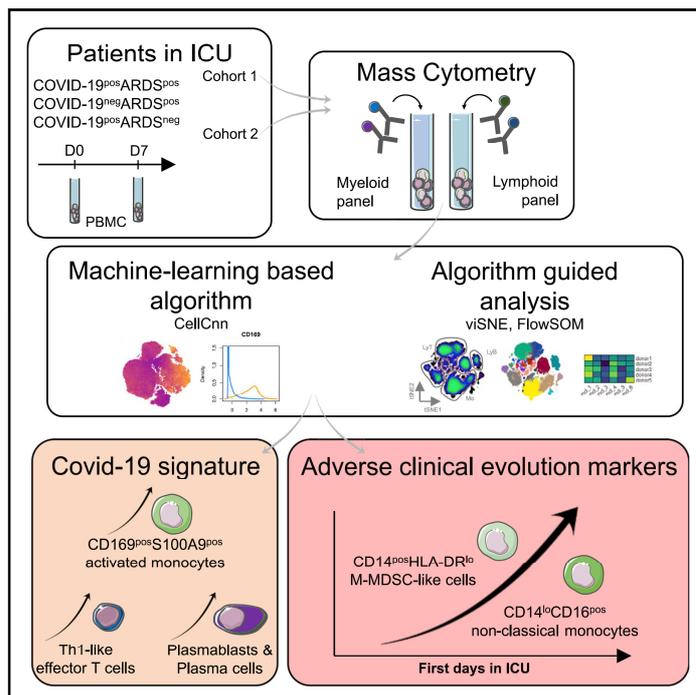
Annexe 2 - Comparative immune profiling of acute respiratory distress syndrome patients with or without SARS-CoV-2 infection

Mikael Roussel*, [Juliette Ferrant*](#), Florian Reizine, Simon Le Gallou, Joelle Dulong, Sarah Carl, Mathieu Lesouhaitier, Murielle Gregoire, Nadège Bescher, Clotilde Verdy, Maelle Latour, Isabelle Bézier, Marie Cornic, Angélique Vinit, Céline Monvoisin, Birgit Sawitzki, Simon Leonard, Stéphane Paul, Jean Feuillard, Robin Jeannet, Thomas Daix, Vijay K. Tiwari, Jean Marc Tadié, Michel Cogné#, et Karin Tarte#, *Cell Reports Medecine*, 2021

Résumé : Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est la principale complication de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), et nécessite une hospitalisation dans une unité de soins intensifs (USI). Malgré d'importants efforts d'immunophénotypage des patients COVID-19, on ignore encore dans quelle mesure le SDRA associé à la COVID-19 diffère des autres formes de SDRA. Pour répondre à cette question, nous avons constitué 3 cohortes de patients, classées en COVID-19-SDRA⁺, COVID-19⁺SDRA⁺, et COVID-19⁺SDRA⁻, et avons comparé leur profil immunitaire par cytométrie de masse. Une signature cellulaire associant des monocytes CD169⁺ exprimant S100A9/calprotectine, des plasmablastes, et des lymphocytes Th1 est retrouvée chez les patients COVID-19⁺SDRA⁺, mais pas chez les patients COVID-19-SDRA⁺. De plus, cette signature est globalement partagée avec les patients COVID-19⁺SDRA⁻, suggérant que les patients présentant une forme sévère de COVID-19, compliquée ou non de SDRA, présentent des profils immunitaires similaires. Nous mettons également en évidence une augmentation de monocytes CD14⁺HLA-DR^{lo} et CD14^{lo}CD16⁺, corrélée à la survenue d'évènements adverses au cours du séjour en USI. Nous démontrons donc que les patients atteints de SDRA associé à la COVID-19 présente un profil immunitaire spécifique et pourraient bénéficier de thérapies ciblées en association avec la prise en charge standard du SDRA.

Comparative immune profiling of acute respiratory distress syndrome patients with or without SARS-CoV-2 infection

Graphical abstract



Authors

Mikael Roussel, Juliette Ferrant, Florian Reizine, ..., Jean Marc Tadié, Michel Cogné, Karin Tarte

Correspondence

mikael.roussel@chu-rennes.fr (M.R.), karin.tarte@univ-rennes1.fr (K.T.)

In brief

Roussel et al. characterize the immune profile of COVID-19⁺ and COVID-19⁻ patients, both presenting an acute respiratory distress syndrome (ARDS) and COVID-19⁺ without ARDS. They identify a COVID-19 signature associating CD169⁺S100A9⁺ monocytes, plasmablasts, and Th1 cells. CD14⁺HLA-DR^{lo} and CD14^{lo}CD16⁺ monocytes increase during the ICU stay, correlating with an unfavorable clinical course.

Highlights

- Machine-learning analysis of CyTOF data segregates COVID-19⁺ and COVID-19⁻ ARDS
- CD169⁺S100A9⁺ monocytes differentiate COVID-19 ARDS from other ARDS
- Monocyte compartment alterations correlate with other immune subset modifications
- CD14⁺HLA-DR^{low} and CD14^{lo}CD16⁺ monocytes are markers of adverse COVID-19 evolution



Roussel et al., 2021, Cell Reports Medicine 2, 100291
June 15, 2021 © 2021 The Authors.
<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100291>

Article

Comparative immune profiling of acute respiratory distress syndrome patients with or without SARS-CoV-2 infection

Mikael Roussel,^{1,2,3,16,17,*} Juliette Ferrant,^{3,16} Florian Reizine,^{3,4} Simon Le Gallou,^{2,3} Joelle Dulong,^{2,3} Sarah Carl,⁵ Matheiu Lesouhaitier,^{3,4} Murielle Gregoire,^{2,3} Nadège Bescher,^{2,3} Clotilde Verdy,² Maelle Latour,^{2,3} Isabelle Bézier,^{2,3} Marie Cornic,^{2,3} Angélique Vinit,⁶ Céline Monvoisin,³ Birgit Sawitzki,⁷ Simon Leonard,¹ Stéphane Paul,⁸ Jean Feuillard,⁹ Robin Jeannet,^{9,10,11} Thomas Daix,^{11,12,13} Vijay K. Tiwari,^{5,14} Jean Marc Tadié,^{3,4} Michel Cogné,^{3,15,16} and Karin Tarte^{2,3,16,*}

¹Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Laboratoire Hématologie, Pôle Biologie, 35033 Rennes, France

²Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, SITI, Pôle Biologie, 35033 Rennes, France

³Institut national de la santé et de la recherche médicale, Unité Mixte de Recherche U1236, LabEx IGO, Université Rennes 1, Etablissement Français du Sang Bretagne, 35000 Rennes, France

⁴Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, 35033 Rennes, France

⁵Scailyte AG, 6210, Sursee, Switzerland

⁶Sorbonne Université, UMS037, PASS, Plateforme de Cytométrie de la Pitié-Salpêtrière CyPS, 75013 Paris, France

⁷Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Medizinische Immunologie, AG Molekulare Immunmodulation, 13353 Berlin, Germany

⁸Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Laboratoire Immunologie, 42000 Saint-Etienne, France

⁹Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Laboratoire Hématologie, 87000 Limoges, France

¹⁰Unité Mixte de Recherche CNRS 7276 INSERM 1262, 87000 Limoges, France

¹¹Centre d'Investigation Clinique INSERM 1435, 87000 Limoges, France

¹²Unité Mixte de Recherche INSERM 1092, 87000 Limoges, France

¹³Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Service de Réanimation Médicale, 87000 Limoges, France

¹⁴Wellcome-Wolfson Institute for Experimental Medicine, School of Medicine, Dentistry, and Biomedical Science, Queens University Belfast, BT9 7BL Belfast, UK

¹⁵Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Laboratoire Immunologie, Pôle Biologie, 35033 Rennes, France

¹⁶These authors contributed equally

¹⁷Lead contact

*Correspondence: mikael.roussel@chu-rennes.fr (M.R.), karin.tarte@univ-rennes1.fr (K.T.)

<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100291>

SUMMARY

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is the main complication of coronavirus disease 2019 (COVID-19), requiring admission to the intensive care unit (ICU). Despite extensive immune profiling of COVID-19 patients, to what extent COVID-19-associated ARDS differs from other causes of ARDS remains unknown. To address this question, here, we build 3 cohorts of patients categorized in COVID-19⁻ARDS⁺, COVID-19⁺ARDS⁺, and COVID-19⁺ARDS⁻, and compare, by high-dimensional mass cytometry, their immune landscape. A cell signature associating S100A9/calprotectin-producing CD169⁺ monocytes, plasmablasts, and Th1 cells is found in COVID-19⁺ARDS⁺, unlike COVID-19⁻ARDS⁺ patients. Moreover, this signature is essentially shared with COVID-19⁺ARDS⁻ patients, suggesting that severe COVID-19 patients, whether or not they experience ARDS, display similar immune profiles. We show an increase in CD14⁺HLA-DR^{low} and CD14^{low}CD16⁺ monocytes correlating to the occurrence of adverse events during the ICU stay. We demonstrate that COVID-19-associated ARDS displays a specific immune profile and may benefit from personalized therapy in addition to standard ARDS management.

INTRODUCTION

The severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) virus has rapidly affected >30 million people worldwide, requiring admission to intensive care units (ICUs) for >2 million patients.¹ Whereas most patients exhibit mild-to-moderate symptoms, acute respiratory distress syndrome (ARDS) is the major complication of coronavirus disease 2019 (COVID-19),^{2,3}

leading to prolonged ICU stays and a high frequency of secondary complications, notably cardiovascular events, thrombosis, pulmonary embolisms, and strokes.^{1,4} The immune system plays a dual role in COVID-19, contributing to both virus elimination and ARDS development.⁵ Excessive inflammatory response has been proposed as the leading cause of COVID-19-related clinical complications, thus supporting intensive efforts to better understand the specificities and mechanisms





of SARS-CoV-2-induced immune dysfunction.^{6,7} Moreover, even if therapies such as those provided by convalescent plasma or neutralizing antibodies at an early stage of the disease can lower the viral burden, this was demonstrated only in specific populations such as patients older than age 75,⁸ and no antiviral treatment has yet been able to definitively prevent the evolution of some patients toward deregulated inflammation and critical respiratory complications. The benefit of corticosteroids in severe COVID-19 for lowering overall mortality is now widely acknowledged.^{9,10} Conversely, steroid therapy was shown to be harmful in other ARDS etiologies, such as in influenza-associated ARDS,¹¹ suggesting specific biological features of COVID-19-related ARDS. A detailed understanding of the COVID-19-specific immune dysfunctions underlying ARDS development and severity is thus a high priority and will, it is hoped, help us to adopt a specific therapeutic strategy.

A number of high-resolution studies have recently concentrated on the determination of circulating markers that can distinguish severe from mild forms of COVID-19, providing a tremendous amount of data describing phenotypic and functional alterations in T cell, B cell, and myeloid cell subsets.^{12–25} In particular, CD14⁺HLA-DR^{low}, CD14⁺CD16⁺, and immature monocytes were demonstrated to be increased among peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from critically ill COVID-19 patients.^{15,21,23,26–29} Interestingly, the monocyte number is reduced in COVID-19 patients compared to influenza patients, suggesting specific myeloid dysregulation.³⁰ Various COVID-19-related alterations of lymphoid cells have also been described, including a T cell lymphopenia, predictive of patient outcome; a broad T cell activation, including T helper cell 1 (Th1), Th2, and Th17; an alteration of B cell and T cell repertoires; and a strong increase in plasmablasts, most prominently in COVID-19 ARDS patients.^{14,17,25,31–33} Importantly, COVID-19 ARDS immune profiling was performed using healthy donors as a control, thus precluding any conclusions on whether reported immune alterations could be related to COVID-19 and/or ARDS status. Answering this question has the potential to decipher whether ARDS induced by SARS-CoV-2 is mechanistically different from other ARDS etiologies.

To fill this gap, we performed a high-throughput mass cytometry approach on PBMCs obtained from 3 complementary series of 18 COVID-19[−]ARDS⁺, 18 COVID-19⁺ARDS⁺, and 20 COVID-19⁺ARDS[−] patients, including exploratory and validation cohorts. We report common myeloid cell alterations in all COVID-19 patients, which are absent from non-COVID-19 ARDS patients. This includes in particular a strong increase in an unusual population of activated monocytes showing the upregulated expression of CD169, associated with major COVID-19-specific alterations of T and B cell compartments.

RESULTS

Study population

Analyses were performed on cohort 1 of 63 cryopreserved PBMC samples isolated from 42 patients included in ICUs (n = 36) or infectious standard wards (n = 6). The demographic characteristics of patients included are provided in [Table 1](#) and [Table S1](#). All patients but 1 were classified as severe at admission,

requiring oxygen at a flow rate >2 L/min. ARDS was defined in accordance with international guidelines.³⁴ Patients were classified in 3 groups: COVID-19[−]ARDS⁺ (n = 12, ARDS stages: 1 mild, 4 moderate, 7 severe), COVID-19⁺ARDS⁺ (n = 13, ARDS stages: 8 moderate, 5 severe), and COVID-19⁺ARDS[−] (n = 17, including 11 from ICUs and 6 from infectious standard wards). In the COVID-19⁺ARDS[−], no statistical differences were noticed for immune cell abundance or phenotype between ICU and standard ward patients. Within the COVID-19[−]ARDS⁺ group, ARDS etiologies were bacterial pneumonia (n = 9), anti-synthetase syndrome (n = 1), and unknown (n = 2) ([Table S1](#)). For 21 patients, a second blood sample obtained on day 7 (D7) after enrollment was studied (n = 7 for COVID-19[−]ARDS⁺, n = 8 for COVID-19⁺ARDS⁺, and n = 6 for COVID-19⁺ARDS[−]). In addition, a validation cohort (cohort 2) was set up with 16 patients, with demographic data detailed in [Tables S1](#) and [S2](#). Patients were classified in 3 groups: COVID-19[−]ARDS⁺ (n = 6), COVID-19⁺ARDS⁺ (n = 5), and COVID-19⁺ARDS[−] (n = 3); additionally, COVID-19[−]ARDS[−] (n = 2) samples were included. None of our patients received corticosteroids at the time of the study nor immunomodulators. The presence of SARS-CoV-2 in respiratory specimens (nasal and pharyngeal swabs or sputum) was detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. To rule out undetected infections, negative RT-PCR samples were confirmed when possible by the absence of neutralizing antibodies. Neutralizing antibodies were undetectable for the 11 samples of the 18 COVID-19[−] patients for which material was available. In contrast, neutralizing antibodies were detected in 29 of 30 COVID-19⁺ tested. The timeline of the sample collection is shown in [Figure S1](#).

SARS-CoV-2 induces phenotypic changes in circulating immune cells

To decipher the impact of SARS-CoV-2 on circulating immune cells, we characterized PBMCs from COVID-19⁺ versus COVID-19[−] patients at admission using two separate mass cytometry panels exploring myeloid and lymphoid subsets, respectively ([Table S3](#); [Key resources table](#)). The full pipeline of analysis is depicted in [Figure S1](#). We performed an unbiased discovery approach with CellCnn, a neural network-based artificial intelligence algorithm allowing the analysis of single-cell data and detection of cells associated with clinical status.^{35–37} During training, CellCnn learns combinations of weights for each marker in a given panel that best discriminate between groups of patients. These weight combinations, called filters, can be used to highlight the specific profiles of cells associated with patient status. We identified the best-performing CellCnn filters for both the myeloid and the lymphoid panels, highlighting a population of cells significantly enriched in COVID-19⁺ patients as compared to COVID-19[−] patients (p < 0.0001 for both panels) ([Figure 1A](#)). Projecting these cells on t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) maps generated with either the myeloid or the lymphoid panels revealed that they fell into several distinct areas ([Figure 1B](#)). The cells selected by the CellCnn filter on the myeloid panel showed high expression for CD169, CD64, S100A9, CD11b, CD33, CD14, and CD36 compared to background, while the cells selected by the CellCnn filter on the lymphoid panel showed high expression for CD38 and CXCR3

Table 1. Patients' characteristics for cohort 1

	COVID-19 ⁻ ARDS ⁺	COVID-19 ⁺ ARDS ⁺	COVID-19 ⁺ ARDS ⁻
Patients D0/D7, n	12/7	13/8	17/6
Age, median (IQR)	62 (48.2–66.7)	59 (53.5–67.5)	55 (46–67)
Male, n (%)	7 (58)	10 (77)	12 (71)
ICU/clinical ward, n	12/0	13/0	11/6 ^a
SAPS II, median (IQR)	44.5 (29.2–59.2)	33 (19.5–39.5)	22 (13–28) ^d
Length of stay in ICU, median (IQR)	11.5 (4.5–18.7)	15 (11–54)	2 (1–2) ^b
Length of stay in hospital, median (IQR)	18 (7–30.5)	22 (15–62.5)	9 (7.5–13)
Comorbidities			
BMI, median (IQR)	26.4 (19.5–28.4)	28.6 (25–32)	28.1 (22.3–32.1)
Chronic cardiovascular disease, n (%)	1 (8.3)	3 (23)	1 (5.8)
Diabetes, n (%)	2 (16.7)	3 (23)	1 (5.8)
Chronic respiratory disease, n (%)	1 (8.3)	0 (0)	0 (0)
Chronic kidney disease, n (%)	0 (0)	2 (15.4)	0 (0)
Cancer, n (%)	3 (25)	0 (0)	0 (0)
Severity criteria			
Maximal O ₂ (L/min), median (IQR)	10 (7.5–15)	14 (9.2–15)	3 (2–5)
Invasive ventilation, n (%)	12 (100)	13 (100)	0 (0)
PaO ₂ /FiO ₂ , median (IQR)	116.5 (75.2–161.9)	106 (95.5–240)	313 (218.5–340.3)
Events occurring during follow-up			
Thromboembolic, n (%)	4 (33.3)	4 (30.8)	1 (5.8)
ICU-acquired infections, n (%)	2 (16.7)	7 (53.8)	0 (0)
Septic shock, n (%)	3 (25)	2 (15.4)	0 (0)
Renal failure, n (%)	5 (41.7)	8 (61.5)	0 (0)
Deaths, n (%)	4 (33.3)	1 (7.7)	0 (0)

IQR, interquartile range; SAPS II, simplified acute physiology score.

^aAll patients except 1 required O₂ at >2 L/min at admission.

^bFor patients in ICU.

(Figures 1B and S2). These results were replicated in cohort 2 (Figure S3) and confirmed on a public set of data by using the CellCnn analysis, showing high expression of CD14, CD36, CD64, and CD169 cells on COVID-19⁺ patients (Figure S4).¹⁵ As a whole, this broad and unbiased approach reproducibly showed that immune markers, in particular related to monocytes, segregated COVID-19⁻ and COVID-19⁺ patients.

SARS-CoV-2 induces CD169-expressing monocyte subsets

To investigate circulating monocyte heterogeneity and define consistent phenotypes, we used the FlowSOM algorithm. This approach led to the identification of 15 monocyte metaclusters from the myeloid panel (Figure 2A). In particular, Mo30, Mo11, and Mo28 metaclusters were defined by higher expression of CD16 and lower expression of CD14, CD36, and CD64, corresponding to a non-classical monocyte phenotype. Mo21 and Mo22 were defined by the high expression of S100A9 and the low expression of CD36. Finally, Mo243 and Mo180 strongly expressed S100A9, CD169, and CD36. To assess the phenotypic changes in monocytes during SARS-CoV-2 infection, we determined the frequencies of these metaclusters in each patient at admission and performed hierarchical clustering on these values

(Figure 2B). The upper branch of the hierarchical clustering included 20 COVID⁺ (10 ARDS⁻ and 10 ARDS⁺) patients and 1 COVID⁻ ARDS⁺ patient, whereas the lower branch included 10 COVID⁺ (7 ARDS⁻ and 3 ARDS⁺) and 11 COVID⁻ ARDS⁻ (chi-square test = 0.001) (Figure 2B). We then analyzed the abundance of individual metaclusters and identified only 4 of 15 metaclusters as differentially represented between the 3 groups of patients (Figures 2C and S2). In particular, within ARDS⁺ patients, Mo11 and M181 were less abundant in COVID-19⁺ patients ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), while Mo243 and Mo180 were more abundant ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) (Figure 2C). No differences were detected within COVID-19⁺ groups (ARDS⁺ versus ARDS⁻) (Figure 2C). Interestingly, Mo243 and Mo180 were present only in some COVID⁺ patients and also expressed CD169 (Figure 2B). Taken together, Mo243, Mo180, and Mo22 metaclusters were highly enriched in COVID-19⁺ patients when compared to COVID-19⁻ patients ($p < 0.0001$), with no difference regarding the ARDS status (Figure 2E). Accordingly, CD169 was differentially expressed in COVID-19⁺ versus COVID-19⁻ patients ($p < 0.001$) (Figure 2E). Our study including COVID-19 and non-COVID-19 critically ill patients suggests a

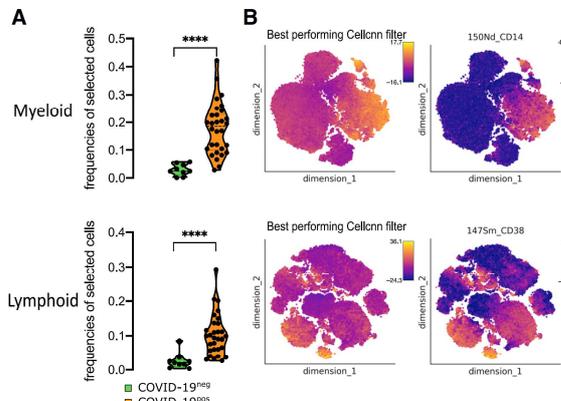


Figure 1. SARS-CoV-2 induces specific phenotype of circulating immune cells

CellCnn analysis performed on single cells from myeloid (top) and lymphoid (bottom) panels on 39 samples at admission (day 0) (COVID-19⁻ [n = 9] and COVID-19⁺ [n = 30])

(A) Frequencies of cells discovered by the best-performing CellCnn filter in COVID-19⁻ (blue) and COVID-19⁺ (orange) patients for each panel. Mann-Whitney tests, ****p < 0.0001.

(B) Cells defined by the best-performing CellCnn filters enrichment shown on tSNE and representative markers for each panel (CD14 and CD38 [see additional markers in Figure S2]).

specificity of CD169 expression in COVID-19 patients, and greatly extends previous single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data showing an expansion of CD169-expressing monocytes in COVID-19 patients compared to healthy donors (Figure 2F).^{15,25,38–40} We then performed the FlowSOM analysis on cohort 2 and validated the enrichment of Mo243 and Mo180 in COVID-19⁺ samples (Figures S3A and S3B), these metaclusters also presenting a trend for high CD169 expression (Figure S3C).

Monocyte metacluster enrichment in COVID-19 is correlated with a specific increase in effector memory T cells and plasma cells

To define a more global immune pattern and the relationship between immune cells in the context of the SARS-CoV-2 infection, we sought correlation between the frequencies of clusters of T, natural killer (NK), B, and plasma cells (n = 136 clusters from the lymphoid panel; Figure S1) and the 4 monocyte metaclusters (Mo11, Mo181, Mo243, and Mo180) previously described. This analysis identified 70 clusters with significantly correlated variations (p < 0.05) (Figure S2). To strengthen the relevance of these correlations, we restrained further analysis to the 29 strongest relationships (R > 0.5 or < -0.5 and p < 0.01) between Mo180 or Mo243 (the 2 metaclusters enriched in COVID-19 patients) and other immune cell subsets (Figure 3A; Table S4). As expected, Mo180 and Mo243 metaclusters were correlated (R = 0.93). Moreover, they were positively correlated with 18 clusters of T (n = 6), NK (n = 10), and plasma cells (n = 2), and inversely correlated with 11 clusters of T (n = 9) and NK cells (n = 2) (Figure 3A). Among positively correlated clusters, plasm_183 and plasm_198 similarly expressed CD38, CD44,

and CD27, whereas plasm_183 was high for Ki-67 and human leukocyte antigen-DR isotype (HLA-DR), corresponding to an early plasma cell phenotype (Figure 3B). NK cells were marked by CD7 and T-bet expression, NK_209 being CD8^{high}, and NK_241 and NK_197 displaying a Ki-67^{high} proliferating phenotype. The related T8_147 and T8_161 clusters exhibited a CD45RA^{high}CD45RO^{low}CCD7^{low}CD27^{low}Tbet^{high}CD38^{high} effector phenotype. Few T4 clusters were positively correlated with Mo180 and Mo243; among them, T4_106 displayed an effector memory proliferating phenotype (Ki-67^{high}CD45RA^{low}CCR7^{low}CD45RO^{high}CD27^{high} and CTLA4^{high}PD1^{high}). T4_25 was also marked by an effector memory phenotype (CD45RA^{low}CCR7^{low}CD45RO⁺) and displayed a CD27^{low}CD127⁺CCR6⁺CxCR3⁺CD161⁺Th17 profile (Figure 3B). Conversely, some T4 clusters were inversely correlated with Mo_180 and Mo_243—in particular clusters T4_6, T4_20, and T4_34—all three corresponding to naive cells (CD45RA^{high}CD45RO^{low}CCR7^{high}), and T4_59 expressing a Th2 phenotype (CCR4^{high}). We then compared the abundance of these 29 lymphoid clusters correlated with Mo180 and Mo243 and highlighted the 22 differentially represented lymphoid clusters between the 3 groups of patients (p < 0.05) (Figures 3C and S2). Only 7 clusters of CD4 T cells and 2 clusters of CD8 T cells were at lower abundance in COVID-19⁺ARDS⁺ patients compared to COVID-19⁻ARDS⁺ patients. As previously discussed, T4_6, T4_20, and T4_34 corresponded to naive cells, whereas within the effector memory cells, T4_7 and T4_45 were CD127^{low}, T4_24, T8_99, and T8_113 were CD127^{high} and T4_59 was CCR4^{high}. Conversely, 13 clusters were enriched in COVID-19⁺ARDS⁺ compared to COVID-19⁻ARDS⁺, including: (1) CTLA4^{high}PD1^{high} effector memory activated CD4 T cells (T4_106); (2) Tbet^{high} Th1-like CD8 effector phenotype (T8_146, T8_147, and T8_161); (3) cytotoxic mature CD16⁺CD56^{low}CD7⁺Tbet⁺CD127⁻ NK cells (NK_209, NK_241, NK_242, and NK_244), with proliferating Ki-67^{high} NK cells (NK_241); and (4) proliferating plasmablasts (plasm_183) and mature plasma cells (plasm_198) (Figures 3B and 3C). Of note, no cluster was differentially expressed between COVID-19⁺ARDS⁺ and COVID-19⁺ARDS⁻ groups (Figures 3C and S2). Then, to explore the whole immune profile and define relationships with groups of patients, we performed a correspondence analysis (CA) using, as a variable, the abundance of the myeloid (n = 4) and the lymphoid (n = 22) clusters differentially expressed between groups of patients (Figure 3D). CA was developed to analyze frequency tables and visualize similarities between patients and co-occurrence of cell subsets.⁴¹ The first and second dimensions of the CA explained 80.5% and 13.5% of the difference, respectively (Figure 3D). The top 10 cell populations accounting for the difference between COVID⁺ and COVID⁻ patients were Mo243, Mo180, T8_146, NK_244, and T8_161 being increased and Mo181, T4_6, Mo11, T8_99, and T4_45 being decreased in COVID⁺. These subsets corresponded to an increase in inflammatory monocytes (CD169^{high}CD64^{high}), Tbet^{high} Th1-like CD8 T cells, and mature NK cells and a decrease in naive T4 cells and effector memory T4 and T8 cells. Interestingly, only the first dimension of the CA segregated COVID-19⁺ARDS⁺ from COVID-19⁻ARDS⁺ (p < 0.001), and no statistical differences was found between COVID-19⁺ARDS⁺ and COVID-19⁺ARDS⁻ (Figure 3D).

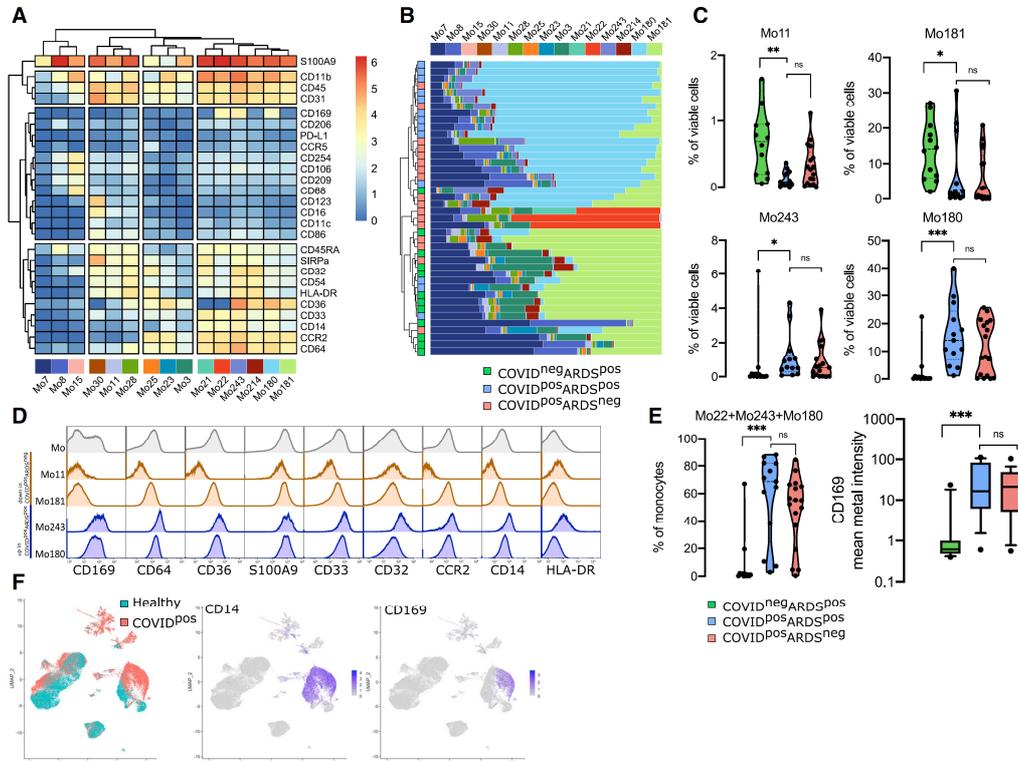


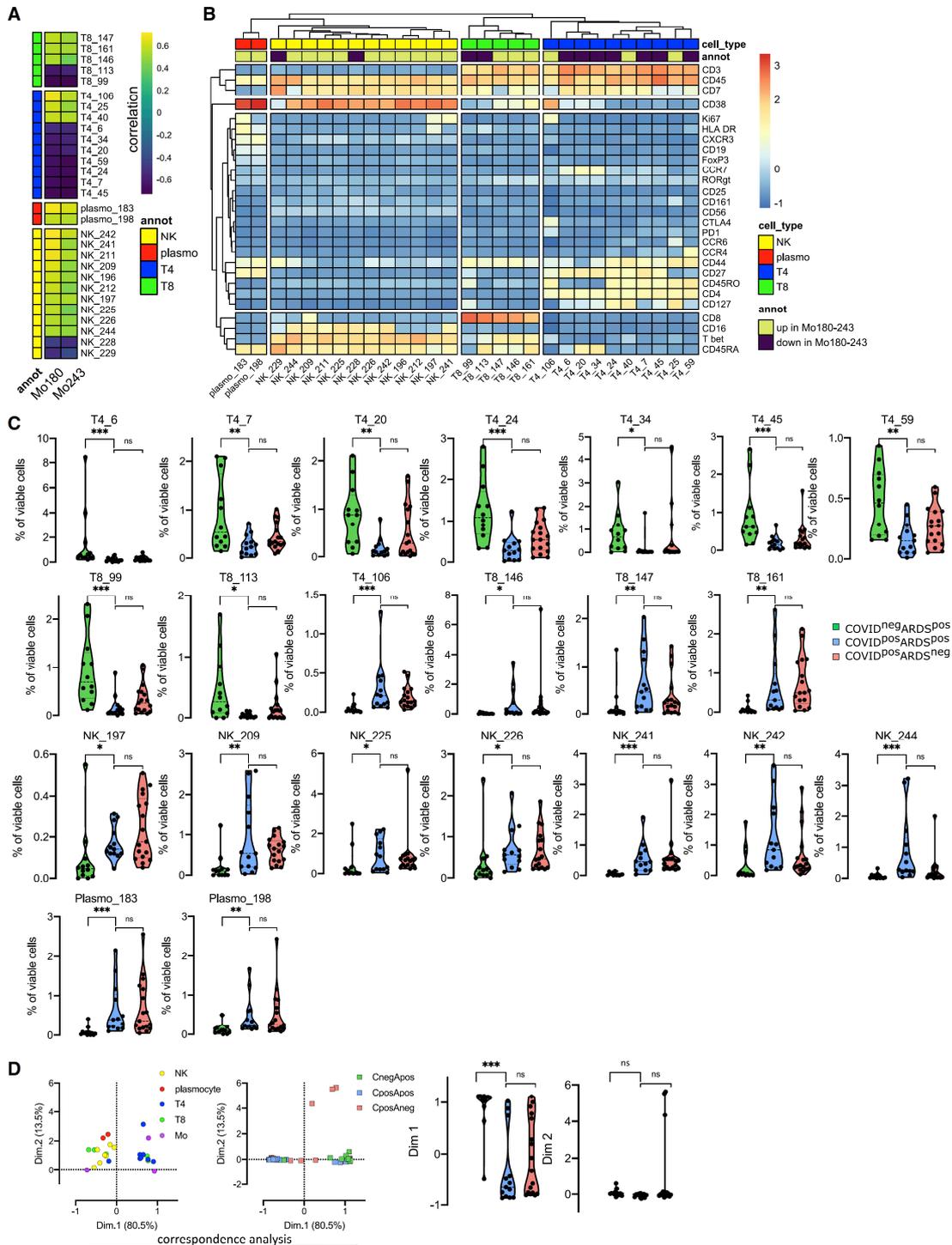
Figure 2. CD169 monocytes are enriched in SARS-CoV-2-infected patients

(A) Heatmap of the 15 monocyte metaclusters defined after FlowSOM analysis. (B) Relative abundance of metaclusters among monocytes for each patient and hierarchical clustering of COVID-19⁺ ARDS⁺ (n = 12, green), COVID-19⁺ ARDS⁻ (n = 13, blue), and COVID-19⁻ ARDS⁻ (n = 17, red). (C) Abundance of metaclusters differentially expressed between groups, among singlet cells analyzed. (D) Expression of the corresponding markers (mean metal intensity) for background (gray), Mo11 and Mo181 (orange), and Mo243 and Mo180 (blue) metaclusters. (E) Abundance of Mo22, Mo180, and Mo243 and expression of CD169 (box and whiskers with 10th and 90th percentiles). (F) Uniform manifold approximation and projection (UMAP) from scRNA-seq of COVID-19 patients (COVID-19) and healthy donors (healthy) highlighting CD14 and CD169 expression (data adapted from Wilk et al.²⁵). Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison correction, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Evolution of immune cell clusters between D0 and D7 in COVID-19 patients defines high-risk clinical grade

We performed mass cytometry analysis for 21 patients at D7 of hospitalization, including 7 COVID-19⁻ ARDS⁺, 8 COVID-19⁺ ARDS⁺, and 6 COVID-19⁻ ARDS⁻ patients, to follow up the kinetics of PBMC phenotypic alterations. The 42 samples (21 at D0 and 21 at D7) were parsed by CA using, as a variable, the abundance of myeloid and lymphoid clusters (Figure 4A). The first and second dimensions of the CA explained 85.1% and 9% of the differences acquired between D0 and D7. The first dimension captured the difference between D0 and D7 only for COVID-19⁺ ARDS⁺ (p < 0.01) (Figure 4A). Because of the limited number of samples, only a trend was observed for COVID-19⁺ ARDS⁻ (p = 0.062). The top 5 enriched populations accounting for the differences between D0 and D7 for COVID-19⁺ ARDS⁺ patients were Mo11, Mo181, T8_113, T4_34, and NK_197, corresponding to an enrichment in non-classical monocytes (CD14^{low}CD16^{high}CD64^{low}CD36^{low}S100A9^{high}), in monocyte

myeloid-derived suppressor cell (M-MDSC)-like (HLA-DR^{low} S100A9^{high}), in effector memory CD127^{high} T8 cells, in T4 naive cells, and in Ki-67^{high} proliferating NK cells. These 5 cell subsets were integrated in an immune score combining their fold change between D0 and D7. To define the relevance of this immune score in discriminating COVID-19 patients with unfavorable prognosis, we built a clinical score as the sum of events occurring during ICU stay (thromboembolic, ICU-acquired infection, septic shock, renal failure, and death) (Table 1). Interestingly, both the clinical and the immune scores were found to be correlated in severe COVID-19 patients, irrespectively of their ARDS status (Spearman R = 0.71; p = 0.006) (Figure 4B). Finally, we analyzed changes between D0 and D7 of genes involved in the interferon (IFN) pathway. We found an upregulation of *IFNAR1* (interferon alpha and beta receptor subunit 1 gene) and *IFNAR2* during time in COVID-19⁺ ARDS⁺ (Figure S5A). Conversely, the evolution of IFN type I target genes (*ISG15*, *IFI27*, *IFI44L*, *RSAD2*, and *IFIT1*) revealed a specific downregulation in COVID-19⁺ ARDS⁺



(legend on next page)

samples. Interestingly, both IFNAR score and type I IFN score, obtained by combining the expression of IFN receptors and targets, respectively, presented a trend of correlation with the immune score (Figure S5B), and the type I IFN score was significantly correlated with the CD169 expression (Figure S5C).

DISCUSSION

Immune response to COVID-19 infection has been recently intensively studied at both transcriptomic and proteomic levels. However, most studies focused on either the lymphoid^{19,22,24} or the myeloid compartments,^{12,21,23} and only a few performed a wide analysis of the circulating immune landscape,^{13,16,25,42,43} thus precluding the definition of complex patterns of immune parameter alterations associated with COVID-19 severity or physiopathology. Moreover, these studies were designed to identify differences in immune cell subset frequencies between COVID-19 patients and healthy donors, and eventually correlated with the severity of the disease, but did not include severe non-COVID-19 patients as controls, although critically ill patients were previously largely demonstrated to display immune reprogramming.⁴⁴ ARDS is a major adverse event occurring during ICU stay, leading to an overall mortality rate of 40% to 60%. Whether COVID-19-associated ARDS is clinically and biologically similar to other causes of ARDS remains controversial.^{45,46} To address this point, we characterized for the first time, by mass cytometry, the immune landscape in COVID-19-associated ARDS compared to other causes of ARDS. We demonstrated that an increase in CD169^{pos} monocytes, correlated with specific changes of T, plasma, and NK cell subsets, defines COVID-19-associated ARDS and is not found in bacteria-associated ARDS, suggesting a COVID-19-specific immune reprogramming.

The amplification of CD169⁺ circulating monocytes has already been highlighted in the context of COVID-19,^{15,23,38,47} and is reminiscent of other inflammatory conditions found in viral infections, such as with human immunodeficiency virus or Epstein-Barr virus, in which the CD169 sialoadhesin is induced in an IFN-dependent manner on the surface of circulating monocytes.^{48,49} Consistent with the inflammatory response, we showed that the accumulation of CD169^{pos} monocytes in COVID-19⁺ patients is positively correlated with an increase in plasmablasts and mature plasma cells, Th1-like CD8 effector T cells, cytotoxic mature NK cells, and activated CD4 effector memory T cells displaying a CTLA4^{high}PD1^{high} phenotype. CD169⁺ activated monocytes were detected in mild disease²³ and were proposed to rise rapidly and transiently in patients

with COVID-19, in association with a high expression of IFN- γ and CCL8.¹⁵ This could be due to the transient nature of this monocytic population, either losing CD169, being short-lived, or being recruited into tissues as CD169⁺ macrophages, as suggested by the high expression of CCR2 on Mo243 and Mo180, the 2 monocyte subsets identified here in COVID-19 patients, and the local inflammation and lung tissue destruction mediated by monocyte-derived macrophages in severe cases of SARS-CoV-2 infections.^{50,51} Interestingly, we also found an upregulation of cytoplasmic S100A9 in monocyte subsets specifically amplified in COVID-19 patients irrespective of their ARDS status. These data suggest that, in the early stage of the disease, monocytes could contribute to the burst of circulating calprotectin (S100A8/S100A9), recently proposed to contribute to the secondary cytokine release syndrome described in severe COVID-19 and attributed to neutrophils.²¹ Despite phenotypic alterations, our data revealed a specific alteration of the response to type I IFN in COVID-19⁺ versus COVID-19⁻ ARDS patients after a short stay in the ICU, with an upregulation of IFN receptors without induction of IFN target genes. These results are reminiscent of the demonstration that deficiency of the type I IFN pathway is associated with poor outcomes in COVID-19 patients.^{52,53}

Whereas a seroconversion score was recently associated with huge modifications in immune parameters reflecting B, T, and NK cell function in non-ICU COVID patients,⁵⁴ our ICU patients clearly stand at a later stage of the disease, with 22 of 29 already carrying neutralizing antibodies at D0. It is thus highly unlikely that the differential evolution of monocytic markers identified between D0 and D7 in our study could be attributable to seroconversion.

Within severe COVID-19 patients, we detected no significant differences between ARDS⁺ and ARDS⁻ immune profiles, indicating a specificity of the phenotype induced by SARS-CoV-2 infection, irrespective of the respiratory complications. While most published studies showed differences between mild and severe COVID-19 diseases, some of their conclusions may be obscured by the fact that ARDS by itself, mechanical ventilation, and/or nonspecific treatments may affect immune parameters.⁵⁵ A strength of our study comparing 2 groups of severe COVID-19 patients with or without ARDS is to highlight features directly related to the viral infection rather than to its respiratory complications or their treatment. Importantly, our cohort was homogeneous regarding treatment, with, in particular, no immunosuppressive therapy at the time of sampling.

The small size of our cohort did not allow us to pinpoint a mortality prognostic factor based on our phenotypic data. However, we identified a specific immune pattern associated with the

Figure 3. Monocyte metaclusters enriched in COVID-19 are correlated with effector memory T cells and plasma cells

(A) Correlation between Mo180 and Mo243 and lymphoid clusters (see heatmap for all lymphoid clusters and markers in Figure S2) from all patients at D0 (COVID-19⁻ ARDS⁺ [n = 12], COVID-19⁺ ARDS⁺ [n = 13], and COVID-19⁺ ARDS⁻ [n = 17]). Only strong correlations (Spearman R > 0.5 or R < -0.5 and p < 0.01) are shown (see all significant correlations [p < 0.05] in Figure S2 and Table S4).

(B) Heatmap showing marker expression for the lymphoid clusters (Spearman R > 0.5 or R < -0.5 and p < 0.001) strongly correlated with Mo180 and Mo243 (see heatmap for all clusters and markers in Figure S2).

(C) Abundance of lymphoid clusters differentially expressed between groups, among singlet cells analyzed. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison correction, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 [see all clusters in Figure S2].

(D) Two first dimensions of correspondence analysis accounting for 84% of the association between immune clusters differentially expressed between groups (n = 4 monocyte and n = 22 lymphoid clusters), and patients. For clarity, patients and immune cells are shown on 2 different plots. Dimensions 1 and 2 coordinates are compared between groups of patients. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison correction, ****p < 0.0001.

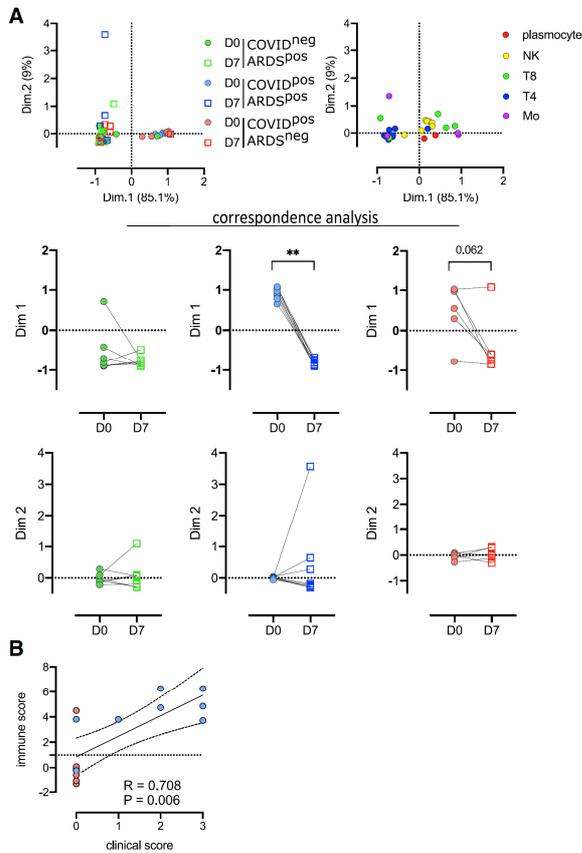


Figure 4. Evolution of immune cell subsets between D0 and D7, defines high-risk clinical grade COVID-19 patients

(A) Two first dimensions of correspondence analysis accounting for 94.1% of the association between immune clusters differentially expressed between groups ($n = 4$ monocyte and $n = 22$ lymphoid clusters) and patients for which a follow-up of 7 days was available (COVID-19⁺ARDS⁺ [$n = 7$], COVID-19⁺ARDS⁻ [$n = 8$], and COVID-19⁻ARDS⁻ [$n = 6$]). For clarity, patients and immune cells are shown on 2 different plots. Dimensions 1 and 2 coordinates were compared between D0 and D7 for each group of patients. Wilcoxon matched-pairs signed rank tests, ** $p < 0.01$.

(B) Spearman correlation between immune and clinical score for COVID-19⁺ patients (ARDS⁺ [$n = 8$] and ARDS⁻ [$n = 6$]).

occurrence of the major adverse clinical events (thrombosis, nosocomial infection, septic shock, acute renal failure, and death) described in COVID-19 and combined as a clinical score. In particular, an increase in non-classical CD14^{low}CD16⁺ monocytes (Mo11), and CD14⁺HLA-DR^{low} M-MDSC-like (Mo181), both not expressing CD169, are markers of adverse events. This suggests that besides the early increase in CD169⁺ monocytes in all COVID-19 patients associated with T cell dysfunctions, the immunological response to SARS-CoV-2 infection features multiple alterations of monocytic subsets reflecting the severity of the disease. Consistent with these data, it was shown that CD14⁺HLA-DR^{low} cells were increased in critical COVID-19 patients,^{21,26,56–58} while CD14^{low}CD16⁺ monocytes, able to

migrate to the lung, were correlated with the length of stay in the ICU.^{15,23,59} Our study correlates the accumulation of non-classical monocytes and M-MDSCs occurring during the first days of ICU to adverse events.

Limitations of study

Besides the low number of included patients, our study has other limitations. By focusing on severe patients with and without ARDS, we cannot reach conclusions about phenotypic changes in mild and moderate diseases. The analysis would also benefit from comparison with other virus-associated ARDS. We thus analyzed a published dataset of flu-like illness and COVID patients, analyzed by mass cytometry.²¹ Interestingly, by using CellCnn, we were able to define a filter that accurately discriminates flu-like illness from COVID samples, suggesting immune differences between both diseases (Figure S4). Moreover, since the mass cytometry was conducted on PBMCs, we lack information on the neutrophil lineage, which appears affected in COVID-19 disease.²¹ It would also be interesting to link these data with *in situ* data from lung tissue samples and bronchoalveolar lavages. Unfortunately, at the time of the study, bronchoalveolar fluid collection was not allowed in our institution for patients who were positive for SARS-CoV-2. However, our detailed analysis of circulating immune cells shows that immune monitoring of severe COVID-19 patients brings interesting prognostic biomarkers independent of their clinical classification in ARDS⁺ versus ARDS⁻. Moreover, we demonstrated that at the biological level, COVID-19-associated ARDS is different from other causes of ARDS, and may benefit from personalized therapy in addition to standard ARDS management.^{23,60}

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Patients
- METHOD DETAILS
 - Mass cytometry analysis
 - Antibodies and reagents
 - Quantitative real-time polymerase chain reaction
 - Detection of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
 - Mass cytometry preprocessing
 - CellCnn analysis
 - viSNE, FlowSOM, and hierarchical clustering
 - Statistical analysis

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100291>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all of the donors, families, and surrogates, as well as the medical personnel in charge of patient care. We thank Catherine Blanc and Aurelien Corneau, from the CyPS core facility at Sorbonne University, Paris, for access to the Helios mass cytometer. This work was supported by the University Hospital of Rennes, CFTR2 (COVID-19 Fast Track Recherche Rennes) grant (to F.R.) and by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR), Flash Covid-19 joint grant (HARMONICOV to M. Cogné).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, M.R., F.R., M. Lesouhaitier, J.M.T., M. Cogné, and K.T.; methodology, M.R., S.L.G., J.D., and K.T.; formal analysis, M.R., J. Ferrant, S.L., and S.C.; investigation, S.L.G., J.D., C.M., M.G., N.B., C.V., M. Latour, I.B., and M. Cornic; resources, F.R., M. Lesouhaitier, B.S., S.P., J. Feuillard, R.J., T.D., V.K.T., and J.M.T.; data curation, M.R., J. Ferrant, and F.R.; Writing - original draft preparation, M.R. and J. Ferrant; Writing - review & editing, M.R., J. Ferrant, S.L.G., S.C., V.K.T., J.M.T., M. Cogné, and K.T.; visualization, M.R. and J. Ferrant; supervision, M.R. and K.T.; project administration, M.R. and K.T.; funding acquisition, F.R. and M. Cogné.

DECLARATION OF INTERESTS

J. Ferrant, F.R., S.L.G., J.D., M. Lesouhaitier, M.G., N.B., C.V., M. Latour, I.B., M. Cornic, A.V., C.M., B.S., S.L., S.P., J. Feuillard, R.J., T.D., and M. Cogné declare no competing interests. M.R., S.C., V.K.T., J.M.T., and K.T. are the inventors of a patent, EP 20305642.9, "A method for early detection of propensity to severe clinical manifestations methods" submitted June 11, 2020 under University Hospital of Rennes and Scalyte AG names.

Received: December 3, 2020

Revised: March 14, 2021

Accepted: April 29, 2021

Published: May 6, 2021

REFERENCES

- Williamson, E.J., Walker, A.J., Bhaskaran, K., Bacon, S., Bates, C., Morton, C.E., Curtis, H.J., Mehrkar, A., Evans, D., Inglesby, P., et al. (2020). Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* 584, 430–436.
- Guan, W.-J., Ni, Z.-Y., Hu, Y., Liang, W.-H., Ou, C.-Q., He, J.-X., Liu, L., Shan, H., Lei, C.L., Hui, D.S.C., et al.; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19 (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 382, 1708–1720.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506.
- Helms, J., Tacquard, C., Severac, F., Leonard-Lorant, I., Ohana, M., Delabranche, X., Merdji, H., Clere-Jehl, R., Schenck, M., Fagot Gandet, F., et al. (2020). High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intens. Care Med.* 46, 1089–1098.
- Schultze, J.L., and Aschenbrenner, A.C. (2021). COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* 184, 1671–1692.
- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., et al. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Invest.* 130, 2620–2629.
- Jeannot, R., Daix, T., Formento, R., Feuillard, J., and François, B. (2020). Severe COVID-19 is associated with deep and sustained multifaceted cellular immunosuppression. *Intensive Care Med.* 46, 1769–1771.
- Libster, R., Pérez Marc, G., Wappner, D., Coviello, S., Bianchi, A., Braem, V., Esteban, I., Caballero, M.T., Wood, C., Berrueta, M., et al.; Fundación INFANT-COVID-19 Group (2021). Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults. *N. Engl. J. Med.* 384, 610–618.
- Arabi, Y.M., Murthy, S., and Webb, S. (2020). COVID-19: a novel coronavirus and a novel challenge for critical care. *Intensive Care Med.* 46, 833–836.
- van Paassen, J., Vos, J.S., Hoekstra, E.M., Neumann, K.M.I., Boot, P.C., and Arbous, S.M. (2020). Corticosteroid use in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis on clinical outcomes. *Crit. Care* 24, 696.
- Ni, Y.N., Chen, G., Sun, J., Liang, B.M., and Liang, Z.A. (2019). The effect of corticosteroids on mortality of patients with influenza pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Crit. Care* 23, 99.
- Agrati, C., Sacchi, A., Bordini, V., Cimini, E., Notari, S., Grassi, G., Casetti, R., Tartaglia, E., Lalle, E., D'Abramo, A., et al. (2020). Expansion of myeloid-derived suppressor cells in patients with severe coronavirus disease (COVID-19). *Cell Death Differ.* 27, 3196–3207.
- Arunachalam, P.S., Wimmers, F., Mok, C.K.P., Perera, R.A.P.M., Scott, M., Hagan, T., Sigal, N., Feng, Y., Bristow, L., Tak-Yin Tsang, O., et al. (2020). Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* 369, 1210–1220.
- Chen, Z., and John Wherry, E. (2020). T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 529–536.
- Chevrier, S., Zurbuchen, Y., Cervia, C., Adamo, S., Raeber, M.E., de Souza, N., Sivapatham, S., Jacobs, A., Bachli, E., Rudiger, A., et al. (2020). A distinct innate immune signature marks progression from mild to severe COVID-19. *Cell Rep. Med.* 2, 100166.
- Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Péré, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., et al. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 369, 718–724.
- Lucas, C., Wong, P., Klein, J., Castro, T.B.R., Silva, J., Sundaram, M., Ellingson, M.K., Mao, T., Oh, J.E., Israelow, B., et al.; Yale IMPACT Team (2020). Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* 584, 463–469.
- Mann, E.R., Menon, M., Knight, S.B., Konkil, J.E., Jagger, C., Shaw, T.N., Krishnan, S., Rattray, M., Ustianowski, A., Bakerly, N.D., et al.; NIH Respiratory TRC; CIRCO (2020). Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. *Sci. Immunol.* 5, eabd6197.
- Mathew, D., Giles, J.R., Baxter, A.E., Oldridge, D.A., Greenplate, A.R., Wu, J.E., Alanio, C., Kuri-Cervantes, L., Pampena, M.B., D'Andrea, K., et al.; UPenn COVID Processing Unit (2020). Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* 369, eabc8511.
- Ren, X., Wen, W., Fan, X., Hou, W., Su, B., Cai, P., Li, J., Liu, Y., Tang, F., Zhang, F., et al. (2020). Large-scale single-cell analysis reveals critical immune characteristics of COVID-19 patients. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.29.360479>.
- Schulte-Schrepping, J., Reusch, N., Paclik, D., Baßler, K., Schlickeiser, S., Zhang, B., Krämer, B., Krammer, T., Brumhard, S., Bonaguro, L., et al.; Deutsche COVID-19 OMICS Initiative (DeCOI) (2020). Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* 182, 1419–1440.e23.
- Sekine, T., Perez-Potti, A., Rivera-Ballesteros, O., Strálin, K., Gorin, J.-B., Olsson, A., Llewellyn-Lacey, S., Kamal, H., Bogdanovic, G., Muschiol, S., et al.; Karolinska COVID-19 Study Group (2020). Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell* 183, 158–168.e14.
- Silvin, A., Chapuis, N., Dunsmore, G., Goubet, A.-G., Dubuisson, A., Derosa, L., Almire, C., Hénon, C., Kosmider, O., Droin, N., et al. (2020). Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell* 182, 1401–1418.e18.



24. Song, J.-W., Zhang, C., Fan, X., Meng, F.-P., Xu, Z., Xia, P., Cao, W.J., Yang, T., Dai, X.P., Wang, S.Y., et al. (2020). Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nat. Commun.* *11*, 3410.
25. Wilk, A.J., Rustagi, A., Zhao, N.Q., Roque, J., Martínez-Colón, G.J., McKechnie, J.L., Ivison, G.T., Ranganath, T., Vergara, R., Hollis, T., et al. (2020). A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat. Med.* *26*, 1070–1076.
26. Giamarellos-Bourboulis, E.J., Netea, M.G., Rovina, N., Akinosoglou, K., Antoniadou, A., Antonakos, N., Damoraki, G., Gkavogianni, T., Adami, M.E., Katsaounou, P., et al. (2020). Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe* *27*, 992–1000.e3.
27. Merad, M., and Martin, J.C. (2020). Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* *20*, 355–362.
28. Ong, E.Z., Chan, Y.F.Z., Leong, W.Y., Lee, N.M.Y., Kalimuddin, S., Haja Mohideen, S.M., Chan, K.S., Tan, A.T., Bertoletti, A., Ooi, E.E., and Low, J.G.H. (2020). A Dynamic Immune Response Shapes COVID-19 Progression. *Cell Host Microbe* *27*, 879–882.e2.
29. Reizine, F., Lesouhaitier, M., Gregoire, M., Pinceaux, K., Gacouin, A., Maar, A., Painvin, B., Camus, C., Le Tulzo, Y., Tattevin, P., et al. (2021). SARS-CoV-2-Induced ARDS Associates with MDSC Expansion, Lymphocyte Dysfunction, and Arginine Shortage. *J. Clin. Immunol.* *41*, 515–525.
30. Mudd, P.A., Crawford, J.C., Turner, J.S., Souquette, A., Reynolds, D., Bender, D., Bosanquet, J.P., Anand, N.J., Striker, D.A., Martin, R.S., et al. (2020). Distinct inflammatory profiles distinguish COVID-19 from influenza with limited contributions from cytokine storm. *Sci. Adv.* *6*, eabe3024.
31. De Biasi, S., Meschiari, M., Gibellini, L., Bellinazzi, C., Borella, R., Fidanza, L., Gozzi, L., Iannone, A., Lo Tartaro, D., Mattioli, M., et al. (2020). Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun.* *11*, 3434.
32. De Biasi, S., Lo Tartaro, D., Meschiari, M., Gibellini, L., Bellinazzi, C., Borella, R., Fidanza, L., Mattioli, M., Paolini, A., Gozzi, L., et al. (2020). Expansion of plasmablasts and loss of memory B cells in peripheral blood from COVID-19 patients with pneumonia. *Eur. J. Immunol.* *50*, 1283–1294.
33. Vabret, N., Britton, G.J., Gruber, C., Hegde, S., Kim, J., Kuksin, M., Levantovsky, R., Maille, L., Moreira, A., Park, M.D., et al.; Sinai Immunology Review Project (2020). Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* *52*, 910–941.
34. Ranieri, V.M., Rubenfeld, G.D., Thompson, B.T., Ferguson, N.D., Caldwell, E., Fan, E., Camporota, L., and Slutsky, A.S.; ARDS Definition Task Force (2012). Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* *307*, 2526–2533.
35. Arvaniti, E., and Claassen, M. (2017). Sensitive detection of rare disease-associated cell subsets via representation learning. *Nat. Commun.* *8*, 14825.
36. Galli, E., Hartmann, F.J., Schreiner, B., Ingelfinger, F., Arvaniti, E., Diebold, M., Mrdjen, D., van der Meer, F., Krieg, C., Nimer, F.A., et al. (2019). GM-CSF and CXCR4 define a T helper cell signature in multiple sclerosis. *Nat. Med.* *25*, 1290–1300.
37. Krieg, C., Nowicka, M., Guglietta, S., Schindler, S., Hartmann, F.J., Weber, L.M., Dummer, R., Robinson, M.D., Levesque, M.P., and Becher, B. (2018). High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat. Med.* *24*, 144–153.
38. Bedin, A.-S., Makinson, A., Picot, M.-C., Mennechet, F., Malergue, F., Pisoni, A., Nyiramigisha, E., Montagnier, L., Bollore, K., Debiesse, S., et al. (2021). Monocyte CD169 Expression as a Biomarker in the Early Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.* *223*, 562–567.
39. Bourgoin, P., Soliveres, T., Barbaresi, A., Loundou, A., Belkacem, I.A., Arnoux, I., Bernot, D., Loosveld, M., Morange, P.-E., Michelet, P., et al. (2021). CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from COVID-19 or other viral infections in the Emergency Department. *Cytometry A*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24314>.
40. Ortilon, M., Coudereau, R., Cour, M., Rimmelé, T., Godignon, M., Gossez, M., Yonis, H., Argaud, L., Lukaszewicz, A.-C., Venet, F., et al. (2021). Monocyte CD169 expression in COVID-19 patients upon intensive care unit admission. *Cytometry A*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24315>.
41. Chevrier, S., Levine, J.H., Zanotelli, V.R.T., Silina, K., Schulz, D., Bacac, M., Ries, C.H., Ailles, L., Jewett, M.A.S., Moch, H., et al. (2017). An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell* *169*, 736–749.e18.
42. Kuri-Cervantes, L., Pampena, M.B., Meng, W., Rosenfeld, A.M., Ittner, C.A.G., Weisman, A.R., Agyekum, R.S., Mathew, D., Baxter, A.E., Vella, L.A., et al. (2020). Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.* *5*, eabd7114.
43. Laing, A.G., Lorenc, A., Del Molino Del Barrio, I., Das, A., Fish, M., Monin, L., Muñoz-Ruiz, M., McKenzie, D.R., Hayday, T.S., Francos-Quijorna, I., et al. (2020). A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat. Med.* *26*, 1623–1635.
44. Delano, M.J., and Ward, P.A. (2016). The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol. Rev.* *274*, 330–353.
45. Ferrando, C., Suarez-Sipmann, F., Mellado-Artigas, R., Hernández, M., Gea, A., Arruti, E., Aldecoa, C., Martínez-Palli, G., Martínez-González, M.A., Slutsky, A.S., and Villar, J.; COVID-19 Spanish ICU Network (2020). Clinical features, ventilatory management, and outcome of ARDS caused by COVID-19 are similar to other causes of ARDS. *Intensive Care Med.* *46*, 2200–2211.
46. Gattinoni, L., Coppola, S., Cressoni, M., Busana, M., Rossi, S., and Chiumello, D. (2020). COVID-19 Does Not Lead to a “Typical” Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *201*, 1299–1300.
47. Carissimo, G., Xu, W., Kwok, I., Abdad, M.Y., Chan, Y.-H., Fong, S.-W., Puan, K.J., Lee, C.Y., Yeo, N.K., Amrun, S.N., et al. (2020). Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. *Nat. Commun.* *11*, 5243.
48. Farina, A., Peruzzi, G., Laccioni, V., Lenna, S., Quarta, S., Rosato, E., Vestri, A.R., York, M., Dreyfus, D.H., Faggioni, A., et al. (2017). Epstein-Barr virus lytic infection promotes activation of Toll-like receptor 8 innate immune response in systemic sclerosis monocytes. *Arthritis Res. Ther.* *19*, 39.
49. Rempel, H., Calosing, C., Sun, B., and Pulliam, L. (2008). Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity. *PLoS ONE* *3*, e1967.
50. Carvelli, J., Demaria, O., Vély, F., Batista, L., Chouaki Benmansour, N., Fares, J., Carpentier, S., Thibault, M.L., Morel, A., Remark, R., et al.; Explore COVID-19 IPH group; Explore COVID-19 Marseille Immunopole group (2020). Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a-C5aR1 axis. *Nature* *588*, 146–150.
51. Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., Cheng, L., Li, J., Wang, X., Wang, F., et al. (2020). Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.* *26*, 842–844.
52. Bastard, P., Rosen, L.B., Zhang, Q., Michailidis, E., Hoffmann, H.-H., Zhang, Y., Dorgham, K., Philippot, Q., Rosain, J., Béziat, V., et al.; HGID Lab; NIAID-USUHS Immune Response to COVID Group; COVID Clinicians; COVID-STORM Clinicians; Imagine COVID Group; French COVID Cohort Study Group; Milieu Intérieur Consortium; CoV-Contact Cohort; Amsterdam UMC Covid-19 Biobank; COVID Human Genetic Effort (2020). Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* *370*, eabd4585.
53. Zhang, Q., Bastard, P., Liu, Z., Le Pen, J., Moncada-Velez, M., Chen, J., Ogishi, M., Sabli, I.K.D., Hodeib, S., Korol, C., et al.; COVID-STORM Clinicians; COVID Clinicians; Imagine COVID Group; French COVID Cohort Study Group; CoV-Contact Cohort; Amsterdam UMC Covid-19 Biobank; COVID Human Genetic Effort; NIAID-USUHS/TAGC COVID Immunity Group (2020). Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* *370*, eabd4570.

54. Galbraith, M.D., Kinning, K.T., Sullivan, K.D., Baxter, R., Araya, P., Jordan, K.R., Russell, S., Smith, K.P., Granrath, R.E., Shaw, J.R., et al. (2021). Seroconversion stages COVID19 into distinct pathophysiological states. *eLife* 10, e65508.
55. Stolk, R.F., van der Pasch, E., Naumann, F., Schouwstra, J., Bressers, S., van Herwaarden, A.E., Gerretsen, J., Schambergen, R., Ruth, M.M., van der Hoeven, J.G., et al. (2020). Norepinephrine Dysregulates the Immune Response and Compromises Host Defense during Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 202, 830–842.
56. Reyes, M., Filbin, M.R., Bhattacharyya, R.P., Sonny, A., Mehta, A., Billman, K., Kays, K.R., Pinilla-Vera, M., Benson, M.E., MGH COVID-19 Collection & Processing Team, et al. (2020). Induction of a regulatory myeloid program in bacterial sepsis and severe COVID-19. *bioRxiv* 10.1101/2020.09.02.280180.
57. Thompson, E.A., Cascino, K., Ordonez, A.A., Zhou, W., Vagharia, A., Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Sun, I.-H., Wang, R., Rosenberg, A.Z., et al. (2020). Mitochondrial induced T cell apoptosis and aberrant myeloid metabolic programs define distinct immune cell subsets during acute and recovered SARS-CoV-2 infection. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.10.20186064>.
58. Xu, G., Qi, F., Li, H., Yang, Q., Wang, H., Wang, X., Liu, X., Zhao, J., Liao, X., Liu, Y., et al. (2020). The differential immune responses to COVID-19 in peripheral and lung revealed by single-cell RNA sequencing. *Cell Discov.* 6, 73.
59. Sánchez-Cerrillo, I., Landete, P., Aldave, B., Sánchez-Alonso, S., Sánchez-Azofra, A., Marcos-Jiménez, A., Ávalos, E., Alcaraz-Serna, A., de Los Santos, I., Mateu-Albero, T., et al.; REINMUN-COVID and EDEPIMIC groups (2020). COVID-19 severity associates with pulmonary redistribution of CD1c+ DCs and inflammatory transitional and nonclassical monocytes. *J. Clin. Invest.* 130, 6290–6300.
60. Fan, E., Beitler, J.R., Brochard, L., Calfee, C.S., Ferguson, N.D., Slutsky, A.S., and Brodie, D. (2020). COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: is a different approach to management warranted? *Lancet Respir. Med.* 8, 816–821.
61. Amir, E.D., Davis, K.L., Tadmor, M.D., Simonds, E.F., Levine, J.H., Bendall, S.C., et al. (2013). viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol.* 31, 545–552. <https://doi.org/10.1038/nbt.2594>.
62. Van Gassen, S., Callebaut, B., Van Helden, M.J., Lambrecht, B.N., De-meester, P., Dhaene, T., et al. (2015). FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A.* 87, 636–645. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22625>.
63. Kotecha, N., Krutzik, P.O., and Irish, J.M. (2010). Web-based analysis and publication of flow cytometry experiments. *Current Protoc Cytom.* 53, 10–17. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1017s53>.
64. Levey, A.S., Eckardt, K.-U., Tsukamoto, Y., Levin, A., Coresh, J., Rossert, J., De Zeeuw, D., Hostetter, T.H., Lameire, N., and Eknoyan, G. (2005). Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 67, 2089–2100.
65. Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.P., Jankowska, E.A., et al.; ESC Scientific Document Group (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* 37, 2129–2200.
66. Le Gall, J.R., Lemeshow, S., and Saulnier, F. (1993). A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270, 2957–2963.
67. Gaudriot, B., Uhel, F., Gregoire, M., Gacouin, A., Biedermann, S., Roisne, A., Flecher, E., Le Tulzo, Y., Tarte, K., and Tadié, J.M. (2015). Immune Dysfunction After Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass: Beneficial Effects of Maintaining Mechanical Ventilation. *Shock* 44, 228–233.
68. Le Balc'h, P., Pinceaux, K., Pronier, C., Seguin, P., Tadié, J.-M., and Reizine, F. (2020). Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients. *Crit. Care* 24, 530.


STAR★METHODS
KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
CD11c (3.9), Purified	BioLegend	Cat# 301602; RRID: AB_314172
CD33 (WM53), Purified	BioLegend	Cat# 303402; RRID: AB_314346
CD209 (9E9A8), Purified	BioLegend	Cat# 330102; RRID: AB_1134253
CD14 (M5E2), Purified	BioLegend	Cat# 301802; RRID: AB_314184
CD123 (6H6), Purified	BioLegend	Cat# 306002; RRID: AB_314576
CD21 (Bu32), Purified	BioLegend	Cat# 354902; RRID: AB_11219188
CD192 (K036C2), Purified	BioLegend	Cat# 357202; RRID: AB_2561851
CD163 (GHI/61), Purified	BioLegend	Cat# 333602; RRID: AB_1088991
CD36 (5-271), Purified	BioLegend	Cat# 336202; RRID: AB_1279228
CD86 (IT2.2), Purified	BioLegend	Cat# 305402; RRID: AB_314522
CD169 (7-239), Purified	BioLegend	Cat# 346002; RRID: AB_2189031
CD274 (29E.2A3), Purified	BioLegend	Cat# 329719; RRID: AB_2565429
CD254 (MIH24), Purified	BioLegend	Cat# 347501; RRID: AB_2044062
CD106 (EPR5047), Purified	Abcam	Cat# ab134047; RRID: AB_2721053
CD3 (UCHT1), Purified	BioLegend	Cat# 300402; RRID: AB_314056
CD49a (TS2/7), Purified	BioLegend	Cat# 328302; RRID: AB_1236385
gp38 (REA446), Purified	Miltenyi Biotec	Cat# 130-107-017; RRID: AB_2653261
CD80 (2D10), Purified	BioLegend	Cat# 305202; RRID: AB_314498
CD34 (581), Purified	BioLegend	Cat# 343502; RRID: AB_1731898
CD1a (HI149), Purified	BioLegend	Cat# 300102; RRID: AB_314016
CX3CR1 (2A9-1), Purified	BioLegend	Cat# 341602; RRID: AB_1595422
CD32 (FUN-2), Purified	BioLegend	Cat# 303202; RRID: AB_314334
CD54 (HA58), Purified	BioLegend	Cat# 353102; RRID: AB_11204426
CD195 (J418F1), Purified	BioLegend	Cat# 359102; RRID: AB_2562457
CD206 (15-2), Purified	BioLegend	Cat# 321102; RRID: AB_571923
S100A9 (A15105J), Purified	BioLegend	Cat# 600302; RRID: AB_2721747
CD45RA (HI100), Purified	BioLegend	Cat# 304102; RRID: AB_314406
CD172a (15-414), Purified	BioLegend	Cat# 372102; RRID: AB_2629807
CD68 (Y1/82A), Purified	BioLegend	Cat# 333802; RRID: AB_1089058
CD11b (ICRF44), 209Bi	Fluidigm	Cat# 3209003; RRID: AB_2687654
CD8a (RPA-T8), Purified	BioLegend	Cat# 301053; RRID: AB_2562810
CD4 (RPA-T4), Purified	BioLegend	Cat# 300502; RRID: AB_314070
CD25 (BC96), Purified	BioLegend	Cat# 302602; RRID: AB_314272
CD38 (HIT2), Purified	BioLegend	Cat# 303502; RRID: AB_314354
CXCR3 (G025H7), Purified	BioLegend	Cat# 353733; RRID: AB_2563724
FoxP3 (259D/C7), Purified	BD Biosciences	Cat# 560044; RRID: AB_1645589
CD7 (CD7-6B7), Purified	BioLegend	Cat# 343111; RRID: AB_2563761
Gata-3 (TWAJ), Purified	Thermo Fisher Scientific	Cat# 14-9966-82; RRID: AB_1210519
CCR7 (G043H7), Purified	BioLegend	Cat# 353237; RRID: AB_2563726
CCR6 (G034E3), Purified	BioLegend	Cat# 353427; RRID: AB_2563725
CD27 (O323), Purified	BioLegend	Cat# 302802; RRID: AB_314294
CD10 (HI10a), Purified	BioLegend	Cat# 312223; RRID: AB_2562828

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
CD117 (104D2), Purified	BioLegend	Cat# 105814; RRID: AB_313223
CCR4 (L291H4), Purified	BioLegend	Cat# 359402; RRID: AB_2562364
CD161 (HP-3G10), Purified	BioLegend	Cat# 339919; RRID: AB_2562836
CD185 (J252D4), Purified	BioLegend	Cat# 356902; RRID: AB_2561811
RORgt (AFKJS-9), Purified	Thermo Fisher Scientific	Cat# 14-6988-82; RRID: AB_1834475
CD294 (BM16), Purified	BioLegend	Cat# 350102; RRID: AB_10639863
LAG-3 (7H2C65), Purified	BioLegend	Cat# 369202; RRID: AB_2616877
CTLA-4 (L3D10), Purified	BioLegend	Cat# 349902; RRID: AB_10642827
PD-1 (EH12.2H7), Purified	BioLegend	Cat# 329941; RRID: AB_2563734
Tim-3 (F38-2E2), Purified	BioLegend	Cat# 345019; RRID: AB_2563790
CD127 (A019D5), Purified	BioLegend	Cat# 351337; RRID: AB_2563715
Bcl-6 (k112-91), Purified	BD Biosciences	Cat# 561520; RRID: AB_10713172
T-bet (4B10), Purified	BioLegend	Cat# 644825; RRID: AB_2563788
CD45RO (UCHL1), Purified	BioLegend	Cat# 304239; RRID: AB_2563752
CD56 (HCD56), Purified	BioLegend	Cat# 318302; RRID: AB_604092
Ki-67 (Ki-67), Purified	BioLegend	Cat# 350523; RRID: AB_2562838
CD44 (BJ18), Purified	BioLegend	Cat# 338802; RRID: AB_1501199
CD45 (HI30), 89Y	Fluidigm	Cat# 3089003; RRID: AB_2661851
CD326 (9C4), Purified	BioLegend	Cat# 324229; RRID: AB_2563742
CD19 (HIB19), Purified	BioLegend	Cat# 302202; RRID: AB_314232
HLA-DR (10.1), Purified	BioLegend	Cat# 307602; RRID: AB_314680
CD31 (WM59), Purified	BioLegend	Cat# 303127; RRID: AB_2563740
CD16 (B73.1), Purified	BioLegend	Cat# 360702; RRID: AB_2562693
CD64 (L243), Purified	BioLegend	Cat# 305029; RRID: AB_2563759

Chemicals, peptides, and recombinant proteins

EQ Four Element Calibration Beads	Fluidigm	Cat# 201078
Antibody Stabilizer PBS	Candor Bioscience	Cat# 131050
Bond-Breaker TCEP Solution	Thermo Fisher Scientific	Cat# 77720
Cell-ID Intercalator-Ir	Fluidigm	Cat# 201192B
Cell-ID Cisplatin-198Pt	Fluidigm	Cat# 201198
Cell Acquisition Solution	Fluidigm	Cat# 201240

Critical commercial assays

Transcription factor staining buffer set	Miltenyi Biotec	Cat# 130-122-981
Maxpar® X8 Multimetal Antibody Labeling Kit	Fluidigm	Cat# 201300
Preamp Master Mix	Fluidigm	Cat# 100-5580
Reverse Transcription Master Mix	Fluidigm	Cat# 100-6298
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)	Life Technologies	Cat# PN 4304437
96.96 DNA Binding Dye Sample/Loading Kit – 10 IFCs	Fluidigm	Cat# BMK-M10-96.96-EG

Deposited data

CyTOF data	Chevrier et al. ¹⁵	https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100166
scRNaseq sata	Wilk et al. ²⁵	https://doi.org/10.1038/s41591-020-0944-y
CyTOF data	Schulte-Schrepping et al. ²¹	https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.001
CyTOF data	This paper	https://doi.org/10.17632/xg9k72r5rt.1

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
CyTOF data	This paper	https://doi.org/10.17632/c29frc3y6s.1
Clinical data	This paper	https://doi.org/10.17632/5n8df8jvk4.1
Oligonucleotides		
IFIT1: interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	TaqMan® Assays, ThermoFisher Scientific	Hs03027069_s1
IFNAR1: interferon alpha and beta receptor subunit 1	TaqMan® Assays, ThermoFisher Scientific	Hs01066116_m1
ISG15: ISG15 ubiquitin-like modifier	TaqMan® Assays, ThermoFisher Scientific	Hs01921425_s1
IFI27: interferon alpha inducible protein 27	TaqMan® Assays, ThermoFisher Scientific	Hs01086373_g1
IFI44L: interferon induced protein 44 like	TaqMan® Assays, ThermoFisher Scientific	Hs00915287_m1
RSAD2: radical S-adenosyl methionine domain containing 2	TaqMan® Assays, ThermoFisher Scientific	Hs00369813_m1
IFNAR2: interferon alpha and beta receptor subunit 2	TaqMan® Assays, ThermoFisher Scientific	Hs01022059_m1
ELF1: E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	TaqMan® Assays, ThermoFisher Scientific	Hs00152844_m1
Software and algorithms		
CellCnn, ScaiVision platform	Scailyte AG	version 0.3.6
R	https://cran.r-project.org	v3.6.3
Premessa (R package)	https://github.com/ParkerICI/premessa	premess 0.2.6
visNE (Cytobank)	Amir et al. ⁶¹	N/A
FlowSOM (Cytobank)	Van Gassen et al. ⁶²	N/A
Rstudio	https://www.rstudio.com/	v1.2.5033
pheatmap (R package)	https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html	v1.0.12 (CRAN)
Cytobank	Kotecha et al. ⁶³ https://www.cytobank.org	N/A
Kaluza	Beckman Coulter	v2.1.00002
Prism (software)	https://www.graphpad.com	v8

RESOURCE AVAILABILITY**Lead contact**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Mikael Roussel (mikael.roussel@chu-rennes.fr)

Materials availability

The study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

Additional supplemental items are available at Mendeley Data: <http://dx.doi.org/10.17632/xg9k72r5rt.1>, <http://dx.doi.org/10.17632/c29frc3y6s.1>, and <http://dx.doi.org/10.17632/5n8df8jvk4.1>.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**Patients**

This study was performed in the infectious diseases department and intensive care unit (ICU) at Rennes University Hospital. The study design was approved by our ethic committee (CHU Rennes, n°35RC20_9795_HARMONICOV, [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) Identifier: NCT04373200) and informed consent was obtained from patients in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients with malignancy, HIV-infected patients, and patients with preexisting immune disorders or receiving immunosuppressive agents were excluded. The presence of SARS-CoV-2 in respiratory specimens (nasal and pharyngeal swabs or sputum) was detected by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods (TaqPath COVID-19, ThermoFisher).

Cohort 1: Peripheral blood was collected in tubes containing lithium heparin from COVID-19^{neg}ARDS^{pos}, COVID-19^{pos}ARDS^{pos}, and COVID-19^{pos}ARDS^{neg} patients. Peripheral blood samples were drawn at D0 and D7. PBMC were isolated from whole blood using ficoll before cryopreservation. All patients provided written informed consent. The following data were recorded: gender, age, preexisting chronic kidney disease and acute kidney failure during the ICU stay,⁶⁴ preexisting chronic heart failure,⁶⁵ Body Mass Index (BMI), SAPS II at admission,⁶⁶ duration of mechanical ventilation, length of hospital stay, and outcome (alive or dead) on day 7, day 30 and day 90. The occurrence of nosocomial infection, defined following CDC criteria as previously described,⁶⁷ was also recorded during hospital stay. For each patient, a clinical score was built to summarize the occurrence of adverse clinical events frequently encountered during hospitalization.^{67,68} Each of the following events: thromboembolic events, nosocomial infection, septic shock, acute renal failure, and death counting as one point, the score varies from 0 (no adverse events) to 5. Patients' characteristics for cohort 1 are reported in [Tables 1](#) and [S1](#).

Cohort 2: Same inclusion criteria were applied to cohort 2. Only patients at D0 were included. Patients' characteristics for cohort 1 are reported in [Tables S1](#) and [S2](#).

METHOD DETAILS

Mass cytometry analysis

PBMC from patients were thawed. Briefly, cells were stained 5 minutes in RPMI supplemented with 0.5 μ M Cisplatin Cell-ID (Fluidigm, San Francisco, CA) in RPMI 1640 before washing with 10% FCS in RPMI 1640. Cell pellets were resuspended in 80 μ l of 0.5% BSA in PBS. Then 60 μ l of each surface staining cocktail, lymphoid or myeloid, were added to 40 μ l of resuspended cells. After staining, cells were washed in 0.5% BSA in PBS before fixation/permeabilization with the transcription factor staining buffer set (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany). Then 60 μ l of each surface staining cocktail, lymphoid or myeloid, were added to 40 μ l of resuspended cells in Perm Buffer. The panel of antibodies is listed in [Table S3](#) and in [Key resources table](#). After intracellular staining, cells were washed twice before staining in DNA intercalator solution (2.5% Paraformaldehyde, 1:3200 Cell-ID Intercalator-Ir (Fluidigm, San Francisco, CA) in PBS). Samples were cryopreserved at -80°C until acquisition on Helios System (Fluidigm, San Francisco, CA).

Antibodies and reagents

Purified antibodies for mass cytometry were obtained in carrier/protein-free buffer and then coupled to lanthanide metals using the MaxPar antibody conjugation kit (Fluidigm Inc.) according to manufacturer's recommendations. Following the protein concentration determination by measurement of absorbance at 280 nm and titration on positive controls, the metal-labeled antibodies were diluted in Candor PBS Antibody Stabilization solution (Candor Bioscience, Germany) for long-term storage at 4°C . Antibodies used are listed in [Table S3](#) and [Key resources table](#).

Quantitative real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from PAXgene blood RNA kit (QIAGEN, Valencia, CA) using a Hamilton Microlab STARlet Automated Handler (Atlantic Lab Equipment, Beverly, MA). cDNA was then prepared using Reverse Transcription Master Mix (Fluidigm Sunnyvale, CA) and gene expression preamplification was performed with Fluidigm Preamp Master Mix and Taqman Assays (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Carlsbad, CA, USA). After loading the reaction chambers using the integrated fluid circuit (IFC) HX controller from Fluidigm, the realtime PCR was performed in a BioMark HD system (Fluidigm Corp., USA) using single probe (FAM-MGB, reference: ROX) settings and GE 96x96 standard v1 protocol. Data processing took place using the Fluidigm real-time PCR analysis software (v. 4.1.3). For each sample, the cycle threshold (CT) value for the gene of interest was determined and normalized to the housekeeping gene *ELF1*. The relative level of expression of each gene for each patient at D7 compared to D0 was assessed using the 2-ddCT method. For all D0 samples, the relative level of expression of each gene was assessed by 2-dCT method Type I IFN response score was determined as Log2 of the mean of the following genes: *ISG15*, *IFI27*, *IFI44L*, *RSAD2* and *IFIT*. IFNAR score was considered as Log2 of the mean of the following genes: *IFNAR1* and *IFNAR2*.

Detection of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies

The viral strain (RoBo strain), which was cultured on Vero-E6 cells (ATCC CRL-1586), used for the nAb assay was a clinical isolate obtained from a nasopharyngeal aspirate of a patient HOS at the University Hospital of Saint-Etienne for severe COVID-19. The strain was diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium–2% fetal calf serum in aliquots containing 100–500 tissue culture infectious doses 50% (TCID50) per ml. Each serum specimen was diluted 1:10 and serial twofold dilutions were mixed with an equal volume (100 μ L each) of virus. After gentle shaking for 30 min at room temperature, 150 μ L of the mixture was transferred to 96-well microplates covered with Vero-E6 cells. The plates were then placed at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Measurements were obtained microscopically 5–6 days later when the cytopathic effect of the virus control reached ~ 100 TCID50/150 μ L. The serum was considered to have protected the cells if > 50% of the cell layer was preserved. The neutralizing titer is expressed as the inverse of the higher serum dilution that protected the cells.



QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Mass cytometry preprocessing

After acquisition, intrafile signal drift was normalized and .fcs files were obtained using CyTOF software. To diminish batch effects, all files were normalized on EQ Beads (Fluidigm Sciences) using the *premassa* R package (<https://github.com/ParkerICI/premassa>). Files were then uploaded to the Cytobank cloud-based platform (Cytobank, Inc.). Data were first arcsinh-transformed using a cofactor of 5. For all files, live single cells were selected by applying a gate on DNA1 versus DNA2 followed by a gate on DNA1 versus Cisplatin, then beads were removed by applying a gate on the beads channel (Ce140Di) versus DNA.1 Normalized, transformed and gated values were exported as FCS files.

CellCnn analysis

Identification of a Covid-19-specific cell-identity signature was carried out using the CellCnn algorithm,³⁵ implemented in Pytorch in the ScaIvision platform (version 0.3.6, © Scaillyte AG). Briefly, this is a supervised machine learning algorithm that trains a convolutional neural network with a single layer to predict sample-level labels using single-cell data as inputs. Data from each CyTOF panel was analyzed separately, in each case using all measured protein markers to train a series of CellCnn networks with varying hyperparameters. Each sample was given a label corresponding to the Covid-19 status of the patient from which the sample was drawn (positive or negative). To generate input data for training CellCnn, sub-samples of 2000 cells, termed multi-cell inputs (MCIs), were chosen randomly from each sample independently. For each training epoch, 2000 MCIs from each label class (Covid-19^{pos} or Covid-19^{neg}) were presented to the network in random order. During training, 30% of the samples were set aside for validation, chosen in a stratified manner to maintain the relative proportions of each class. 50 independent networks were generated for each CyTOF panel using hyperparameters randomly chosen from the following options: i) number of filters: (2, 3, 5, 7, and 10), ii) top-k pooling percentage: (1, 5, 10, 20, and 30), iii) dropout probability: (0.3, 0.4, and 0.6), iv) learning rate: (0.001, 0.003, and 0.01), and v) weight decay: (0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, and 0.1). Training was performed with a batch size of 50. Adam was used as an optimizer {kingma2015adam}, with a beta1 coefficient of 0.999 and a beta2 coefficient of 0.99. Each network was trained for a maximum of 50 epochs, or until the validation loss no longer decreased for 10 consecutive epochs. At the end of training, the weights from the epoch with lowest validation loss were returned. Representative filters were determined by clustering the filters from all networks achieving $\geq 90\%$ accuracy on the validation samples, then choosing the filter in each cluster with the minimum distance to all other filters in that cluster. For both CyTOF panels, a single representative filter showing the largest positive association with the Covid-19^{pos} label class was used to calculate cell-level filter response scores. Thresholds were set on the filter response scores to select Covid-19-associated cells by calculating the relative frequencies of selected cells in each sample at 100 different thresholds for each filter, then performing a logistic regression to predict sample labels. For each threshold, the data was first split in a stratified manner into a training set, comprising 60% of samples, and a test set, comprising 40% of samples. The logistic regression was performed on the training set, and the accuracy of resulting predictions was calculated on the test set. This procedure was performed 10 times, with randomly chosen training/test splits, and the mean of the resulting accuracies for each threshold was calculated. For the lymphoid panel, one threshold (9.63) achieved the highest accuracy and was set as the final threshold. For the myeloid panel, multiple thresholds achieved the same level of accuracy; the lowest of these (4.96) was set as the final threshold. The relative frequencies of cells in each sample with filter response scores greater than or equal to the respective thresholds were calculated and compared using a Wilcoxon rank-sum test.

viSNE, FlowSOM, and hierarchical clustering

We first performed a dimension reduction for both panels (i.e., myeloid and lymphoid) and all cleaned-up 63 files were first analyzed using viSNE, based upon the Barnes–Hut implementation of t-SNE. Equal downsampling was performed, based on the lowest event count in all files (lymphoid panel) or on the maximum total events allowed by Cytobank (myeloid panel). For the myeloid panel, the following parameters were used: perplexity = 45; iterations = 5000; theta = 0.5; all 37 channels selected. For the lymphoid panel the parameters were as follows: perplexity = 45; iterations = 7500; theta = 0.5; all 36 channels selected.

Then we applied a clustering method using the FlowSOM clustering algorithm. FlowSOM uses Self-Organizing Maps (SOMs) to partition cells into clusters based on their phenotype, and then builds a Minimal Spanning Tree (MST) to connect the nodes of the SOM, allowing the identification of metaclusters (i.e., group of clusters). We performed the FlowSOM algorithm on the previous viSNE results, using all events and panel channels, and the following parameters: clustering method = hierarchical consensus, iterations = 10, number of clusters = 256, number of metaclusters = 30. For both panels, each metacluster (containing a given number of clusters) was manually annotated based on his marker expression phenotype, his projection on the viSNE and his localization in the FlowSOM MST.

We first analyzed the myeloid panel. Out of 30 metaclusters defined by the FlowSOM approach, we identified 13 metaclusters with monocyte markers, other metaclusters contained other cell types, low count of cells or remaining doublets or dead cells. We visually identified 2 (Mo18 and Mo26) out of the 13 metaclusters that were heterogeneous. These 2 metaclusters were manually split into 2 new metaclusters (identified respectively as Mo180, Mo181 and Mo214, Mo243) (Figure S1B). Thus, altogether we analyzed 15 metaclusters of myeloid cells. Regarding the lymphoid compartment, we noticed that FlowSOM defined metaclusters at the lineage level, thus we retain all the 136 clusters included in 10 metaclusters of interest (i.e., containing lymphoid lineage markers) (Figure S1C). All metaclusters and clusters phenotypes including their abundances and mean marker intensity were then exported from Cytobank for

further analyses. Cytometry data was explored with Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter). Hierarchical clustering and heat-maps were generated with R v3.6.3, using Rstudio v1.2.5033 and the pheatmap package.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Graphpad Prism 8.4.3. P values were defined by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post-test for multiple group comparisons or by Wilcoxon matched-pairs signed rank tests as appropriate. Correlations were calculated using Spearman test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Hierarchical clustering of the patients was performed using euclidean distance and complete clustering. Correspondence analysis was performed using the package factoshiny using as variable the abundance in cell subsets for each patient.

Titre : Caractérisation des macrophages de lymphome B : hétérogénéité et dialogue avec la niche stromale et endothéliale

Mots clés : lymphome diffus à grandes cellules B, macrophages associés aux tumeurs, cellules endothéliales, cellules stromales, lymphome folliculaire, microenvironnement tumoral

Résumé : Le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), agressif, et le lymphome folliculaire (FL), indolent, sont les deux lymphomes les plus fréquents. Le microenvironnement tumoral (TME) immun et non immun joue un rôle de soutien essentiel dans ces maladies. Bien que leur implication dans le pronostic et la pathogénie des lymphomes B soit reconnu depuis plusieurs années, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) n'ont pas encore été caractérisés à l'échelle de la cellule unique dans le DLBCL et le FL. Nous explorons ici l'hétérogénéité des phagocytes mononucléés (MNP) et leur co-régulation potentielle avec le compartiment stromal et endothélial dans les ganglions lymphatiques des lymphomes B, en

comparaison à des organes lymphoïdes secondaires réactionnels, par cytométrie de masse, *single cell* RNASeq et des approches *in silico*. Nous mettons en évidence une co-régulation entre les TAM et les cellules endothéliales sanguines (BEC) dans les lymphomes. Nous identifions une interaction spécifique entre les BEC exprimant ANXA1 et les monocytes/macrophages exprimant FPR1/2 dans le DLBCL, confirmée *in situ* par immunofluorescence multiplex et imagerie par cytométrie de masse. Ce dialogue est associé à un pronostic défavorable et à un TME immunosuppresseur dans le DLBCL, et pourrait constituer une cible thérapeutique.

Title : Characterization of B cell lymphoma macrophages: heterogeneity and crosstalk with the stromal and endothelial niche

Keywords : diffuse large B cell lymphoma, tumor-associated macrophages, endothelial cells, stromal cells, follicular lymphoma, tumor microenvironment

Abstract : Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL) are the 2 most common aggressive and indolent lymphomas. The tumor microenvironment (TME), both immune and non-immune, plays a key supportive role in these diseases. Although their impact on the prognosis and pathogenesis of B cell lymphoma has been acknowledged for years, to date tumor-associated macrophages (TAM) have not been extensively explored at the single cell level in reactive and tumor lymphoid organ from DLBCL and FL. Herein, we explore mononuclear phagocytes (MNP) heterogeneity and their potential co-regulation with the stromal and endothelial compartment in B cell lymphoma lymph nodes compared to reactive secondary

lymphoid organs, by mass cytometry, scRNASeq, and *in silico* approaches. We show a co-regulation between TAM and blood endothelial cells (BEC) in lymphoma. We identify a specific interaction between ANXA1-expressing BEC and FPR1/2-expressing monocytes/macrophages in DLBCL, which we confirm *in situ* by multiplex immunofluorescence (mIF) and imaging mass cytometry (IMC). This crosstalk is associated to an adverse prognosis and an immunosuppressive TME in DLBCL.