

### Interactions des cellules tumorales B et des cellules stromales dans le lymphome folliculaire : une question menée par des concepts d'hétérogénéité tumorale et micro environnementale

Claire Lamaison

### ▶ To cite this version:

Claire Lamaison. Interactions des cellules tumorales B et des cellules stromales dans le lymphome folliculaire : une question menée par des concepts d'hétérogénéité tumorale et micro environnementale. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B046 . tel-04116401

### HAL Id: tel-04116401 https://theses.hal.science/tel-04116401

Submitted on 4 Jun2023

**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.



# THESE DE DOCTORAT

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605 *Biologie Santé* Spécialité : Cancérologie

### Par Claire Lamaison

### Interactions des cellules tumorales B et des cellules stromales dans le lymphome folliculaire : une question menée par des concepts d'hétérogénéité tumorale et micro environnementale

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 3 décembre 2021. Unité de recherche : Microenvironment, Cell Differentiation, Immunology and Cancer, UMR 1236 Inserm

#### Rapporteurs avant soutenance :

Karl BalabanianDR INSERM, INSERM U1160, Paris.Loïc YsebaertPU-PH, CRCT, Toulouse.

### **Composition du Jury :**

Président :	Philippe Gaulard	PU-PH, IRMB, Créteil.
Examinateurs :	Sandrine Roulland Karl Balabanian Loïc Ysebaert Frédéric Mourcin	CR, INSERM, CIML, Marseille. DR INSERM, INSERM U1160, Paris. PU-PH, CRCT, Toulouse. CR EFS, INSERM U 1236, Rennes.
Dir. de thèse :	Karin Tarte	PU-PH, INSERM U1236, Rennes.

Je souhaite en premier lieu remercier le Docteur Karl Balabanian et le Professeur Loïc Ysebaert qui ont accepté d'expertiser ce manuscrit. J'espère que la lecture de ce manuscrit vous sera agréable, comme il a été pour moi de l'écrire.

Je souhaite remercier le Professeur Nathalie Rioux Leclercq, au-delà du fait que vous m'ayez guidée dans ce parcours, votre pragmatisme, votre humanité, votre disponibilité, votre humour, vos conseils avisés et votre empathie m'ont énormémement apporté.

Je souhaite remercier le Professeur Karin Tarte pour sa supervision au cours de ma thèse : ce que j'ai appris ces dernières années n'est pas quantifiable, et j'ai pu réellement m'épanouir scientifiquement à ton contact. Je t'en serai éternellement reconnaissante. Merci de la confiance que tu m'as témoignée, même si cela m'a mise un peu de pression car à chaque instant je craignais de nous amener sur une mauvaise piste et de trahir cette confiance.

Je souhaite remercier le Docteur Frédéric Mourcin, présent dès les premières manips pour m'apprendre à tenir une pipette, dont la patience et le calme olympien ont été le magnifique reflet de mon impatience et de ma nervosité, toujours là quand il reste zéro seconde avant de rendre un travail et qu'il faut rattraper des boulettes.

Je souhaite remercier le Docteur Patrick Tas, c'est vous qui m'avez amenée jusqu'ici. Vous transmettez votre passion, par votre douceur, votre gentillesse, votre savoir encyclopédique. Je vous porte une affection et une admiration sans faille et votre soutien et votre considération dès notre première rencontre n'ont pas eu de prix pour moi. Bien sûr votre soutien durant cette thèse sur le deuxième projet en tant que pathologiste a aussi été considérable. Il me tenait tellement... à cœur et vous le saviez.

Je tiens à remercier le Professeur Brousset, avec qui j'ai eu le bonheur de passer des heures au microscope, ces heures passaient tellement vite, avec votre humour subtile et tranchant, votre pragmatisme, vos intermèdes historiques, je repense avec beaucoup de plaisir à ces moments. Je suis absolument honorée d'avoir travaillé avec vous et d'avoir appris à vos côtés et je tiens à vous témoigner toute l'admiration et l'affection que j'ai maintenant pour vous en tant qu'homme, en tant que scientifique et en tant que pathologiste.

Je remercie bien sûr le Professeur Camille Laurent, dont l'élégance, l'humour, la douceur, la gentillesse, la puissance de travail, la bonté et les compétences n'ont pas de limite. Merci pour ton extrême bienveillance et pour ton indulgence.

Tout au long de cette thèse, j'ai effectué de nombreux remplacements dans le secteur privé en pathologie pendant les « vacances ». Je souhaite remercier les personnes incroyables que j'ai rencontrées, qui m'ont acceptée à plusieurs reprises dans leur structure en sachant que j'étais une jeune pathologiste, qu'il fallait passer du temps avec moi pour lever mes doutes diagnostics, qui ne m'ont jamais jugée, et m'ont appris tellement. Vous m'avez sécurisée dans mes capacités, et je vous en suis tellement reconnaissante. Je pense à Agathe , Othman, Georges, Marie, Madame Dorival, Caroline, Patrick. J'ai un immense respect pour les pathologistes du secteur privé et je pense que nous avons beaucoup à apprendre de vous.

Je voudrais remercier Céline Monvoisin et Marine Seffals toutes deux ingénieures, qui m'ont accompagnée tellement de bon cœur sur ce travail gargantuesque, et surtout sur ce deuxième projet, vous n'avez jamais compté les heures pour maniper avec moi ou sans moi, pour me conseiller, et surtout pour me soutenir. Ce projet n'aurait absolument jamais avancé sans vos compétences, votre efficacité, votre puissance de travail, votre courage, vos conseils. Quelques lignes ne suffiront jamais à retranscrire l'admiration et le respect que je vous porte. Travailler avec vous a été un véritable bonheur et vous m'avez appris avec beaucoup d'empathie et de patience à réaliser ces manips gargantuesques. Céline je me souviens de tes conseils précieux pour gérer ces journées interminables et de ta phrase fétiche qui me boostait : « Ecoutes, tu fais au mieux et ça va aller. » et Marine : « ça va lfaiiiiiiiiii ma petite Claire» (je note cependant que lorsque tu disais cela , ça le faisait jamais... ).

Je voudrais remercier Alain Fautrel en premier lieu pour tous ses précieux conseils tellement avisés et éclairés, d'une personne qui a commencé au premier échelon et qui se retire avec une telle aura et un tel aboutissement de la magnifique plateforme d'histologie qu'il a dirigée.... et qui a été presque ma première maison...

Je souhaite remercier Laurence Bepoldin avec qui j'ai eu l'honneur et le plaisir de travailler lors du confinement et de ma thèse sur l'écriture de l'article, je tiens à te témoigner toute ma considération, non seulement scientifique mais aussi sur le plan humain.Je suis absolument honorée de te connaitre.

Je remercie Charlotte, qui m'a soutenue, aidée et accompagnée pendant mon séjour à Toulouse, toujours avec une bienveillace et une patience extrême. Tu as quelques mois de moins que moi et tu es un véritable roc je t'admire comme si tu étais une grande sœur.

Je remercie mes amis et collègues de thèse, Marvin, ton calme olympien, ta patience, ton intelligence et ton pragmatisme m'ont précieusement accompagnée. Tu n'as jamais fait de rétention de connaissance, tu as toujours partagé de bon cœur tes compétences et tu nous as tous apporté un énorme soutien scientifique. Bien sûr, ton amitié et ta bienveillance sont aussi solides que tes compétences.

Juliette F, merci de m'accepter comme amie alors que je m'habille sur les sites chinois, que je suis plus intéressée par l'état d'hydratation de mes cheveux que par toute considération politique, que je suis bordélique et toi si pragmatique, que je suis incapable d'ordonner nos dossiers communs, que je me suis servie pendant trois ans de ton bureau comme une extension du mien, que j'ai bouffé tous tes gâteaux alors que tu en avais bien plus besoin que moi, merci de ta bienveillance, ta patience, ton intelligence supérieure mise au service de nous tous. Et merci de m'avoir fait l'honneur d'écrire un article avec moi, je suis fière de nous, et tellement fière de toi.

Juliette G, merci petite puce pour ton œil de linx en toutes circonstances et pour ta confiance. Tu es la meilleure de nous toutes.

Baptiste, tu grandis si vite 🔅 ne change pas. Tu es si jeune si courageux et si mature. Merci d'être la comme un petit frère !

Kathleen mon petit volcan, quel bonheur de t'avoir vue travailler ces 4 dernières années, quel courage quelle hargne, quelle intelligence, quelle gentillesse, quelle bienveillance avec les étudiants et paradoxalement quelle douceur ②. Merci d'être mon amie en toutes circonstances.

Marion, tu as été mon pilier ces dernières années tu as été la pour moi qd j'avais les deux poignets cassés pendant mon master 2, tu as souvent été mes mains ... tu m'as tout appris de mes premières manips, mais surtout tu es mon amie, à jamais. Tu es la femme la plus intelligente que j'ai rencontré.

Léa, je n'oublierai jamais avoir refait le monde avec toi autour d'un verre après de lourdes journées de manips, merci pour ça.

Marine, Ophélie et Nicolas, vous êtes une relève soudée, merci pour ça.

Nicolas Hipp, tu es papa deux fois, et jamais bien loin pour nous avec toujours une oreille bienveillante et attentive merci pour cela.

Gévorg et Roselyne, merci pour nos aventures et votre amitié, qui j'espère se poursuivra de longues années.

Rachel, c'était le feu entre nous, mais merci pour tes combats au quotidien qui améliorent nos conditions de travail tous les jours. Merci pour la belle personne que tu es et prends soin de toi.

Joelle, merci d'être ma bouée de sauvetage quand absolument plus personne n'a de solution.

Yoni, merci énormément d'avoir facilité tellement de choses autant pour mes projets que pour le fonctionnement du labo.

Je remercie Simon Léonard pour ses précieux conseils en bio inf et pour son aide précieuse lors de la nécessité des analyses « coup de bourre ».

Je remercie Julien St Vanne qui a été notre pilier pour les analyses bio-informatiques lors du reviewing de l'article. Merci Julien j'ai hâte de reprendre tout cela avec tes tutos .

Et puis il y a les anciens...

**Charles**, ton amitié, ta bienveillance, tes précieux conseils, ta protection fraternelle m'ont sortie de la déroute à plusieurs reprises. Merci pour ça, ce que tu as fait n'est pas quantifiable. Merci, Merci, Merci.

Merci à ces femmes indestructibles, courageuses, et si admirables qui sont mes amies et mes piliers : Aurélie, mon amie de toujours, rien ne nous a jamais séparées malgré les épreuves du temps, on parlait petites que tu finirais ta vie dans une maison en Bretagne et moi en Ecosse, on a refait le monde 100000 fois, on a vécu des aventures folles, des drames, en se tenant toujours la main merci pour ca. Hélène et Caroline, vous m'avez montré le we de nos retrouvailles que rien n'avait changé et que vous étiez la comme dix ans auparavant je ne l'oublierai jamais. Elsa, tu sais toute la considération, l'amitié, l'admiration et l'amour que je te porte... Merci pour l'aide non quantifiable que tu m'as apportée aussi bien sur le plan scientifique, que matériel et humain. Merci d'être mon amie depuis notre première rencontre et merci de n'en avoir jamais eu marre ③. Alice, il nous reste tellement à vivre toutes les deux... tu es touchante de courage et de bonté. Gwladys j'ai tellement hâte de te retrouver, j'aime tellement notre amitié, nos conversations, ta douceur et ta gentillesse. Solène-Florence, Lalie, vous avez été de vraies grandes sœurs pour moi ces dernières années je garde une affection et une admiration sans limite pour les femmes que vous êtes et que vous représentez. Je voudrais remercier Cécile, le plus gros coup de foudre d'amitié de ma vie, qui réopère à chaque retour sur Marseille, tu es ma blonde volcanique à jamais et tu restes un pilier pour moi. Je remercie Lorraine, qui m'accepte avec bonheur sans ce cercle marseillais que j'aime tant. Jenny, malgré le fait que je n'ai pas été toujours là pour toi, toi tu l'as été et tu l'es toujours, merci mais comment être une aussi bonne amie que toi ? tu places la barre tellement haut : merci (2). Laure, je pensais que c'était la fin des 400 coups avec toi depuis quelques années, ça risque de reprendre encore plus fort...

Je voudrais remercier en particulier **Othman, Florent, Pierre, Tristan, Marvin, Jean Baptiste D**, qui m'ont tant apporté, en étant plus brillants et plus courageux que moi, sans jamais me le faire ressentir (2), vous m'avez toujours soutenue dans mes envies et mes rêves, vous m'avez considérée, encouragée, guidée jamais rabaissée, vous avez cru en moi, et vous m'avez valorisée en tant que professionnelle en tant que personne et en tant qu'amie. Si l'humanité était vous il n'y aurait pas d'injustice, pas de sexisme.

**Tristan**, merci d'être l'homme le plus drôle du monde, et merci de m'aimer alors que tu me connais par cœur, on ne s'est jamais lâchés on a construit nos deux mondes opposés et on s'est tellement apporté. Je suis tellement fière de l'homme que tu es et je suis tellement fière d'être ta plus fidèle et plus proche amie .

Je voudrais remercier deux grands boxeurs qui mont fait l'honneur de m'entrainer et de participer à ma construction personnelle : **Fouad** tu restes un ovni dans ce monde de par ton talent, merci de m'avoir accueillie et fait progresser à tes côtés. **Marcel**, au-delà de la boxe tu m'as forcée à me dépasser, qd je vais au-delà du possible, je me dis que tu es devant moi et que tu me dis « allez, encore, lâches rien ».

Je voudrais remercier **Simon**, dont le soutien, la bienveillance et les longues discussions d'été seront, je l'espère, le point de départ d'une grande et longue amitié.

### Abstract :

Le lymphome folliculaire est l'un des exemples paradigmatiques des cancers dépendant d'un microenvironnement tumoral spécifique. Il comprend notamment des fibroblastes associés au cancer (CAF) émergeant de la reprogrammation des cellules stromales lymphoïdes ou de leur(s) précurseur(s) dans le ganglion et la moelle. Les cellules stromales dans le lymphome folliculaire soutiennent directement la croissance des cellules B malignes et orchestrent la niche tumorale en contribuant, par un dialogue bidirectionnel, au recrutement et à la polarisation d'autres sous-populations immunitaires. Une meilleure compréhension des voies de signalisation et des mécanismes moléculaires responsables du remodelage des cellules stromales et de la cinétique de ce dernier seraient utiles pour définir de nouveaux de nouvelles approches margueurs prédictifs et thérapeutiques dans се cancer encore incurable. Les modèles in vitro récapitulant les forces biomécaniques, le microenvironnement cellulaire et l'organisation spatiale des lymphomes B restent rares, alors que tous ces paramètres constituent des éléments clés déterminants dans la lymphomagenèse et la résistance aux médicaments. En utilisant une méthode microfluidique basée sur l'encapsulation de cellules dans des microsphères d'alginate perméables, nous avons développé un nouveau modèle 3D incorporant des cellules B de lymphome, de la matrice extracellulaire et/ou des cellules stromales d'amygdale. Nous avons montré que les cellules de lymphome B étaient capables de former des sphéroïdes cohésifs résultant de la surexpression des composants de la matrice extra-cellulaire. De plus, dans ce modèle, les cellules stromales s'auto-organisent pour initier la prolifération des cellules tumorales. La culture 3D induit une résistance à l'agent chimiothérapeutique classique doxorubicine, mais pas à l'inhibiteur de BCL2 ABT-199, identifiant cette approche comme un modèle in vitro pertinent pour comprendre l'activité des agents thérapeutiques. L'analyse RNAseq a mis en évidence des modulations des voies de signalisation similaires à celles observées dans les cellules primaires de lymphome folliculaire. Enfin, notre modèle a permis la survie à long terme in vitro de cellules B primaires de lymphome folliculaire. Nous proposons ainsi un nouveau modèle 3D imitant la niche tumorale du lymphome et permettant d'étudier la relation dynamique entre les cellules tumorales et leur microenvironnement pour les tests de nouveaux médicaments anticancéreux.

En parallèle, nous avons pour la première fois, initié la caractérisation d'une niche tumorale jusqu'alors jamais explorée dans le lymphome folliculaire, située dans le tissu adipeux péri-ganglionnaire. Dans cette niche, les cellules tumorales évoluent au contact de cellules stromales adoptant un phénotype CAF associé aux tumeurs solides, et de macrophages associés aux tumeurs de phénotype M2. Les lymphocytes T y présentent une signature immunosuppressive et les cellules tumorales y adoptent un profil métabolique quiescent et une différentiation plasmocytaire.

Follicular lymphoma is the most prototypical B-cell lymphoma that depends on a specific tumor microenvironment, including cancer-associated fibroblasts (CAFs) arising from the reprogramming of lymphoid stromal cells or their precursors in the lymph node and bone marrow. Stromal cells in follicular lymphoma directly support the growth of malignant B cells and orchestrate the tumor niche by contributing, through a bidirectional dialogue, to the recruitment and polarization of other immune subpopulations. A better understanding of the signaling pathways, molecular mechanisms and kinetics of stromal cell remodeling would be instrumental in defining new predictive markers and therapeutic approaches in this still malignancy. In *vitro* models capturing the biomechanical lethal forces, cellular microenvironment and spatial organization of B-cell lymphomas remain scarce, while all these parameters are key determinants of lymphomagenesis and drug resistance. Using a microfluidic method based on cell encapsulation in permeable alginate beads, we developed a new 3D model incorporating lymphoma B cells, extracellular matrix and/or tonsil stromal cells. We showed that B-cells were able to form cohesive spheroids resulting from the overexpression of extracellular matrix components. Furthermore, in this model, stromal cells self-organize to initiate tumor cell proliferation. The 3D-culture induced resistance to the classical chemotherapeutic agent doxorubicin, but not to the BCL2 inhibitor ABT-199, identifying this approach as a relevant *in vitro* model to evaluate the activity of some? therapeutic agents. RNAseq analysis revealed modulations of signaling pathways similar to those observed in primary follicular lymphoma cells. Finally, our model supported long-term survival of primary follicular lymphoma B cells. We thus propose a new 3D-model mimicking the lymphoma tumor niche and allowing for the study of the dynamic relationship between tumor cells and their microenvironment and the testing of new anticancer drugs.

In parallel, we have for the first time initiated the characterization of a tumor niche never explored before in follicular lymphoma, located in the peri-nodular adipose tissue. In this niche, tumor cells evolve in close contact with stromal cells adopting a CAF phenotype associated with solid tumors, and macrophages presenting with M2 phenotype. Also, T cells expressed an immunosuppressive signature and tumor cells adopt there a quiescent metabolic profile and a plasma cell differentiation.

### Table des matières

Abstract :	7
Table des abbréviations	13 -
Avant-propos	19 -
Introduction	21 -
A. Organes responsables de la maturation du lymphocyte B	21 -
1. La moelle osseuse	- 21 -
a) Vascularisation et innervation	21 -
b) Localisation des cellules hématopoïétiques	22 -
c) Les trois lignées hématopoïétiques	24 -
d) Organisation des populations de cellules lymphoïdes matures dans la moel	le 26 -
e) Le tissu adipeux	27 -
f) Caractérisation transciptomique des différentes populations stromales méd	lullaires 28 -
g) Organisation des différentes niches stromales	31 -
2. Le ganglion	32 -
a) Généralités	32 -
b) Charpente vasculaire et réticulaire	33 -
c) Organisation générale de la population lymphocytaire T et myéloïde	35 -
d) Caractérisation des différentes populations stromales des organes lymphoï	des secondaires - 37 -
e) Précurseurs mésenchymateux des cellules stromales lymphoïdes	39 -
f) Organisation des différentes niches stromales	39 -
g) Des cellules longtemps apparentées aux cellules stromales : les LECs	42 -
B. Implication des cellules stromales dans la maturation et l'activation des lympl	10cytes B 43 -
1. Dans la moelle osseuse	43 -
a) Maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse	43 -
b) L'implication des différentes niches stromales de la moelle dans la maturat	ion B 46 -
2. Dans le ganglion	49 -
a) Les différents états de maturation du lymphocyte B dans le ganglion	49 -
b) L'intervention cruciale du microenvironnement stromal	52 -
c) Rôle des FDCs dans la maturation des lymphocytes B	53 -
d) Les MRCs	54 -
e) Une niche orchestrant un positionnement stratégique des lymphocytes B	55 -
f) Pourquoi ces interactions restent-elles si difficiles à étudier ?	56 -

C. Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers ni par ses interactions avec le microenvironnement	veaux - 61 ·
1. Généralités et épidémiologie	- 61
a) Une entité clinique hétérogène	- 61
b) Facteurs de risques	- 61
c) Aspects pronostigues et thérapeutiques	- 62 -
<ol> <li>Toutes les routes mènent à l'hétérogénéité tumorale dans le lymphome folliculair</li> </ol>	e 64
a) Lymphomagénèse	64 -
1. Initiation de la lymphomagénèse	64 ·
2. Un profil moléculaire tumoral complexe s'inscrivant dans un contexte d'hété cinétique et spatiale	rogénéité 66 ·
3. Une plasticité cellulaire tumorale transcriptionnelle	68 ·
<ol> <li>Une hétérogénéité cytologique qui constitue le premier degré de l'hétérogér tissulaire:</li> </ol>	iéité 69 ·
b) Hétérogénéité du microenvironnement de soutien du FL	71 ·
5. Le microenvironnement lymphocytaire T	71 ·
6. Le microenvironnement macrophagique	73 -
7. Mécanismes de l'activité pro-tumorale des cellules stromales	76 ·
(a) Sur le plan fonctionnel	76 ·
(b) Les interaction B/ stroma dans le lymphome folliculaire: comment les ét	udier - 78
3. Concept d'hétérogénéité tissulaire dans le lymphome folliculaire	85 ·
a) Introduction au concept d'hétérogénéité tissulaire	85 ·
b) Comment relier l'hétérogénéité tumorale à celle de son microenvironnement ?	86 ·
c) Le microenvironnement aura t-il le dernier mot sur l'hétérogénéité tumorale ?	100 -
Objectifs	101
Résultats	103
A. Article: A novel 3D culture model recapitulates primary FL B cell features and promo survival	tes their 103 ·
B. Organisation <i>in situ</i> de la niche tumorale du LF	169 -
1. Caractérisation des niches stromales intra et péri-ganglionnaires	171 -
a) Méthode	171 -
b) Résultats	173
2. Caractérisation transcriptionnelle du microenvironnement des zones 1 et 2	180
a) Méthode	180
b) Résultats	182
3. Etude de la relation tumeur/TME dans les follicules péri-ganglionnaires tumoraux	- 185

a) Méthode	185 -
b) Résultats	186 -
4. Discussion	189 -
Discussion des résultats et perspectives	199 -
A. Vers une meilleure caractérisation des niches stromales de LF :	199 -
1. La dépendance d'une lignée lymphomateuse B pour le stroma en 3D:	199 -
2. Un modèle d'étude qui permet d'étudier et de caractériser les FRCs dans l'ensen niches stromales du LF	nble des 201 -
3. Les FDCs dans le LF : pourquoi leur hétérogénéité nous échappe t-elle encore:	206 -
B. Deux niches microenvironnementales déterminant un profil d'expression tumoral p 214 -	oarticulier
C. Perspectives	221 -

# Table des abbréviations

# Α

Acan	Agrecan
Acta2	Actin Alpha 2, Smooth Muscle
AICDA	Activation Induced Cytidine Deaminase
AKT	A Threonine protein Kinase
APRIL	A PRoliferation-Inducing Ligand
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A
ASCs	Adipose Stromal Cells
В	
B2M	Beta 2 Microglobuline
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BAFF	B-cell Activating Factor
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
BCL6	B-Cell Lymphoma 6
BCR	B Cell Receptor
BLyS	B Lymphocyte Stimulator
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSC	Bone Marrow Stromal Cells
ВТК	Bruton Tyrosine Kinase
BTLA	B- and T-lymphocyte Attenuator
С	

### 

CAR	Chimeric Antigen Receptor
CARD11	Caspase Recruitment Domain Family Member 11
CCL17	C-C Motif Chemokine Ligand 17
CCL2	Chemokine Ligand 2
CCL21	C-C chemokine ligand type 21
CCL22	C-C chemokine ligand type 22
CCL5	C-C Motif Chemokine Ligand 5
CCL7	C-C Motif Chemokine Ligand 7
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD10	Cluster de Différentiation 10
CD11b	Cluster de Différentiation 11b
CD157	Cluster de Différentiation 157
CD169	Cluster de Différentiation 169
CD204	Cluster de Différentiation 204
CD206	Cluster de Différentiation 206
CD21	Cluster de Différentiation 21
CD31	Cluster de Différentiation 31
CD34	Cluster de Différentiation 34
CD4+ TMEM	Cluster de Différentiation 4
CD40L	Cluster de Différentiation 40L
CD47	Cluster de Différentiation 47
CD58	Cluster de Différentiation 58

CD70	Cluster de Différentiation 70
CD79a	Cluster de Différentiation 79a
CD8+ TMEM	Cluster de Différentiation 8+
cDC CG	conventional Dendritic Cells Centre Germinatif
CHOP R-CHOP/CVP	Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone
~~~~	Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisone et Rituximab
CITE-seq	Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing
CLEC-2	C-type lectin-like type II transmembrane receptor
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMH I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMH II	Complexe Majeur d'Histocomplité de classe II
COL2A1	Collagen Type II Alpha 1 Chain
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigene
CR1/CR2	Complement Receptor type 1
CR30	Complete Response rate at 30 months
CDEBBD	Cellule Reticulaire exprimant CXCL12
CSE-1	Colony-Stimulating Factor 1
CSF-1R	Colony-Stimulating Factor 1 Receptor
CSMs	Cellules stromales mésenchymateuses
Cspg4	Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4
CTSS	Cathepsin S
CXCL1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCL13	C-X-C Motif Chemokine Ligand 13
CXCL16	C-X-C Motif Chemokine Ligand 16
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
CXCR5	C-X-C Motif Chemokine Receptor 5

# D

DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin
DTX1	Deltex E3 Ubiquitin Ligase 1
DX5	DEAD box protein 5
EBF1	Early B-cell factor 1
Ebi2	Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2
EP300	E1A Binding Protein P300
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2

# F

FAK	Focal Adhesion Kinase
FDC	Follicular Dendritic Cells
FL-CAF	Follicular lymphoma Cancer Associated Fibroblast
FLT3	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3
FLT3L	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3 Ligand
Fn1	Fibronectin 1

FOXO1 FoxP3 FRANCIM FRCs	Forkhead Box O1 Forkhead Box P3 Réseau français des registres de cancers Fibroblastic reticular Cells
G G-CSF GG	Granulocyte colony-stimulating factor Ganglion
H HEL HEV HGF CSH HVEM	High Endothelial Lymphatics High Endothelial Veinules Hepatocyte Growth Factor Cellules Souches Hématopoiétiques Herpesvirus entry mediator
Ι	

ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IDO	Indoleamine-2,3-Dioxygenase
IFN-γ	Interferon
IFRC/IFNAR1	Interferon alpha and beta Receptor subunit 1
IgM	Immunoglobuline M
IL-10	InterLeukine-10
IL-12	InterLeukine-12
IL-13	InterLeukine-13
IL-15	InterLeukine-15
IL4	InterLeukine-4
Il-6	InterLeukine-6
IL-7	InterLeukine-7
ILC	Innate Lymphoid Cells

### J Jag JA

ag1	Jagged Canonical Notch Ligand 1
AK	Janus Kinase 2

# L

KMT2D/MLL2	Lysine N-methyltransferase 2D
LEC	Lymphatic Endothelial Cell
LepR	Leptin Receptor
LF	Lymphome Folliculaire
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen-1
LLT1	Lectin Like Transcript-1
LT	Lymphotoxine
LYVE-1	LYmphatic Vessel Endothelial-1

# M

m7-FLIPI	m7-FL International Prognostic Index
MALC	Multicellular Aggregates of Lymphoma Cell
МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAT	Macrophages Associés aux Tumeurs
Mcam	Melanoma Cell Adhesion Molecule
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MedRCs	Medullary Reticular Cells
MEF2B	Myocyte Enhancer Factor 2 B
MFGE8	Milk Fat Globule EGF And Factor V/VIII Domain Containing
МО	Moelle Osseuse
MPL	Myeloproliferative Leukemia Protein
MPP	Progéniteur Multipotent
MRC	Marginal Reticular Cells
mTORC1	Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1
MYD88	MYeloid Differentiation factor 88
Myh11	Myosin heavy Chain 11
Ν	
NG2	Neuron-alial antigen 2
1102	incuron-ginar antigen 2
0	
OPN	Osteomontine
OFIN	Osteopontine
Р	
ΡΑΥ5	Paired Box 5
PR	PlasmaBlasta
PCR	Polymerase Chain Reaction
nDC	nlasmocytoid Dendritic Cell
PDGFRß	Platelet-Derived Growth Factor Recentor B
PDX	Patient-Derived Xenografts
PEG	PolyEthylène Glycol
PFS	Progression Free Survival
PGE2	ProstaGlandine E2
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
POD24	Progression Of Disease within 2 years
PPARy	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor v
РТН	ParaTHormone
- PU.1	SPI1 (Spi-1 Proto-Oncogene)
R	
RAG-1 et -2	Recombination Activating Gene-1
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand
RGD	Tripentide constitué d'arginine de glycine et d'acide aspartique

RRAGC Ras-Related GTP binding C

# S

S100 Calcium Binding Protein A4
G Protein Subunit Alpha 13
Stem Cell Factor
Single-cell RNA sequencing
Semaphorin 3C
SIgnal Regulatory Protein a
SRY-Box Transcription Factor 9
Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich
Signal Transducer and Activator of Transcription 6
Spleen tyrosine kinase

### Т

TBRC	T zone Border Reticular Cells
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TFH	T Follicular Helper
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TGF-βR TLR TME	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2 Toll like receptor MicroEnvironnement Tumoral
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFRSF14	TNF Receptor Superfamily Member 14
TNFSF11	TNF Superfamily Member 11
TNF-α	Tumor Necrosis Factor
TPO	Thrombopoietin
TRC	T cell reticular cells
Tregs	Lymphocytes T régulateurs

# U

UBE2A	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 A

### V

VCAM-1+	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4	Integrins alpha-4/beta-1
VPREB	V-Set Pre-B Cell surrogate light chain 1

### W

Wnt

Wingless

### Y

YBX3

Y-Box Binding Protein 3

# CHAPITRE I INTRODUCTION

### Avant-propos

Les lymphocytes B dépendent physiologiquement du microenvironnement stromal et immun pour leur maturation, leur activation et leur survie. Ils prennent naissance dans la moelle et connaissent différents stades de maturation pour parachever leur développement dans le ganglion lymphatique. Les cellules stromales organisent des compartiments anatomiques spécifiques au sein de la moelle osseuse et des organes lymphoïdes secondaires où elles déterminent le comportement des cellules B matures physiologiques. Plus précisément, les cellules stromales lymphoïdes forment des compartiments phénotypiquement hétérogènes qui favorisent de manière variable la survie, l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. À leur tour, les lymphocytes B activés déclenchent un remodelage en profondeur des réseaux de cellules stromales lymphoïdes dans les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Les différentes niches jouent donc un rôle crucial de par leur hétérogénéité pour les différentes étapes de maturation du lymphocyte B. Le lymphome folliculaire (LF) est le lymphome indolent le plus fréquent. Les deux niches tumorales de ce lymphome jusqu'alors identifiées sont le ganglion et la moelle. Il touche le lymphocyte B dont la première altération génétique survient dans la moelle à un stade précoce de maturation. Le LF est le paradigme le représentatif d'une néoplasie des cellules B dépendant entièrement d'un plus microenvironnement tumoral (TME) spécifique, comprenant des fibroblastes associés au cancer (CAF) émergeant de la reprogrammation des cellules stromales lymphoïdes du ganglion et de précurseurs locaux mal caractérisés dans la moelle. Les CAFs du LF soutiennent directement la croissance des cellules B malignes et orchestrent la niche tumorale en contribuant, par un dialogue bidirectionnel, au recrutement et à la polarisation des souspopulations lymphocytaires et myéloïdes du TME. Le lymphocyte B tumoral de LF présente une grande plasticité phénotypique dont le profil transcriptionnel et protéique peut être assimilé à des stades de maturation physiologiques du lymphocyte B. A cette hétérogénéité phénotypique, vient s'ajouter une hétérogénéité génétique, en partie liée à l'accumulation d'hypermutations somatiques, pouvant générer une population tumorale hétérogène façonnant en retour le microenvironnement. Environ 20% des patients connaissent une progression rapide de la maladie après le traitement de première ligne. Par ailleurs, la transformation histologique constitue un événement majeur dans l'histoire naturelle du LF expliquant environ 40% des échecs au cours de la première année après l'initiation du traitement. L'enjeu crucial de l'étude de l'hétérogénéité tumorale et de son microenvironnement est de pouvoir identifier les niches tumorales hébergeant les cellules responsables de la récidive et de la transformation de la maladie en un lymphome plus agressif.

Dans cette introduction, nous avons dans une première partie décrit le processus de développement du lymphocytes B physiologique et ses interactions avec sa niche microenvironnementale pour chaque étape de son développement dans la moelle et dans le ganglion. Dans un deuxième temps, nous abordons le trajet du lymphocyte B tumoral dans le LF, depuis la première altération génétique survenant dans la moelle, jusqu'à son arrivée dans le ganglion. Nous décrivons ses rapports jusqu'alors identifiés avec le microenvironnement stromal et immun dans chaque niche tumorale tout en soulignant l'impact majeur de l'hétérogénéité tumorale sur la modulation des niches microenvironnementales et inversement. Nous évoquons également les différents modèles d'étude jusqu'alors mis en place pour étudier les différentes cibles thérapeutiques potentielles dans ce lymphome

### Introduction

### A. Organes responsables de la maturation du lymphocyte B

### 1. La moelle osseuse

Chez l'Homme adulte, la moelle hématopoïétique exerce sa fonction au sein du squelette axial, alors que chez la souris, tous les os sont un support d'hématopoïèse. La moelle osseuse représente une unité d'organisation comprenant la réunion de territoires intra osseux disjoints et de niches hématopoïétiques médullaires qui seront le support de l'hématopoïèse, et de la lymphopoïèse B. Ces niches sont irriguées par un réseau de capillaires sinusoïdes anastomotiques, elles sont délimitées par des travées d'os spongieux, et structurées par un réseau de fibroblastes. L'hématopoïèse médullaire s'effectue dans les logettes extra vasculaires comprenant une trame réticulaire, composée de protéines de la matrice extra cellulaire, qui va permettre aux cellules de s'ancrer et d'interagir entre elles.

#### a) Vascularisation et innervation

La vascularisation de la moelle permet le passage de substances labiles nutritives dans la cavité médullaire, et la libération des cellules matures dans le sang. Les artères nourricières de l'os donnent des ramifications centrales, puis des artérioles dirigées vers la périphérie des cavités osseuses, elles sont prolongées par des capillaires à endothélium continu, le plus souvent situés dans la corticale osseuse qui se transforment en sinusoïdes en pénétrant dans la cavité médullaire. Dans la région de l'endoste, les capillaires sont fréquemment anastomosés avec des capillaires issus du réseau périosté qui traversent obliquement la corticale<sup>1</sup>. Ainsi, une partie du sang artériel irriguant la moelle a préalablement irrigué l'os. Les sinusoïdes contournées qui prolongent les capillaires présentent de multiples divisions et anastomoses. Elles contiennent une couche discontinue de cellules endothéliales, une fine membrane basale et un revêtement extérieur incomplet de cellules réticulaires adventitielles couvrant environ 60% de la surface abluminale sinusoïdale<sup>2,3</sup>. Les sinusoïdes contournées sont collectées dans les sinusoïdes droites, puis dans les sinus centraux et dans les veines émergeant de l'os. Chaque bouquet de sinusoïdes contournées se jetant dans le même segment de sinusoïde droit est le lieu privilégié des migrations cellulaires trans endothéliales. Les lymphatiques sont absents dans la moelle, les sinusoïdes assurant leur fonction. Le réseau vasculaire médullaire est doublé d'un réseau nerveux avec des fibres myélinisées, amyéliniques, vasomotrices ou nociceptives. Les nerfs nociceptifs sont nécessaires à la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) et collaborent avec les nerfs sympathiques leur maintien dans la moelle osseuse <sup>4,5</sup>. D'autre part le système adrénergique est un déterminant majeur des capacités de renouvellement et de prolifération de HSCs<sup>6</sup>.

Comprendre cette vascularisation : permet d'envisager l'organisation des cellules souches hématopoïétiques.



**Figure 1** : Vascularisation de la moelle osseuse : les artères radiales relient les artères du périoste aux artères centrales, avant de donner les capillaires corticaux puis les sinusoïdes médullaires, qui se jetteront ensuite dans le réseau veineux 1.

#### b) Localisation des cellules hématopoïétiques

Les études sur la localisation des HSCs en fonction de leurs capacités de renouvellement et du degré d'hypoxie des niches s'avèrent être très controversées. Les résultats contradictoires s'expliquent en partie par l'étude de la localisation des HSCs après irradiation de la moelle puis transplantation de ces dernières dans la calvaria de souris<sup>7–9</sup>. De ce fait, les HSCs ont préalablement été identifiées dans la niche endostéale<sup>7,8 8–10</sup>, constituant en réalité la seule niche non remaniée après irradiation. D'autre part, la localisation de niches hypoxiques auparavant perçues en zone endostéale <sup>11,12</sup>, et identifiées comme ayant pu maintenir les HSCs en état de quiescence, sont partiellement relocalisées en zone péri sinusoïdale <sup>13,14</sup>. Une très récente étude, ne relie pourtant pas les capacités prolifératives des HSCs au degré d'hypoxie de la niche <sup>15</sup>. En effet, dans cette étude, il a été mené une observation microscopique dynamique en temps réel des HSCs sans irradiation préalable grâce au modèle murin Mds1<sup>GFP/+</sup> *Flt3*-Cre

identifiant les HSCs qui exprimeraient le gène *Mds1* et n'exprimeraient pas *Flt3*. Ainsi, ces cellules se trouveraient aussi bien à proximité des vaisseaux sanguins sinusoïdaux qu'au niveau de la surface endostéale, et les HSCs ne se localiseraient pas dans les niches de la moelle osseuse où l'hypoxie est la plus intense (**Figure 2**).



**Figure 2** : Mesure in vivo du taux d'oxygène présent autour des HSCs  $Mds1^{GFP/+}$  Flt3<sup>Cre</sup> (n=2, 15 cellules) et des HSCs et MPPs ou  $Mds1^{GFP/+}$  (n=2, 7 cellules) <sup>15</sup>.

En effet, une fraction de HSCs se développe de manière clonale dans des endroits spatialement restreints. Ces domaines ont des caractéristiques bien définies, car cette expansion se trouve presque exclusivement dans un espace de la moelle osseuse ayant une activité de remodelage osseux<sup>15</sup>. Pour visualiser les étapes du renouvellement osseux, l'équipe de Christodoulou et al a administré deux marqueurs (spectralement distincts) fixant le calcium à 48 heures d'intervalle, une imagerie a ensuite été réalisée pour visualiser l'os immédiatement après la deuxième injection. Les deux marquages signent la position de l'ancien et du nouveau front osseux, respectivement (Figure 3). Les zones osseuses suivantes ont ainsi été distinguées : type D (dépôt osseux prédominant), type R (résorption osseuse prédominante) et type M (mixte). En situation d'équilibre, les HSCs se trouvent en nombre similaire dans tous les types de cavités. Il est cependant remarquable qu'après activation avec le facteur de stimulation des colonies de granulocytes marqué par une molécule fluorescente (Cy/G-CSF), les cellules HSCs se trouvent presque exclusivement dans les cavités de type M (Figure 4). En revanche, les espaces ayant une faible activité de résorption osseuse n'abritent pas de HSCs en expansion. Ces résultats mettent en évidence une hétérogénéité jusqu'alors inconnue au sein du microenvironnement de la moelle osseuse, imposée par les étapes du renouvellement de l'os.



**Figure 3** : La double stratégie de marquage du calcium permet d'identifier les cavités de type D, M et R. Le marquage 1 (en bleu), administré 48 heures avant l'imagerie, montre l'ancien front osseux érodé, tandis que le marquage 2 (en rouge) administré juste avant l'imagerie montre le nouveau front osseux<sup>15</sup>.

Une explication serait que les HSCs murines lin–Sca1+c-Kit+ expriment le Récepteur Sensible au Calciums (CaSRs). En effet, dans les modèles CaSR–/–, les HSCs sont fortement diminuées et les HSCs CaSR–/– transplantées échouent à s'établir près de l'endoste <sup>16</sup>. A l'inverse, le traitement par un agoniste du CaSR améliore la prise de greffe<sup>17</sup>.



**Figure 4 :** Quantification des HSCs dans les cavités de type D, M ou R à l'état d'équilibre et après activation du Cy/G-CSF. n=4 souris par groupe, représentées sous forme de symboles différents. La ligne noire représente la moyenne, les barres d'erreur représentent la déviation standard<sup>15</sup>.

#### c) Les trois lignées hématopoïétiques

Les HSCs sont multipotentes et vont permettre en se divisant de constituer d'une part un pool de réserve de cellules de renouvellement et d'autre part, de donner les cellules des lignées érythroblastiques, granulocytaires, mégacaryocytaires, et lymphoïdes.

Les cellules de la lignée érythroblastique sont groupées en îlots au centre des espaces médullaires près des sinus <sup>18</sup> (**Figure 5 A et B**). Les macrophages sont situés au centre des îlots érythroblastiques, et aident les érythroblastes à expulser leurs noyaux avant de sortir de la moelle <sup>19</sup>. D'autre part, ils phagocytent les cellules anormales.

La lignée myéloblastique est volontiers éparse, et la maturation des granulocytes se fait de la périphérie vers le centre de la travée avec les myéloblastes, les myélocytes et les promyélocytes à proximité des travées osseuses<sup>18</sup>. Les cellules plus matures (myélocytes, métamyélocytes et granulocytes) se situent en revanche au centre des espaces médullaires (**Figure 6**)<sup>18</sup>.

Les mégacaryocytes sont isolés à distance des travées osseuses et près des sinus vasculaires<sup>1</sup>.



**Figure 5 :** Coloration HES d'une coupe de moelle osseuse, grossissement x20 en A, les flèchent indiquant de gauche à droite, un mégacaryocyte, un adipocyte, une travée osseuse et crop x40 en B, centré sur un îlot érythroblastique.



**Figure 6 :** Coloration HES d'une coupe de moelle osseuse, grossissement x40 en **A**, montrant des granulocytes matures (flèches) et x40 en **B**, montrant des granulocytes immatures, collés aux travées (flèches).

#### d) Organisation des populations de cellules lymphoïdes matures dans la moelle

Les lymphocytes T et B sont répartis de manière éparse, et représentent moins de 10% de la population générale.

Les plasmocytes ainsi que les mastocytes, très peu nombreux, sont situés dans les zones périvasculaires <sup>20</sup>. Les plasmocytes sont colocalisés avec les cellules stromales périsinusoïdales, des cellules T régulatrices de la MO (Tregs), des cellules dendritiques (CD) et des éosinophiles <sup>21,22</sup>. Ils reçoivent là d'importants signaux de survie tels que B-cell-activating factor (BAFF), l'interleukine-6 (IL-6), a proliferation-inducing ligand (APRIL), qui leur permettent de se différencier en plasmocytes sécrétant des immunoglobulines à longue durée de vie <sup>23–25</sup>. La MO contient également un nombre important de cellules B mémoires, dont la majorité sont des cellules résidentes non circulantes de la MO qui se fixent sur des cellules stromales exprimant Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) <sup>26</sup>. Ces lymphocytes B mémoires peuvent se différencier localement en plasmocytes. Enfin, dans diverses conditions dysimmunitaires, la MO peut contenir des structures de type centres germinatifs (CG), contenant des cellules dendritiques folliculaires (FDCs) et des cellules T auxiliaires folliculaires (TFH) <sup>27</sup> localisées dans des régions centro-trabéculaires.

Les cellules T CD8+ naïves se regroupent selon un rapport 10:1 autour des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) <sup>28</sup>. Les cellules T CD8+ mémoires se localisent à proximité des sinusoïdes et des cellules stromales VCAM-1+ périvasculaires qui assurent leur survie et leur maintien en produisant les interleukines IL-7 et IL-15 <sup>29,30</sup>. Les cellules T CD8+ mémoire produisent le tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), qui peuvent réguler ou perturber le maintien des HSCs, selon la quantité produite <sup>31,32</sup>.

Les cellules T CD4+ mémoire sont colocalisées avec les cellules stromales VCAM-1+, qui produisent également de l'IL-7. Elles sécrètent des cytokines nécessaires au maintien des HSCs, telles que l'IL-3 et le facteur GM-CSF <sup>33,34</sup>.

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) préservent l'hématopoïèse normale grâce à leur fonction de suppression des lymphocytes T <sup>35</sup>.

Enfin, la MO contient également des cellules T  $\gamma\delta$  matures <sup>36</sup>, des cellules T Natural Killer (NK) <sup>37</sup> et des cellules lymphoïdes innées , mais on sait peu de choses sur leurs localisations et fonctions précises <sup>38</sup>.

#### e) Le tissu adipeux

La décroissance du compartiment cellulaire hématopoïétique va de pair avec une augmentation du compartiment adipeux de la moelle avec l'âge <sup>39</sup>. Cette involution adipeuse peut être quantifiée histologiquement, en mesurant le pourcentage de volume occupé par les adipocytes par rapport au tissu médullaire total dans la pièce osseuse. Conformément à cette idée, chez les souris irradiées, l'implantation de cellules souches hématopoïétiques avec des progéniteurs adipogènes ou des pré-adipocytes entraîne une régénération réduite de la population de cellules souches hématopoïétiques <sup>40</sup>. À l'âge de 25 ans, le volume adipocytaire occupe 50 à 70 % du volume total de la moelle osseuse <sup>41</sup>. Cette augmentation de la masse adipeuse s'explique en partie par une augmentation du volume des espaces médullaires au cours du vieillissement, du fait de la diminution du volume osseux. Elle est particulièrement marquée dans l'os ostéoporotique<sup>42</sup>. La culture de cellules mononucléées de MO de lapin sur des milieux conditionnés par des adipocytes humains ou de lapin entraîne une réduction significative du nombre de cellules pré-pro-B CD79a+, ce qui indique que les adipocytes sont aussi capables d'inhiber la lymphopoïèse B par la sécrétion de facteurs solubles <sup>43 44</sup>. D'autre part, le blocage de la différenciation des précurseurs mésenchymateux de MO par l'utilisation d'inhibiteurs de PPARy, ou en bloquant le facteur de transcription A-ZIP/F1 chez la souris, a permis la restauration d'une hématopoïèse plus efficace après transplantation 40 45,46.

En revanche, une étude récente, montre que la restauration adipocytaire peut récupérer une myélo-érythropoièse déficiente. En effet, il a été montré dans un modèle murin de leucémie myéloïde aigue, que la suppression des adipocytes de la moelle altérait la maturation myélo-érythroïde normale, alors que l'administration de PPARy restaurant la maturation adipocytaire, sauvait la maturation myélo-érythroïde physiologique et réprimait la croissance leucémique <sup>347</sup>. Il est d'autre part intéressant de noter que des îlots lymphoïdes, constitués de GC fonctionnels peuvent être présents dans 1 à 2 % des cas au sein de la moelle, au centre des espaces médullaires, notamment chez les personnes âgées avec une importante involution adipeuse <sup>27</sup>. Bien que sécrétant des quantités moindres de TNF et de plus grandes quantités d'IL6 <sup>48</sup> et malgré l'identification de plusieurs spécificités du tissu adipeux en fonction de sa localisation chez l'humain, il convient donc de mentionner que le tissu adipeux peut héberger des structures lymphoïdes matures capables de réponse antigénique <sup>49</sup>.

Il est donc important de rester prudent quant au rôle précis que jouent les adipocytes de moelle dans l'hématopoïèse et la lymphopoïèse B, les travaux précédemment décrits ayant été majoritairement menés chez des souris irradiées. On peut émettre l'hypothèse que les

adipocytes jouent peut-être un rôle de « protecteurs d'une hématopoïèse myéloérythoïde anormale », sachant que la probabilité qu'elle s'altère avec l'âge augmente. Ces adipocytes sont d'autre part capable d'accueillir des cellules B matures, mais sont peut-être également des « régulateurs » de la maturation lymphocytaire B.

En outre, les adipocytes semblent réguler différemment la maintenance des HSCs à court et à long terme. Dans une étude de coculture adipocytes /HSCs, les adipocytes ont d'abord induit un déclin de prolifération des HSCs les deux premières semaines, puis une augmentation de leur nombre les semaines suivantes, suggérant que les adipocytes de moelle peuvent améliorer le maintien des HSCs à long terme chez l'homme <sup>50</sup>.

#### f) Caractérisation transciptomique des différentes populations stromales médullaires

Classiquement, la fonction et l'architecture des niches de la moelle osseuse ont été étudiées par des approches génétiques, en utilisant des systèmes rapporteurs comme le système Cre/lox, ciblant des expressions géniques. Les premières études qui ont caractérisé l'expression de CXCL12 dans la moelle osseuse à l'aide de souris knock-in ont pu montrer que ce sont principalement les cellules stromales périvasculaires qui produisent cette cytokine <sup>51</sup>. Ces cellules ont été nommées CXCL12-abundant reticular cell (CAR), elles se caractérisent par leur morphologie distincte des cellules stromales s'enroulant autour des vaisseaux ou péricytes. De plus, Nagasawa et Morrison ont permis l'identification d'un réseau fortement interconnecté de cellules péri-sinusoïdales de la lignée mésenchymateuse <sup>13,51</sup>, qui expriment de grandes quantités de SCF et de CXCL12 ainsi que le récepteur de la leptine (LepR). Une délétion génétique de SCF et de CXCL12 dans ces cellules LepR+ a montré leur fonction cruciale dans le maintien des HSCs 52,53. Ces résultats concordent avec des études montrant une localisation préférentielle des HSCs dans le compartiment péri sinusoïdal <sup>13,51,54,55</sup>. Un chevauchement entre les cellules Lepr+ et CAR a été suggéré, mais ce n'est qu'avec l'avènement des récentes technologies single cell RNA-sequencing (scRNAseq), ou étude du transcriptome à l'échelle de la cellule unique, qu'il a été possible d'accéder à la caractérisation de ces populations. Le scRNAseq des cellules exprimant le récepteur Lepr (modèle de souris Lepr-Cre) et la comparaison avec d'autres données scRNAseq publiées sur les cellules stromales de la MO ont montré que cette population comprend deux compartiments : d'une part un compartiment de cellules exprimant faiblement l'ARNm Lepr mais exprimant les marqueurs de la lignée ostéoblastique, tels que l'osterix, la phosphatase alcaline et l'ostéopontine <sup>56–58</sup>, et d'autre part, un compartiment de cellules exprimant fortement Lepr, ainsi que des marqueurs adipogènes, tels que l'adiponectine ou la lipoprotéine lipase. Les sous-populations ont donc été désignées respectivement comme les cellules Adipo-CAR et Osteo-CAR. Bien que la population Lepr-Cre soit composée des deux types cellulaires Adipo-CAR et Osteo-CAR, les cellules Osteo-CAR présentent des niveaux d'ARNm Lepr nettement plus faibles et sont donc susceptibles de n'être que partiellement représentées dans le modèle Lepr-Cre. D'autres études menées par Nagasawa et Frenette ont révélé que ces cellules stromales sont en fait des cellules souches/progénitrices mésenchymateuses (CSMs) capables de se différencier en cellules de lignées adipocytaires, ostéoblastiques et chondrocytaires.<sup>59,59,60</sup> Alors que Tikhonova et al. ont exploité le Cre-labeling spécifique des lignées vasculaires (VE-Cad+), périvasculaires (LepR+) et ostéoblastiques (Col2.3+) pour étudier spécifiquement des sous-types de niche prédéfinis, Wolock et al. se sont intéressés à l'ensemble des cellules de la lignée mésenchymateuse <sup>57</sup>, tandis que Baccin et al. et Baryawno et al. ont réalisé le scRNAseq de toutes les populations non hématopoïétiques (donc mésenchymateuses et endothéliales) de l'os et de la moelle osseuse<sup>56,61</sup>.

Cell type	Alternative annotation	Likely population marked by Cre/ GFP-reporter	Key cytokines/ chemokines/ hematopoietic factors	Signature genes	Localization
Sinusoidal endothelial cells		VE-Cad-Cre	Ang, Dll1, Dll4	Emcn, Stab1, Stab2	Web-like structures throughout the BM
Arterial endothelial cells		VE-Cad-Cre	Dll1, Dll4, Pdgfa	Ly6a, Cav1, Cd34, Gja4, Gja5	Aligned in diaphyseal direction
Preadipocytes		Lepr-Cre Adipoq-Cre Pdgfra-Cre	Cxcl12, Adipoq	Lepr, Adipoq, Cebpb, Fosb, Junb	Perisinusoidal
Adipo-CAR cells	LEPR+ cells, Preadipocytes, Nes-GFP <sup>dim</sup> ?	Cxcl12:GFP Lepr-Cre Adipoq-Cre Pdgfra-Cre	Cxcl12, Kitl, II7, II15, II34, Bmp4, Ccl2, Ccl19, Csf1, Cxcl14, Agt, Angpt1, Angpt2, Adipoq	Lepr, Lpl, Adipoq, Mgp, Esm1	Perisinusoidal
Osteo-CAR cells	LEPR+ cells, Osteo-lineage cells, Lepr-MSC4 Nes-GFP <sup>dim</sup> ?	Cxcl12-GFP Lepr-Cre? Osx-Cre? Pdgfra-Cre	Cxcl12, Kitl, II7, II15, II34, Ccl2, Ccl19, Csf1, Cxcl14, Angpt1	Wif1, Spp1, Ibsp, Cd200, Sp7, Alpl, Esm1	Periarteriolar, nonvascular, trabecular region
(Pre)-osteoblasts		Col1a1 (Col2.3)-Cre Osx-Cre Ocn-Cre Pdgfra-Cre		Bglap, Bglap2, Col1a1, Car3, Sp7, Sparc, Alpl	Endosteum
(Pro)-chondrocytes		Col2a1-Cre		Acan, Col2a1, Sox9	Epiphysis
Arterial fibroblasts	PαS cells	ll33-GFP Col1a1 (Col2.3)-Cre? Pdgfra-Cre	II33, Cxcl1, Ccl11, Ccl7, Angptl1, Angptl2, Igf1, Bmp7, Fgf1	Thy1, Dcn, Sparc, Cd34, Ly6a, Col3a1, Eln	Periarteriolar
Fibroblast-like cells	PαS cells	ll33-GFP Col1a1 (Col2.3)-Cre? Pdgfra-Cre	II33, Cxcl1, Ccl11, Ccl7, Angptl1, Angptl2, Igf1, Fgf1	Thy1, Dcn, Sparc, Cd34, Ly6a, Col3a1, Eln, Fbn1	Stroma Epiphysis Periosteum
Nestin/NG2+ cells	Nes-GFP <sup>Bright</sup> NG2-Cre <sup>ERTM</sup>	Nes-GFP NG2-Cre <sup>ERTM</sup> Pdgfra-Cre	Spp1	Cspg4, Nes	Periarteriolar
Smooth muscle cells		Myh11-Cre Acta2-Cre		Acta2, Myh11, TagIn	Periarteriolar

Bien que les résultats de ces études soient cohérents, les dénominations des cellules stromales identifiées diffèrent (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Identification des différentes population stromales de la moelle osseuse<sup>56</sup>.

Il est à noter que les fréquences des types de cellules varient selon les études et que certains sous-types cellulaires n'ont été identifiés que dans les ensembles de données les plus complets, ce qui reflète les différences dans la conception expérimentale, la préparation des échantillons et les sources anatomiques des cellules étudiées. Les niches artériolaires semblent contenir des cellules endothéliales artérielles, des cellules musculaires lisses, et une population spécifique de la niche artériolaire, appelée fibroblastes artériolaires, ou cellules Nestin/NG2+ permettant la production de collagène constituant la tunique artériolaire externe. Les CSMs périvasculaires NG2+ et Nestin+ ont été décrites comme étant des régulateurs critiques des HSCs par leur production de CXCL12 et de KITL<sup>62 63</sup>.

Baryawno et al. a identifié un ensemble de cellules stromales mésenchymateuses périvasculaires/péricytes, co-exprimant des marqueurs classiques des CSMs : Nes, CPSG4, et des marqueurs de péricytes Acta2, Myh11 et Mcam<sup>64</sup>. Les péricytes expriment exclusivement *Jag1*, le ligand de signalisation Notch, et *Il-6*, qui sont également impliqués dans la maintenance des HSCs<sup>65</sup>. Il est à noter que les cellules de ce groupe n'expriment que de très faibles niveaux de Lepr. Ainsi, les péricytes et les CSMs Lepr+ se distinguent clairement.

Baryawno et al. distinguent cinq groupes de fibroblastes exprimant les gènes spécifiques aux fibroblastes comme la Fibronectine-1 (*Fn1*), *S100a4*, Decorine (*Dcn*), *et* Sémaphorine-3C (*Sema3c*), exprimant à peine les gènes de chondrocyte *Sox9*, *Acan* et *Col2a1*<sup>66</sup>, et se distinguant des CSMs Lepr+ et des péricytes.

Le scRNAseq a identifié les cellules endothéliales sinusoïdales et artérielles comme étant les principales populations endothéliales de la moelle osseuse. Baryawno et al. ont identifié un troisième type de cellules endothéliales qui proviendrait d'artérioles plus petites <sup>61</sup>. Ces différences transcriptionnelles parmi les populations endothéliales de la moelle osseuse, reflètent probablement des différences dans la taille et la fonction des vaisseaux, ou l'exposition à différents gradients micro environnementaux.

Les ostéoblastes semblent jouer un rôle primordial dans le maintien de l'hématopoïèse. Les capacités prolifératives des HSCs semblent se développer à proximité de l'endoste <sup>7 67</sup>, après une transplantation de HSCs dans la moelle osseuse. Les ostéoblastes sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance, notamment du G-CSF <sup>67</sup>, le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) <sup>68</sup> et l'ostéopontine (OPN) <sup>69</sup>, capables de maintenir le pool de réserve des progéniteurs CD34+ dans la moelle. Les ostéoblastes jouent un rôle dans la migration des HSCs, principalement par le biais des axes de signalisation CXCL12/CXCR4 <sup>51</sup> et des molécules d'adhésion VCAM-1/VLA-4 <sup>70</sup>. Grâce à un modèle de souris knockout dépourvu du récepteur de la protéine de la morphogénèse osseuse (BMP), Zhang et al.<sup>71</sup> ont signalé qu'une augmentation du nombre de HSCs était exclusivement associée à une population de cellules qui tapissaient l'os long et qui présentaient un phénotype ostéoblastique. De même, Calvi et al 65 ont démontré que l'activation des ostéoprogéniteurs ou des pré-ostéoblastes Lin- Sca-1 c-Kit grâce à l'hormone parathyroïdienne (PTH) permettait un enrichissement en HSCs in vivo<sup>8</sup>. Il est intéressant de noter que cette expansion des HSCs s'est produite sans affecter le nombre total de cellules hématopoïétiques. Ces observations suggèrent que la signalisation induite par la PTH dans les cellules ostéoprogénitrices ou les pré-ostéoblastes pourrait jouer un rôle sélectif dans le maintien de l'auto-renouvellement des HSCs, mais pas dans la prolifération de leurs progéniteurs engagés. La manière dont les ostéoblastes régulent la quiescence des HSCs a été étudiée à de multiples reprises. Les pertes d'interactions ligand-récepteur, telles que pour le récepteur de l'angiopoïétine <sup>72</sup> (Ang-1/Tie2) et la thrombopoïétine<sup>73</sup> (TPO/MPL), dérégulent non seulement les points de contrôle du cycle cellulaire mais aussi les mécanismes d'adaptation aux facteurs de stress extrinsèques, ce qui entraîne une diminution du nombre des HSCs quiescents. L'inhibition de la signalisation Wingless (Wnt) dans les ostéoblastes entraine d'autre part la réduction de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches.<sup>74</sup>

#### g) Organisation des différentes niches stromales

Baccin et al., ont récemment combiné en 2020 une analyse transcriptomique cellulaire avec une analyse spatiale des cellules mésenchymateuses de la MO de souris et ont identifié des niches stromales caractérisées par la production de cytokines spécifiques<sup>56</sup>. Ils ont d'abord réalisé le scRNAseq sur les cellules stromales et hématopoïétiques, et ont microdisséqué les niches endostéales, sous-endostéales, artériolaires, sinusoïdales et non vasculaires par capture laser. Ceci a permis la localisation des Adipo-CARs dans les niches sinusoïdales, qui représenteraient les cellules LepR+ et qui produiraient des niveaux très élevés de CXCL12. Les cellules Ostéo-CARs seraient localisées dans les niches artériolaires et les niches non vasculaires. Les principales sources de SCF et de CXCL12, IL-7 et M-CSF sembleraient provenir des populations adipo-CARs et ostéo-CARs. Les cellules stromales NG2+ représenteraient une population hétérogène sans aucune localisation spécifique.

Enfin, des follicules réactionnels peuvent être présents dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques dans la moelle osseuse et contiennent des cellules stromales exprimant des marqueurs de FDCs qui restent par ailleurs à distance de l'os, en position centro-trabéculaires<sup>27</sup>. Ces observations posent la question de l'origine de ces FDCs au sein de la MO,

et de leur localisation systématique à distance de l'os, aussi bien en situation physiologique que pathologique. Chez la souris, les zones claires des CG des ganglions sont très hypoxiques<sup>75</sup>, ce qui suggère que les FDCs sont susceptibles de résider dans des régions hypoxiques, comme c'est le cas dans la zone péri sinusoïdale de la moelle osseuse<sup>13,14</sup>. Le stroma de type FDC semble provenir de la conversion phénotypique de cellules périsinusoïdales préexistantes<sup>76</sup>, plutôt que du recrutement de FDCs circulantes, mais leurs précurseurs dans la moelle osseuse restent en réalité inconnus<sup>77</sup>. Des cellules stromales périfollicullaires analogues aux Fibroblastic Reticular Cells (FRCs) peuvent également être présentes *in vivo*. Des cellules FRC-like peuvent d'ailleurs être induites à partir de CSMs humaines de MO *in vitro* en réponse à une combinaison de TNF/ et de lymphotoxine  $\alpha 1\beta 2$  (LT)<sup>78,79</sup>.



Figure 7 : Schéma de la méthode expérimentale adoptée par Baccin *et al* dans l'étude et la caractérisation des différentes niches stromales dans la moelle.

### 2. Le ganglion

#### a) Généralités

Le ganglion lymphatique est composé de 95% de leucocytes et 5% de cellules stromales <sup>80</sup>. En raison de la diversité des points d'entrée des agents pathogènes, les humains possèdent plusieurs centaines de ganglions afin de fournir des réponses immunitaires spécifiques de la région drainée<sup>81</sup>. Les ganglions qui drainent différentes régions topographiques, présentent de ce fait, des variations fonctionnelles <sup>82–84</sup>. A titre d'exemple, les Tregs expriment des récepteurs de surface dirigeant leur migration vers des tissus spécifiques en fonction de leur localisation, un phénomène régit par les ganglions drainants dans lesquels ils résident <sup>85</sup>. De la même manière, la nature des isotypes d'immunoglobulines des plasmocytes, est largement déterminée par la région topographique drainée<sup>86</sup>. Les ganglions présentent également quelques variations anatomiques topographiques, nous allons cependant décrire leur organisation générale.

#### b) Charpente vasculaire et réticulaire

Le ganglion est organisé par une trame fibroblastique supportant l'énorme quantité de lymphocytes en transit dans la structure. Le réseau de fibres de réticuline est particulièrement dense dans le cortex, excepté dans les zones folliculaires. La charpente réticulinique et le collagène de la capsule ainsi que les travées sont élaborés par des fibroblastes. La capsule fibreuse du ganglion est interrompue par les branches des vaisseaux lymphatiques afférents, pourvus de valvules qui assurent la circulation dans un seul sens. Sous la capsule se trouve le sinus sous-capsulaire, qui se draine vers la médullaire par les sinus corticaux. Les sinus des ganglions lymphatiques sont tapissés par des cellules endothéliales, et une trame réticulinique, fournissant un support de mobilité pour les macrophages.Ces derniers absorbent les particules, les antigènes solubles et autres débris provenant de la lymphe afférente. Les sinus corticaux, traversent ensuite la corticale et se dirigent vers la médulla (**Figure 8 et 10**).



**Figure 8 :** Histologie générale du ganglion lymphatique, barre d'échelle 50µm. Immunofluorescence montrant les noyaux des cellules en bleu, le CD21 en rouge souligne la structure des follicules, le collagène IV en jaune, montre le réseau vasculaire, lymphatique et fibroblastique, ainsi que la capsule.

La médulla est le siège de larges canaux lymphatiques interconnectés, correspondant aux sinus médullaires (**Figure 9**) qui convergent vers le hile. La lymphe se draine depuis le hile, vers les vaisseaux lymphatiques efférents. Elle transporte les antigènes qui seront ensuite présentés par les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) aux lymphocytes spécifiques <sup>87</sup>. Les lymphocytes pénètrent dans le ganglion lymphatique principalement par le système des High Endothelial Veinule ou (HEVs) et accèdent au parenchyme en traversant les parois de veinules postcapillaires spécialisées. Ces dernières se drainent dans de petites veines qui quittent le ganglion au niveau du hile <sup>88</sup>. Les lymphocytes qui ne reconnaissent pas d'antigène quittent le ganglion en quelques heures par le compartiment lymphatique et la lymphe efférente pour rejoindre la circulation lymphatique générale par le canal thoracique selon un mécanisme finement régulé par l'expression des récepteurs à la molécule S1P <sup>89,90</sup>.



**Figure 9 :** Histologie de la médulla, barre d'échelle 50µm. Immunofluorescence montrant les noyaux des cellules en bleu, le CD21 en rouge souligne la structure des follicules, le collagène IV en jaune, montre le réseau vasculaire, lymphatique et fibroblastique.

#### c) Organisation générale de la population lymphocytaire T et myéloïde

Les lymphocytes du cortex superficiel sont essentiellement disposés en follicules lymphoïdes ; ceux-ci sont les principaux sites de localisation et de prolifération des lymphocytes B activés par l'antigène. Traditionnellement, on classe les follicules lymphoïdes en « follicules primaires », s'ils ne comportent pas de centre clair, et en « follicules secondaires », s'ils en comportent un (Figure 10). Les centres clairs sont le lieu de prolifération des lymphocytes B et sont appelés CG. Les follicules « primaires » pourraient représenter des follicules « secondaires » au repos, ils contiennent tous deux un type de fibroblastes particuliers qui sont les FDCs. Les lymphocytes B du cortex superficiel sont essentiellement des cellules B « naïves » et des cellules B mémoires. L'imagerie quantitative a montré que les Tregs se regroupent à la frontière T – B où ils interagissent avec les cellules T effectrices autoréactives<sup>91</sup>. A la limite des zones de cellules T et B, se trouve un réseau diversifié de cellules lymphoïdes (cellules tueuses naturelles, cellules T  $\gamma\delta$ , cellules T tueuses naturelles (NK), et cellules T CD8 + innées) <sup>92</sup> situées à proximité des macrophages sentinelles des sinus lymphatiques <sup>93</sup>. La zone corticale profonde ou paracortex, est essentiellement constituée de lymphocytes T et organisée grâce à un sous-type de cellules stromales appellées Fibroblastic Reticular Cells (FRCs). La différenciation normale des cellules TFH nécessite généralement deux types de cellules
présentatrices d'antigènes : les cellules dendritiques (DC) et les cellules B <sup>94</sup>. Les DCs sont généralement nécessaires pour la différenciation précoce des cellules TFH dans les zones interfolliculaires, tandis que les cellules B sont nécessaires pour les événements ultérieurs et la maturation complète des cellules TFH dans le CG. Néanmoins, les cellules B peuvent initier les réponses des cellules TFH dans certaines conditions <sup>95</sup>. Les cellules B sont d'excellents producteurs d'un large éventail de cytokines, notamment l'IL-6 qui peut faciliter la différenciation des cellules TFH murines<sup>96</sup>. Les cellules B sont des cellules présentatrices d'antigènes plus rares pour les cellules TFH. Les cellules B spécifiques de l'antigène subissent ensuite une expansion exponentielle et deviennent ainsi plus abondantes pour activer les TFHs.



**Figure 10 :** Histologie du cortex et paracortex, barre d'échelle 50µm. Immunofluorescence montrant les noyaux des cellules en bleu, le CD21 en rouge souligne la structure des follicules, le collagène IV en jaune, montre le réseau vasculaire, lymphatique et fibroblastique, ainsi que la capsule. La flèche jaune indique le sinus lymphatique, la flèche blanches les HEVs et les pointillés verts, la zone sombre des follicules qui sera détaillée plus tard.

Au cours d'une réponse immunitaire, la zone paracorticale peut s'étendre de façon très importante dans la médulla. Les cellules T activées se disséminent ensuite dans la circulation vers les sites périphériques <sup>90</sup>, où se déroule la majeure partie de leur activité. Les macrophages résidents du ganglion éliminent les agents pathogènes en transit de la lymphe et jouent un rôle déterminant dans la coordination de la réponse immunitaire <sup>97</sup>. Plus précisément, une population de macrophages CD169 + dans le sinus sous-capsulaire capture les grosses particules et les micro-organismes qui pénètrent dans le ganglion par les vaisseaux lymphatiques afférents<sup>98</sup>.

D'autre part, les cellules endothéliales lymphatiques (LEC) permettent leur maintien via la production de la cytokine RANKL (également connue sous le nom de TNFSF11) et du Facteur de survie CSF-1<sup>99</sup>. Ces macrophages facilitent l'initiation de l'activation des cellules B en transférant des antigènes sous forme native aux cellules B<sup>100-104</sup>. Il a également été montré que la perturbation de ce réseau de macrophages altère les réponses des cellules B<sup>105</sup>. D'autre part, des cellules dendritiques CD11b + sont stratégiquement positionnées au niveau du sinus lymphatique, où elles capturent les antigènes et les agents pathogènes transmis par la lymphe pour une présentation efficace aux cellules T naïves<sup>106</sup>. Elles auraient la capacité d'initier des réponses cellulaires T robustes bien plus tôt que les DC provenant du site d'infection. Une étude récente a démontré que les lymphocytes T CD4 + et les lymphocytes T CD8 + ne sont pas uniformément répartis dans tout le paracortex du ganglion <sup>107</sup>. Ainsi, les lymphocytes T CD4 + seraient enrichis à la périphérie du paracortex de manière dépendante du récepteur Ebi2 et les cellules T CD8 + seraient plus centrales. Les cellules dendritiques Dendritic Cells type 1 (cDC1), assurant préférentiellement la présentation croisée de l'antigène via le CMH I aux cellules T CD8+ sont localisées au centre du paracortex, tandis que les cellules dendritiques Dendritic Cells type 2 (cDC2), spécialisées dans la présentation de l'antigène via le CMH II aux cellules T CD4+ sont enrichies au niveau du sinus sous capsulaire, des zones adjacentes du paracortex et des zones interfolliculaires <sup>108</sup>.

La médulla contient un maillage dense de vaisseaux sanguins enrichis en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en macrophages <sup>97</sup>. La population de cellules qui prédomine dans les cordons médullaires correspond aux plasmocytes. Les plasmocytes synthétisent les anticorps qui sont transporté du ganglion vers la circulation générale par la lymphe efférente et assurent un rétrocontrôle de la réaction immunitaire dans les centres germinatifs en limitant l'accès aux divers antigènes permettant l'émergence des cellules B de plus haute affinité <sup>109</sup>. Les cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC) résidant dans la medulla sont des cellules qui répondent principalement aux infections virales par la synthèse d'interferon-a mais elles interviennent aussi dans la présentation des antigènes <sup>110</sup>.

L'organisation et le rôle des lymphocytes T et des macrophages sera abordée dans la partie concernant la maturation des lymphocytes B dans le ganglion.

d) Caractérisation des différentes populations stromales des organes lymphoïdes secondaires

Les cellules stromales conditionnent l'organisation du ganglion en participant à la réalisation de niches fonctionnelles qui interviendront dans la maturation et la qualité de la réponse immune. Elles se caractérisent chez la souris par leur expression commune de podoplanine et l'absence d'expression des marqueurs hématopoïétiques, endothéliaux et épithéliaux<sup>111</sup>. Jusqu'à récemment on distinguait essentiellement les FDCs, sécrétrices de CXCL13, de localisation intra folliculaire et les FRCs, de localisation extra-folliculaire, et sécrétant du CCL19/CCL21. Cependant, les nouvelles stratégies de ciblage génétique, d'imagerie cellulaire et de séquençage par scRNAseq, ont permis de mieux caractériser l'hétérogénéité des cellules stromales du ganglion chez la souris<sup>112</sup>. Au sein des follicules, il a ainsi été identifié un compartiment de cellules stromales dans la zone sombre des CG et sécrétant du CXCL12, appelé Dark-Zone FDCs (DZ-FDC). D'autres cellules produisant CXCL13, appelées Marginal Reticular Cells, (MRC), expriment TNFSF11/RANKL et résident en bordure du follicule sous le sinus sous-caspulaire. D'autre part, un sous-type de cellules exprimant CD21, non associées aux FDCs, a été identifié comme étant un compartiment de cellules « dormantes ». Elles pourraient être converties en cellules sécrétant du CXCL13 au contact de cellules B activées, et seraient identifiées comme les cellules réticulaires border de la zone T (TBRC) <sup>113,114</sup>. Dans la zone extra folliculaire, au moins deux principaux compartiments fonctionnels de cellules stromales sont mis en évidence. Les cellules réticulaires de la zone interfolliculaire (IFRC), attirent les cellules T, B et dendritiques exprimant le récepteur CCR7, elles favorisent la croissance, la survie et la migration des lymphocytes. Elles permettent également la diffusion de petites molécules dans le ganglion. Le second sous-type, appelé cellules réticulaires médullaire ou Medullary Reticular Cells (MedRCs), constitue le principal composant structurel de la niche des plasmocytes dans les cordons de la médulla du ganglion<sup>115</sup>.

Récemment, une étude chez la souris par scRNA-seq a permis de décrire neuf souspopulations de cellules stromales dans le ganglion, y compris les FDCs, les Marginal Reticular Cells (MRCs), les MedRC, les TRCs, les cellules péricytaires, les cellules endothéliales lymphatiques ou LECs et au moins 3 sous-types de cellules stromales, sans identification claire à cette époque quant à leur fonctionnalité et leur localisation <sup>112</sup>. Toutefois, ces sous-types ont récemment été explorés définissant les sous-populations exprimant CXCL13 regroupés sous le terme B-cell–interacting reticular cell (BRC), comprenant les DZ et LZ reticular cells, les MRCs, les TBCRs, les IFRCs <sup>116</sup>. Il convient également de souligner que des données très récentes sont disponibles sur les caractéristiques des cellules stromales lymphoïdes humaines ; montrant une similarité phénotypique des cellules stromales humaines et de souris <sup>117</sup>.

#### e) Précurseurs mésenchymateux des cellules stromales lymphoïdes

Les cellules stromales lymphoïdes dérivent de progéniteurs mésenchymateux locaux, mais l'identité, la localisation et la différenciation de ces progéniteurs restent controversées. Il a été démontré que les précurseurs pré-adipocytaires se différencient *in vivo* en plusieurs sous-types de cellules stromales lymphoïdes comprenant au moins les MRCs et les FRCs <sup>118</sup>.

Les MRCs seraient les équivalents présumés chez l'adulte des cellules stromales du tissu lymphoïde embryonnaire, et pourraient proliférer et se différencier en FDCs pendant la réorganisation du ganglion lors de l'inflammation <sup>119</sup>. De plus, les cellules périvasculaires pourraient être les précurseurs de cellules stromales lymphoïdes même s'il existe des points de vue divergents concernant leurs caractéristiques spécifiques et leur origine. L'hypothèse serait qu'elles proviendraient soit de cellules adventitielles exprimant la podoplanine et le CD34 <sup>76,120,121</sup>. Il convient de noter que le renouvellement des cellules stromales spléniques et des cellules stromales du ganglion semble s'effectuer à partir de progéniteurs propres à chaque tissu<sup>122</sup>. Chez l'homme, il a récemment été suggéré que les péricytes constitueraient les précurseurs des FRCs <sup>117</sup>. Quelle que soit leur cellule d'origine, la LT et le TNF constituent les deux facteurs clés impliqués dans la différenciation et l'entretien des cellules stromales lymphoïdes<sup>118,123</sup>.

#### f) Organisation des différentes niches stromales

Les FRCs résident dans le parenchyme du ganglion et ont à la fois des fonctions structurelles et de régulation immunitaire. Les FRCs créent un réseau tridimensionnel de conduits dont l'organisation est modulée lors de l'inflammation <sup>124</sup> pour faciliter la migration des cellules et le transport des antigènes, ainsi que pour maintenir la tension du réseau réticulaire. Les FRCs sécrètent également des cytokines de survie des cellules T et des cellules B, notamment l'IL-7 et le BAFF <sup>80</sup> et aident à maintenir la tolérance des cellules T par l'expression de complexes auto-peptide/MHCII <sup>125,126</sup> et l'induction de cellules Treg. Les FRCs présentent trois profils transcriptionnels distincts en sc-RNAseq <sup>112</sup>: les TRCs sécrétant des niveaux élevés de CCL19/21 servant à la constitution d'un support de recrutement et de migration des lymphocytes B et T CCR7pos et des DC matures ; les TBRCs sécrétant de faibles



niveaux de CCL21 ainsi que des niveaux élevés de BAFF et qui sont situés en bordure des follicules et les IFRCs sécrétant du CXCL9 en zone inter folliculaire (**Figure 11**).

Figure 11 : Schéma montrant l'organisation et la localisation de chaque type cellulaire stromal<sup>114</sup>.

Les TBRCs vont constituer une niche de prolifération pour les cellules B matures, en sécrétant de l'IL6, du CXCL12 ainsi que APRIL<sup>127</sup>. D'autre part, les IFRCs permettent la migration des cellules myéloïdes suite à l'inflammation<sup>128,129</sup>.

Les Light-Zone FDCs (LZ-FDCs) résident dans les follicules des cellules B et sécrètent CXCL13. Au cours d'une réaction immunitaire, les LZ-FDCs sont compétentes pour la capture d'antigènes, notamment *via* leur expression forte des récepteurs au complément CD21/CD35 et des récepteurs aux IgM (FcγRAM) en vue de leur recyclage et de leur transfert aux cellules B, ainsi que pour faciliter l'expansion des follicules en vue d'accueillir la formation du centre germinatif. L'ensemble de ces cellules est modulable en fonction de l'état d'inflammation, aussi bien sur le plan transcriptionnel, qu'architectural <sup>114,124</sup>. Les DZ-FDCs expriment de faibles

niveaux de gènes codant pour les composants de la matrice extracellulaire, de récepteurs du complément et présentent un phénotype intermédiaire entre les FDCs et les TBRCs. En cas d'inflammation, les DZ-FDCs présentent une expression élevée des chimiokines Cxcl1 et Cxcl16 et de la cytokine II6, ainsi que des protéines de liaison aux intégrines et de remodelage de la matrice extracellulaire<sup>114</sup>. (**Figure 12**)



**Figure 12 :** Centre germinatif d'amygdale humaine, montrant par immunofluorescence, la chemokine CXCL13 en jaune, CXCL12 en vert, démasquant les LZ-FDCs et les DZ-FDCs au sein du follicule. (Barre d'échelle : 50  $\mu$ m)

Ainsi, des modifications transcriptionnelles et une adaptation topographique supplémentaire des DZ-FDCs et des LZ-FDCs accompagne la formation des CG <sup>114</sup>. D'autre part les MRCs semblent être les cellules sécrétant les niveaux les plus élevés de CXCL13, en comparaison aux FDCs, DZ-FDCs et TBRCs (**Figure 13**). Les MRCs, situées dans le cortex sur les bords extérieurs des follicules des cellules B, soutiennent l'homéostasie des macrophages par l'expression de RANKL<sup>92,129</sup>.

Les MedRCs au niveau de la medulla expriment la Lepr et sécrètent CXCL12, APRIL, IL6 <sup>115</sup>et CCL2<sup>130</sup> leur permettant d'interagir avec les plasmocytes, les cellules NK, et les macrophages<sup>131</sup>.



**Figure 13 :** Etude de l'identité moléculaire des TBRCs, des DZ-FDCs, des LZ-FDCs, des MRCs avant et après immunisation, définis par des gènes des molécules de signalisation, d'addhésion, de matrice extra cellulaire, de récepteur du complément, ou de morphologie les discriminants. Conformément aux analyses histologiques, les FDCs expriment un niveau élevé de Cxc113 par rapport aux DZ-FDCs et aux TBRCs, mais expriment des niveaux plus faibles que les MRCs voisins. Les DZ-FDCs expriment de faibles quantités de transcrit Cr2 et de protéine CD21/35 par rapport aux FDCs et moins de Cxc112 par rapport aux TBRCs<sup>114</sup>.

### g) Des cellules longtemps apparentées aux cellules stromales : les LECs

Les Lymphatic Endothélial Cells (LECs) se trouvent sur les bords extérieurs du ganglion. Le sinus sous capsulaire est bordé par deux sous populations de LECs distinctes : les LECs du plancher (fLEC) et les LECs du plafond (cLEC). Les fLECs sont alignées sur le sinus sous capsulaire et soutiennent le transport des antigènes dans le parenchyme du ganglion. Les cLECs tapissent la capsule et expriment le récepteur atypique de chimiokine CCRL1, pour diriger les CDs dans le parenchyme en créant un gradient de Chemokine (C-C motif) ligand 19 et 21 (CCL19 et de CCL21 respectivement) , les ligands du récepteur de surface des lymphocytes CCR7, impliqué dans la migration cellulaire<sup>132</sup>. Les fLEC et les cLEC se distinguent également par leur expression du LYmphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1), qui est exprimé par les fLECs mais pas par les cLECs<sup>132</sup>. Des études scRNA-seq révélent la présence d'au moins deux sous-populations de LEC médullaires<sup>133</sup>. Les LEC du sinus médullaire sont composées des Pentraxin 3 LECs (Ptx3-LEC) et des Macrophage Receptor with Collagenous structure LECs (Marco-LEC). Ces sous-populations présentent des mécanismes distincts pour les interactions avec les agents pathogènes et la modélisation de la matrice. Ainsi, les Ptx3-LECs sont situés dans les sinus médullaires près du hile et sont enrichis en gènes contrôlant la sortie des lymphocytes. Les Marco-LECs sont situés dans les sinus médullaires périfolliculaires ; et expriment des gènes associés aux macrophages, à la cascade du complément et de la coagulation<sup>133</sup>.

# B. Implication des cellules stromales dans la maturation et l'activation des lymphocytes B

# 1. Dans la moelle osseuse

# a) Maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse

Les principales étapes du développement des cellules B dans la moelle comprennent les stades HSC, progéniteur multipotent (MPP), progéniteur lymphoïde commun (CLP), cellule B progénitrice (cellule pro-B) (CD34<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup>), précurseur B (cellule pré-B) et celui de la cellule B immature. Hardy et al. ont élégamment montré par l'étude des marqueurs de surface en cytométrie de flux et par le séquençage V-D-J par PCR différents stades de développement qui peuvent être divisés en fractions qu'ils ont dénommé A, B, C, C', D et E <sup>134</sup>.

En acquérant l'expression du marqueur B220 (CD45R) spécifique aux lignées de cellules B et la hausse de l'expression du facteur de transcription early B cell factor-1 EBF1, la cellule entre au stade de cellule pré-pro-B  $^{135-139}$ ou fraction A. EBF1, avec l'aide de E2A, se lie au locus d'Ig*h*, favorisant la recombinaison de DH-JH *via* l'activité endonucléase des enzymes codées par les gènes activant les recombinaisons 1 et 2 (*RAG-1* et -2). Après la recombinaison de DH-JH, la cellule entre au stade précoce de la cellule pro-B ou fraction B  $^{134}$ . Pendant ce temps, l'expression protéique de *PAX5*, qui est l'une des cibles du facteur de transcription EBF1, bloque l'expression des gènes de la lignée non B<sup>140</sup>. En outre, de nombreux gènes sont activés à ce stade, sous le contrôle de PAX5 et d'autres facteurs de transcription. Au cours de cette étape, l'un des composants du co-récepteur des cellules B, CD19, est exprimé. Les segments des gènes VH et DH-JH sont ensuite recombinés *via* l'activité endonucléase des

enzymes codées par les gènes activant les recombinaisons 1 et 2 (*RAG-1* et -2) <sup>141</sup> et la cellule B entre dans le stade de cellule pro-B tardive ou fraction C <sup>142,143</sup>. L'expression de la terminal deoxynucléotidyl transférase (TdT) est détectable aux stades tardifs du CLP et atteint son maximum au stade des cellules proB <sup>144</sup>.

Au cours de l'étape pro-B ou des fractions A-C, Ig $\alpha$  et Ig $\beta$ , qui sont des composants de de la voie de signalisation du BCR, commencent à s'exprimer, et l'expression de C-KIT permet à la cellule de recevoir les signaux du SCF<sup>145</sup>. Cependant, au début du stade pré-B, l'expression de C-KIT est désactivée de manière irréversible<sup>146</sup>. Après une recombinaison réussie du VH-DH-JH, la cellule exprime un pré-BCR, qui est constitué de la chaîne lourde µ réarrangée, complexée avec une pseudo-chaîne légère composée de deux petits peptides liés, avec une région variable (VPREB) et une région constante ( $\lambda 5$ ), ainsi que Ig $\alpha$  et Ig $\beta^{147-149}$ . Cet ensemble exerce une répression sur les expressions de RAG-1 et RAG-2<sup>150</sup>. La cellule pré-B en prolifération ou fraction C' peut poursuivre sa maturation si elle a effectué un réarrangement productif de la chaîne lourde. Le pré-BCR disparait alors de la surface, et cela signale l'entrée de la cellule au stade pré-B ou fraction D 151. À ce stade, le réarrangement des chaînes légères est initié par la ré-expression des gènes RAG1/2. Le réarrangement de la chaîne légère commence sur l'un des chromosomes de la chaîne ĸ, puis des autres si besoin. Si aucun des réarrangements ĸ, n'est productif, le réarrangement est ensuite tenté sur chacun des chromosomes de la chaîne  $\lambda^{152}$ . Le récepteur IgM (BCR) est exprimé sur la surface des cellules, ce qui signifie que la cellule B entre dans le stade immature de la cellule B<sup>153</sup> ou fraction E. Tout au long du développement de la cellule B, PU.1 gère l'entrée dans la lignée lymphoïde avec la médiation d'Ikaros<sup>154,155</sup>. E2A permet de promouvoir l'expression des gènes B et EBF1 joue un rôle important en tant que coordinateur central du développement des cellules B, en collaboration avec FOXO1<sup>156</sup>. EBF1 est essentiel pour l'expression de nombreuses protéines associées aux cellules B, y compris Iga (CD79a)<sup>157</sup>, Ig $\beta$  (CD79b), et pour l'expression de gènes codant pour le pré-BCR.

Après l'engagement des CLPs dans la différentiation B, les lymphocytes B produisent un large répertoire de récepteurs d'antigènes par la recombinaison des segments V, (D) et J des gènes d'immunoglobulines. Les cellules reconnaissant un antigène survivent, y compris les auto réactives : c'est la sélection positive. Entre 55 à 75% de ces cellules produisent des Ig qui reconnaissent des antigènes endogènes <sup>158</sup>. Ces cellules vont soit 1) subir une révision du BCR (editing) qui va induire la mort par apoptose ou la délétion clonale de près de 80% des cellules <sup>159</sup> ou lever la reconnaissance des antigènes endogènes, soit 2) ne plus pouvoir répondre à l'antigène et devenir anergiques, soit 3) survivre et devenir « B ignorants ». Après cette

sélection négative (tolérance centrale), les lymphocytes B immatures quittent la moelle osseuse et rejoignent les circulations sanguine et lymphatique <sup>142</sup> <sup>160</sup>.

Bendall et al, ont élégamment utilisé l'outil Wanderlust pour inférer à partir de données d'expression protéique obtenues en cytométrie de masse (CYTOF) la trajectoire de la cellule B afin de reconstruire un continuum de différentiation dans un échantillon où l'ensemble des populations intermédiaires sont présentes (**Figure 14**). Ainsi, avec 44 marqueurs protéiques et 200 000 cellules, cette équipe a pu proposer un modèle hollistique ordonné par la chronologie de la lymphopoïèse B <sup>144</sup>.



**Figure 14 :** Résumé de l'expression des marqueurs phénotypiques, des signaux de régulation et des status de recombinaison IgH, ainsi que des points de contrôle proposés pour les cellules Pro et Pré-B reportées sur les populations décrites dans les cellules B humaines.Trajectoire ordonnée par l'outil Wanderlust. En caractères gras : les marqueurs sont le minimum requis pour sélectionner les cellules par analyse cytométrique. En caractères réguliers : les marqueurs sont exprimés de manière uniforme sur la surface. Les marqueurs en italique sont exprimés de manière intracellulaire. Les marqueurs entre parenthèses "()" ne sont que partiellement exprimés.

Une nouvelle technique développée par les scientifiques du New York Genome Center (NYGC) représente une avancée importante pour le séquençage de l'ARN des cellules individuelles, le CITE-seq, ou Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by sequencing<sup>161</sup>. Elle associe la mesure des marqueurs protéiques de surface sur des milliers de cellules individuelles au séquençage simultané de l'ARN. Suite à cette innovation, la lymphopoïèse B fut étudiée en utilisant le CITE-Seq<sup>162</sup>. Ainsi l'équipe de Lee a pu identifier la protéine de liaison à l'ARN YBX3 comme un nouveau marqueur de la différenciation des cellules pré-B. Leur analyse a d'autre part permis de découvrir plusieurs nouveaux stades de différenciation des cellules pré-B - dont un stade pré-BCR-dépendant et deux stades pré-BCR-indépendant qui présentaient des modalités de prolifération distinctes. Ainsi ; le processus de différenciation EBF1 et de la protéine de liaison de l'ARN YBX3. D'autre part, les stades pré-BCR indépendants ont été corrélés à des modifications des récepteurs de chimiokines et de cytokines s'associant probablement avec une localisation spécifique de ces cellules dans la moelle osseuse.

### b) L'implication des différentes niches stromales de la moelle dans la maturation B

Dans de nombreux systèmes biologiques, la localisation cellulaire relative à son microenvironnement influence les décisions cellulaires telles que la quiescence, l'activation et la différenciation. Le concept de niches microenvironnementales, fût lancé par Schofield en 1978 pour expliquer la capacité progénitrice hématopoïétique supérieure des cellules résidentes de la moelle osseuse par rapport à celle des cellules spléniques. Cette étude en propulsa d'autres sur les niches d'HSCs de la MO. Des études pionnières sur la localisation des cellules de la lignée B ont suggéré que les progéniteurs précoces de cellules B marquées par B220 et manquant l'expression cytoplasmique d'Igu étaient enrichis dans les niches sous-endostéales, notamment en utilisant des techniques d'immunofluorescence classique dans des tissus de fémur de rat et en se basant sur l'expression de la TdT<sup>163</sup>. Les cellules pré-pro-B sont drastiquement diminuées chez les souris Osx-Cre/Cxcl12lox/-, soulignant l'importance de l'expression de CXCL12 dans les ostéo-progéniteurs pour leur développement <sup>164</sup>. En utilisant des modèle murins transgéniques et la Mb1-Cre-recombinase délétant des gènes floxés comme Fak dans les précurseurs B, mais aussi en ciblant les cellules du microenvironnement en annulant l'expression de Cxcl12 dans les cellules stromales ou en utilisant des systèmes rapporteurs des gènes  $Il7^{GFP/+}$  et  $Cxcl12^{dsRed/+}$  et un suivi en microscopie biphotonique intravitale, dans la calvaria de souris, il a été montré que les cellules pro-B ont une motilité

limitée par une forte expression de l'intégrine VLA4<sup>165</sup> et qu'elles dépendent considérablement de la signalisation des cellules mésenchymateuses produisant du CXCL12 et de l'IL-7 pour leur prolifération et leur rétention dans la moelle osseuse. La signalisation IL-7R dans les cellules pro B contrôle l'expression de CXCR4 et de la kinase d'adhésion focale (FAK)<sup>166,167</sup> et en conséquence, leur rétention dans la moelle. Il est important de noter que la signalisation pré-BCR contrôle le passage d'une expression FAK/VLA4 élevée à une expression FAK/VLA4 plus faible et donc, l'adhésion à VCAM-1, tout en favorisant une expression CXCR4 plus élevée et la migration. Dans une analogie simple, la signalisation pré-BCR accélère la motilité des cellules pré-B en diminuant l'adhésion (FAK/VLA4) tout en forçant la motilité (CXCR4)<sup>168</sup>. Les cellules pré-B définies par l'expression cytoplasmique, mais indétectable de la surface d'Igµ étaient plus uniformément réparties dans les cavités sous-endostéales et centrales. (**Figure 15 et 16**).



**Figure 15:** Coupe longitudinale de fémur de souris irradiées  $Il7^{GFP/+} Cxcl12^{dsRed/+} Rag1^{-/-}$  ou  $Rag1^{-/-} Igh^{B1-8/+}$ . *Cxcl12*-dsRed (red). (n = 3). Fréquence des cellules proB ( $Rag1^{-/-}$ ) et preB ( $Rag1^{-/-} Igh^{B1-8/+}$ ) en contact avec les cellules IL-7<sup>+</sup> CXCL12<sup>+</sup>. Chaque rond correspond à une souris.\*, P < 0.05. test de student non pairé. Barre d'échelle, 50 µm. La moyenne est indiquée par une barre. <sup>165</sup>



**Figure 16 :** Comportement migratoire des cellules ProB et preB *in vivo.* (A) Distribution des cellules proB GFP+ (vert, en haut à gauche) et des cellules preB (vert, en bas à gauche) dans les *calvaria* de souris Cxcl12dsRed/+ irradiées létalement et reconstituées avec des cellules de moelle Rag1GFP/GFP ou Rag1GFP/GFP Igh3-83/+. Mouvement des cellules GFP+ B suivi pendant 30 min in vivo par IVM. Les lignes colorées représentent les trajectoires des cellules. Barre d'échelle, 50  $\mu$ m. (B) Vitesse médiane (micromètres par minute). Chaque cercle représente une seule cellule analysée. (C) Coefficient de motilité moyen des cellules pro-B et pré-B. Le déplacement des cellules à partir des coordonnées de départ est tracé en fonction du temps (minutes). Les lignes représentent le coefficient de motilité moyen de trois vidéos distinctes par souris. (D) Temps (minutes) passé en contact direct avec des cellules CXCL12+ pendant 30 minutes. (E) Temps moyen (minutes) passé par les cellules individuelles analysées. \*\*\*\*, P < 0.00005 par le test t de l'élève non apparié. Les données de tous les panels sont représentatives de trois expériences indépendantes.

Une étude a proposé que le pré-BCR puisse interagir physiquement avec la lectine Galectin-1 associée au stroma pour activer la transduction de signaux destinés à la prolifération et la différenciation des cellules pré-B <sup>169,170</sup>. Des analyses *in situ* de cellules pré-B purifiées par triage qui ont été transférées dans des souris receveuses ont montré une association étroite entre les cellules pré-B et les cellules stromales Galectin-1+ qui n'exprimaient pas IL-7 mais exprimaient CXCL12 dans la moelle osseuse <sup>171</sup>. La perte de l'expression de Nidogen-1 affecte spécifiquement l'accès des cellules pro-B à l'IL-7, ce qui entraîne une altération de l'expansion et la différenciation des cellules B précoces <sup>172</sup>.

Les principales caractéristiques du stade immature des cellules B sont la sélection négative des BCR auto-réactives et leur sortie vers la périphérie où elles achèvent leur maturation. Par rapport aux cellules pro-B et pré-B, les cellules B immatures expriment de faibles niveaux de CXCR4 et ont une capacité réduite à adhérer à VCAM1 <sup>167</sup>. FLT3L est un ligand pour FTL3, qui est essentiel pour le développement des cellules pré-pro-B <sup>173</sup>. De plus, lorsque des souris transgéniques pour un BCR spécifique du lysosome d'oeuf de poule (HEL)

sont traitées avec HEL pour simuler l'engagement d'un auto-antigène, les cellules B immatures expriment des niveaux plus élevés de CXCR4, ce qui entraîne une diminution de leur sortie vers la périphérie. Cela suggère que les cellules B immatures sont retenues dans la MO si leur BCR est auto-réactif. En accord avec ce résultat, le récepteur cannabinoïde 2 est impliqué dans la rétention des cellules B immatures dans les sinusoïdes <sup>174</sup>. De plus, les cellules B immatures sont protégées de l'apoptose médiée par le BCR et ont la capacité de réinitialiser les gènes *RAG1* et *RAG2* activant la recombinaison lorsqu'elles sont incubées avec des cellules du microenvironnement de la moelle exprimant DX5 et de faibles niveaux de Thy1 <sup>175,176</sup>. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les cellules endothéliales et/ou stromales jouent un rôle important dans la rétention des cellules B immatures auto-réactives dans la moelle et dans l'édition des récepteurs. Lorsque le réarrangement des chaînes légères est terminé, une molécule d'IgM de surface est exprimée. Enfin, les cellules B immatures qui quittent la moelle osseuse expriment à la fois une IgM et une IgD. Les cellules B immatures diminuent l'expression membranaire du récepteur CXCR4 et augmentent l'expression de S1PR1, permettant ainsi la sortie des cellules par les sinusoïdes.

Aux stades ultérieurs du développement des cellules B, les lymphocytes B immatures se localisent principalement dans la moelle centrale avec des sinusoïdes de petit calibre dont la lumière est souvent comblée de cellules B immatures.

# 2. Dans le ganglion

# a) Les différents états de maturation du lymphocyte B dans le ganglion

Les CGs sont des structures transitoires qui se forment dans les organes lymphoïdes périphériques en réponse à une stimulation antigénique <sup>177</sup>. Lors d'une activation antigénique, les lymphocytes B naïfs reconnaissent tout d'abord les antigènes natifs sous la forme soluble ou présentés par des cellules présentatrices d'antigènes, comme les macrophages ou les cellules dendritiques<sup>100,102,178</sup>. L'objectif des structures lymphoïdes secondaires est d'augmenter l'affinité de ces cellules pour les antigènes en fabriquant des anticorps de haute affinité grâce à la modification de la région variable des chaînes d'immunoglobulines par des processus d'hypermutations somatiques (HMS)<sup>179,180</sup>. Une fois les lymphocytes B activés, ces cellules surexpriment le récepteur CCR7 à leur surface, facilitant leur migration dans la zone T via un gradient d'expression des chimiokines CCL21 et CCL19<sup>181</sup>. Ces lymphocytes B viennent en bordure du follicule à la rencontre de lymphocytes T CD4+ préalablement activés par des DCs où ils prolifèrent et interagissent en présentant les fragments antigéniques par l'intermédiaire du CMH de classe II <sup>182,183</sup>. La durée de ces interactions dépend de leur spécificité et de leur

affinité pour l'antigène rencontré. A ce stade, certains lymphocytes B antigène-spécifiques prolifèrent dans les zones extra folliculaires, dans la medulla, pour devenir des plasmablastes à courte durée de vie sécrétant des anticorps de faible affinité pour l'antigène, mais fournissant une réponse protectrice rapide essentiellement de type IgM. Les autres lymphocytes B activés peuvent également se différencier en lymphocytes B mémoires ou en lymphocytes destinés à transiter dans le CG. Les cellules B mémoires et les plasmocytes résultant de ce processus de sélection d'affinité apparaissent ensuite une semaine après la rencontre avec l'antigène <sup>184</sup>. Il est maintenant bien établi que ce sont les lymphocytes de faible affinité pour l'antigène qui seront amenés à devenir des lymphocytes B mémoires ou à transiter par le centre germinatif<sup>185</sup>. Au niveau de la zone inter folliculaire et de la frontière T-B, les cellules dendritiques et B coopèrent à la production de TFH en deux phases canoniques. Premièrement, les cellules TCD4 naïves interagissent avec les DCs, entraînant une augmentation de l'expression de BCL6 et CXCR5, le récepteur de chimiokine qui dirige la migration vers le follicule de cellules devenues pré-TFH <sup>186</sup>. Deuxièmement, en entrant dans le follicule, elles interagissent avec les cellules B pour compléter leur différenciation en cellules TFH matures via des interactions mettant en jeu notamment le couple ICOS-ICOSL 91,182,183,187.

Le CG est divisé en deux zones histologiques qui sont la zone sombre et la zone claire. La zone sombre est presque exclusivement constituée de de lymphocytes B proliférants appelés centroblastes. Les centroblastes vont diversifier le domaine variable de leurs immunoglobulines sous l'action d'HMS, dans le but de générer de nouvelles spécificités pour les antigènes <sup>188,189</sup>. La coopération des signalisations CD40 et BCR conduit à l'induction de MYC <sup>190,191</sup> et mTORC1<sup>132</sup>. L'activation transitoire de MYC et mTORC1 permet aux cellules de la zone claire de devenir anaboliques et de générer les pools de précurseurs métaboliques qui seront nécessaires à la prolifération dans la zone sombre. Normalement, ce processus est séquentiel afin que les cellules de la zone claire ne prolifèrent pas pendant qu'elles subissent une charge anabolique. En revanche, dans la zone sombre, MYC est silencieux et l'activité de mTORC1 est réduite, ce qui peut limiter la capacité des cellules en division rapide à subir une réplication continue. Cette séparation de l'anabolisme et de la prolifération est en partie due aux actions du répresseur transcriptionnel BCL6, qui réduit simultanément au silence les gènes MYC et les gènes de contrôle du cycle cellulaire <sup>192</sup>. Toute perte de cette exclusivité mutuelle MYC/BCL6 est intrinsèquement dangereuse et pourrait déclencher une prolifération lymphocytaire B illimitée. La zone claire contient des lymphocytes B de plus petite taille, non proliférants, au contact de lymphocytes TFH, de cellules LZ-FDCs et de macrophages. Les CGs sont depuis longtemps considérés comme des sites dans lesquels la recombinaison des commutateurs de classe d'Ig (CSR) est favorisée. Roco et al ont récemment démontré que la CSR se produit au cours de l'interaction initiale entre les cellules T et les cellules B avant la formation du CG et qu'elle diminue rapidement lorsque les cellules B se différencient en cellules du centre germinatif et que le processus d'HMS commence <sup>193</sup>. Un petit pool de centrocytes deviendront des lymphocytes B mémoires ou des plasmocytes <sup>189</sup> mais plus de la moitié des lymphocytes B du centre germinatif entrent en apoptose toutes les six heures<sup>194,195</sup>. Les centrocytes les plus affins capturent l'antigène à la surface du FDC via leur BCR et présentent les peptides antigéniques résultants dans les molécules du CMH de classe II aux cellules TFH qui délivrent le signal limitant pour induire un nouveau cycle de prolifération dans la DZ ou la différentiation terminale. Ils produisent de plus une quantité accrue de CCL22 et CCL17, permettant d'attirer plus de TFH CCR4+<sup>196</sup>. L'axe CD40L-CD40 est crucial pour le maintien des CGs car l'absence de CD40 ou de son ligand, ou l'administration d'anticorps anti-CD40L à tout moment abolit la réaction du CG<sup>197</sup>. Les cellules TFH sont également connues pour sécréter des cytokines qui influencent de façon majeure les cellules B <sup>198,199</sup>. Deux des principales cytokines sécrétées par les cellules TFH sont l'IL-4 et l'IL-21. Ces cytokines favorisent la prolifération des cellules B, et différenciation en plasmocytes. L'IL-21 favorise l'expression des gènes clés tels que BCL6 et AICDA. L'aide des cellules TFH a été identifiée comme l'élément limitant pour la sélection des cellules B à haute affinité du GC <sup>200</sup>. Les cellules de forte d'affinité reçoivent des signaux BCR plus forts qui favorisent leur survie et captent plus d'antigènes. Les clones sélectionnés retourneront dans la zone sombre pour subir une deuxième phase d'expansion et d' HMS, ou se différencieront en plasmocytes ou en cellules mémoires. Les clones non sélectionnés mourront et seront endocytés par des macrophages à corps tingibles. A noter que le hasard des HMS peut conduire à l'introduction de mutations qui conduisent à la reconnaissance d'auto-antigènes, qui peuvent générer des anticorps autoréactifs et potentiellement provoquer une maladie autoimmune. Ainsi, en plus de sélectionner les cellules ayant la plus grande affinité pour l'antigène immunisant, il existe certainement des "points de contrôle" pour éliminer les cellules B qui acquièrent la capacité de se lier à l'auto-antigène <sup>201</sup>. Environ 10 à 30 % des lymphocytes B possèdent une affinité antigénique suffisante pour échapper à l'apoptose, mais ne se différencient pas en plasmocytes ou en lymphocytes B mémoires et rentrent de nouveau dans la zone sombre pour de nouvelles séries d'HMS et de prolifération<sup>178,194,202–204</sup>.

### b) L'intervention cruciale du microenvironnement stromal

Les FRCs produisent des composants de la matrice extracellulaire, notamment la laminine, la fibronectine, le collagène IV et la ténascine, pour former une matrice extracellulaire fonctionnelle. Ils forment un réseau dynamique régulant l'organisation du ganglion et le trafic de cellules immunitaires<sup>111,205,206</sup>. Outre leur rôle crucial initialement identifié dans le transit des cellules T, les FRCs ont également un impact sur le comportement des cellules B. Tout d'abord, les FRCs recrutent les lymphocytes B par libération de CXCL12 et de CCL19/CCL21 et garantissent leur trafic depuis le paracortex vers les follicules <sup>205</sup>. Au tout début de la réponse du centre germinatif, le TNFSF13 (APRIL), qui est produit par une population de FRCs exprimant la podoplanine et CD157, participe conjointement à la sécrétion d'IL-6 et des chimiokines CXCL12, CCL19 et CCL21, à la maturation des plasmablastes<sup>127</sup>. Deuxièmement, les MedRC génèrent une structure matricielle extracellulaire différente de celle des FRCs et produisent en particulier de grandes quantités de CXCL12, BAFF, APRIL, et d'IL-6. IL est montré qu'elles guident la migration des plasmocytes exprimant le récepteur CXCR4 et contribuent, en association avec les macrophages, à leur survie <sup>115</sup>. Il est important de noter que les FRCs subissent des changements morphologiques massifs pour faire face à l'augmentation du nombre de lymphocytes B et T, et ces modifications reposent sur l'interaction entre la podoplanine/gp38 sur les FRCs et CLEC-2 exprimé par des DCs, avant pour conséquence une réduction de la contractilité des FRCs et de leur élongation <sup>207,208</sup>. (Figure 17). Les FRCs sont également soumises à une forte prolifération dans ce contexte qui participe également à l'expansion du réseau nécessaire à l'augmentation de taille des ganglions .



**Figure 17 :** Dépôt matriciel par les TRCs contrôlé par l'interaction CLEC-2/podoplanine, ainsi que les complexes LL5-microtubulaires, lors de l'inflammation.

Les cellules B ont été récemment proposées comme contribuant à l'activation initiale et au maintien des FRCs dans le ganglion et la rate par l'intermédiaire de la production de LT<sup>122,209,210</sup>.

Il est intéressant de noter que les FRCs sont également impliqués dans la tolérance immunitaire périphérique en présentant des auto antigènes aux lymphocytes T CD8+ et CD4+ par le biais des complexes peptidiques du CMHII en inhibant leur survie ou en empêchant une stimulation ultérieure <sup>126,211</sup>. Il a également été démontré qu'elles limiteraient la prolifération des cellules T activées indépendamment de la présentation de l'antigène. Dans la souris, cette fonction suppressive a été attribuée à l'induction de la NO synthase <sup>212</sup> alors que chez l'homme, une étude récente a proposé que les TRCs limitent l'activation des cellules T grâce à une combinaison de plusieurs facteurs, notamment l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO), la prostaglandine E2, TGF- $\beta$ R, et la signalisation du récepteur de l'adénosine A2 <sup>213</sup>. Comme IDO a également été impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules B par les cellules stromales humaines activées par IFN $\gamma$  <sup>214</sup>, il est tentant de supposer que les FRCs peuvent aussi être impliquées dans la régulation de la réponse des cellules B lors de l'état inflammatoire.

# c) Rôle des FDCs dans la maturation des lymphocytes B

Les lymphocytes B activés qui ont auparavant subi les signaux de co-stimulation des lymphocytes T migrent vers le follicule pour y proliférer. Les LZ-FDCs sont cruciales pour l'organisation des lymphocytes B<sup>215</sup>. CXCL13, une chimiokine produite par les FDCs et les Tfh, favorise la mobilité des cellules B via le récepteur CXCR5 vers la zone de lumière du follicule primaire et du centre germinatif. L'expression de CXCL13 dépend étroitement de la sécrétion de lymphotoxine (LT) par des cellules B qui, à son tour, dépend de la production de CXCL13 dans une boucle de rétroaction positive <sup>178</sup>. Les FDCs présentent des antigènes aux cellules B en formant des complexes immuns avec des anticorps ou avec le système du complément CR1/CR2<sup>102</sup>. Ensuite, les FDCs activent la cytidine désaminase induite par l'activation (AID) pour la recombinaison isotypique et les hypermutations somatiques des cellules B <sup>216,217</sup>. Dans un processus appelé sélection d'affinité, les cellules B sélectionnées qui interagissent avec l'antigène présenté sur les FDCs prolifèrent et deviennent des plasmocytes ou des cellules B mémoires. Par ailleurs, les FDCs matures expriment le Toll Like Receptor 4 (TLR4), qui stimulé par les phospholipides oxydés endogènes libérés par les cellules B apoptotiques, augmente la capacité des FDCs à favoriser les hypermutations somatiques et la commutation isotypique par la synthèse de TGF $\beta$ <sup>218</sup>. Au cours de la réponse du centre germinatif, les FDCs expriment les récepteurs d'intégrines ICAM-1 et VCAM, identifiés comme les ligands spécifiques respectifs des récepteurs LFA-1 et VLA-4 des cellules B, afin de prévenir leur apoptose <sup>219</sup> et de renforcer les interactions. En outre, la voie du ligand Hedgehog (protéine sonique) protège les cellules B contre l'apoptose induite par Fas<sup>220</sup>. Les FDCs peuvent retenir des antigènes pendant de longues périodes grâce à des processus d'internalisation non dégradative et de recyclage, pour interagir ensuite avec les rares cellules B spécifiques d'antigènes correspondants, provenant d'organes éloignés <sup>221</sup>. Les FDCs produisent des facteurs solubles comme le BAFF<sup>222,223</sup>, l'IL15<sup>224</sup>, qui participent à la survie et à la prolifération des cellules B. Mais les FDCs peuvent également conduire à l'élimination des cellules B en enrobant les cellules B pré-apoptotiques de MFGE8, pour les conduire à l'élimination par les macrophages à corps tingible <sup>225</sup>. Les FDCs sont principalement identifiés dans la zone claire, mais au cours de la différenciation des cellules B, l'Hepatocyte Growth Factor (l'HGF) semble être sécrété par certaines cellules stromales spécifiquement situés dans la zone sombre (DZ-FDCs) afin d'améliorer la prolifération et la survie des centroblastes exprimant la protéine Mesenchymal Epithelial Transition (MET)<sup>226</sup>. En outre, la PGE2 serait un médiateur important dans les interactions entre les FDCs et les cellules B en favorisant la survie, la prolifération et la différenciation in vitro et aurait un impact sur la production d'anticorps pendant la réponse immunitaire <sup>227</sup>. Les FDCs ont surexprimé plusieurs molécules immunosuppressives, notamment CD200, IL411 et CD274, susceptibles de limiter l'activation et la prolifération des lymphocytes T et d'accroître la stringence de la réponse du GC<sup>117</sup>. La forte expression de PD-L1 et PD-L2 sur les FDCs agit également en faveur d'une tolérance immunitaire en activant PD1 sur les cellules T<sup>228</sup>.

Les LZ-FDCs ne sont pas les seules cellules stromales présentes dans le follicule. Une étude décrit chez la souris, un sous-type stromal sécrétant CXCL12 dans la zone sombre dont les propriétés et la lignée seraient davantage liées aux FRCs. Ces cellules représenteraient le sous-type stromal majoritaire de la zone sombre et leurs propriétés semblent être indépendantes du TNF et de la LT <sup>195,229</sup>. Ces cellules aideraient les cellules B à passer du stade centrocytes de la zone claire au stade de centroblastes de la zone sombre par l'expression d'un gradient de CXCL12. Les similarités entre les LZ-FDCs et les DZ-FDCs sont davantage liées à leur morphologie et à leur conformation spatiale dans le follicule qu'à leur profil transcriptionnel. En outre, il convient de noter que ces deux sous-types semblent partager l'expression du gène *SOX9*, un gène connu pour être impliqué dans la différenciation cellulaire <sup>128,229</sup>.

d) Les MRCs

Les MRCs forment une monocouche de cellules sous capsulaire en contact très étroit avec les follicules primaires. Ces cellules sécrètent du CXCL13 et sont impliquées dans le trafic des antigènes et/ou des cellules B du sinus sous-scapulaire vers le follicule B <sup>92</sup>. Mais de trop rares études sont disponibles dans la littérature, peut-être en raison de la difficulté à suivre ces cellules rares dans un modèle murin, ou à les isoler *in vitro*.

#### e) Une niche orchestrant un positionnement stratégique des lymphocytes B

Les cellules B du CG expriment des niveaux élevés du récepteur 2 de la sphingosine-1phosphate (S1PR2), un membre de la famille des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate (S1P) <sup>230</sup>. S1PR2 joue un rôle important dans le positionnement des lymphocytes B des CG, ainsi que dans leur l'homéostasie <sup>230</sup>. Des expériences de migration *in vitro* ont montré qu'en présence de S1P, S1PR2 diminuaient la migration des cellules B des CG vers les chimioattracteurs <sup>231</sup>. S1PR2 favorise le déplacement des lymphocytes B vers le centre du follicule et leur confinement dans le CG. P2RY8 est un récepteur couplé au Ga13 qui joue un rôle dans l'inhibition de la migration et la régulation de la croissance des cellules B dans les tissus lymphoïdes <sup>232</sup>. P2RY8 favorise le regroupement des cellules B activées dans les follicules d'une manière dépendante des FDCs <sup>233</sup>. Le S-geranylgeranyl-L-glutathione (GGG), est un ligand de P2RY8 qui est détectable dans les tissus lymphoïdes au niveau nanomolaire. Le GGG inhibe la migration médiée par les chimiokines des cellules B du centre germinatif et des TFH, et antagonise l'activation de l'AKT phosphorylée dans les cellules B. D'autre part, l'enzyme gamma-glutamyltransférase-5 (GGT5), fortement exprimée par les FDCs, métabolise la GGG en une forme qui n'active pas le récepteur. La surexpression de GGT5 perturbe la capacité de P2RY8 à favoriser le confinement des cellules B dans les centres germinatifs, ce qui indique que GGT5 établit un gradient de GGG dans les tissus lymphoïdes <sup>234</sup>. Un autre déterminant important dans le positionnement et l'organisation des CG est CXCL13. Sans CXCL13, les cellules B se rassemblent toujours en anneaux séparés autour des zones T, mais ne forment pas de clusters polarisés <sup>235</sup>. Les cellules B de souris déficientes en CXCL13 ou en récepteur CXCR5 peuvent former des CG, mais plus petits que la normale et, dans la rate, les CG se forment dans la gaine lymphoïde périartériolaire plutôt que dans le follicule, ce qui suggère que la fonction de CXCR5 est importante pour la localisation des précurseurs des CG <sup>236</sup>. Cependant, dans les ganglions lymphatiques des souris déficientes en CXCR5, les CG sont toujours localisés dans les zones de cellules B, ce qui indique que des facteurs supplémentaires peuvent participer à la localisation correcte des cellules B précurseurs de CG dans les ganglions lymphatiques. La ségrégation des zones claires et sombres est médiée par CXCL13 et CXCL12 <sup>237</sup>. Au sein du CG, CXCL13 est détectable sur les FDCs de la zone claire, mais pas sur les cellules stromales de la zone sombre, et son récepteur CXCR5 est important pour la localisation des cellules B du CG dans la zone claire. CXCL13 et CXCR5 sont également importants pour la polarisation correcte des FDCs associées au CG vers la zone claire. Sans CXCL13, le réseau de FDCs du CG se forme toujours et exprime des marqueurs de maturation, mais il n'est pas positionné par rapport à la zone T comme dans un CG normal. Ce phénomène se produit même chez les souris dépourvues de CXCR5 uniquement dans les cellules hématopoïétiques, ce qui indique qu'il est probablement secondaire à un mauvais positionnement des lymphocytes. CXCL12 se lie à CXCR4, qui est exprimé plus fortement sur les centroblastes que sur les centrocytes et favorise le déplacement des centroblastes vers la zone sombre où CXCL12 est concentré dans le CG <sup>237</sup>. Lorsque la fonction de CXCR4 est perturbée, soit par une déficience génétique dans les cellules B, soit par l'utilisation d'antagonistes chimiques, le réseau polarisé de FDC associés au CG se disperse, ce qui démontre que la signalisation continue de CXCR4 sur les cellules B est nécessaire pour maintenir la polarisation des FDCS <sup>238</sup>.

### f) Pourquoi ces interactions restent-elles si difficiles à étudier ?

Tout d'abord, les lymphocytes B du CG doivent constamment être stimulés par des signaux anti-apoptotiques difficiles à imiter *in vitro*. Néanmoins, Nojima et al ont co-cultivé des cellules B murines naïves avec des cellules stromales conçues pour exprimer CD40L et sécréter du BAFF et de l'IL21<sup>239</sup>. Ils ont ainsi obtenu une activation de type CG *in vitro*, suivie d'un engagement réversible en cellules B mémoire de manière dépendante à l'IL21. Puwarda et al, ont essayé de récapituler un modèle de follicule secondaire (**Figure 18**) en co-cultivant des cellules stromales avec des cellules B activées, associé à du BAFF et de l'IL4 dans un hydrogel <sup>240,241</sup>. Cet hydrogel pouvait contenir diverses séquences RGD, imitant les interactions avec de la matrice extra cellulaire. De plus, des nanoparticules de silicate permettaient de moduler la rigidité de la structure. Dans ce modèle l'engagement des cellules B naïves vers un phénotype activé avec une signature CG était 100 fois plus élevé et rapide que dans une co-culture 2D classique. D'autre part, cet effet a été combiné à une commutation isotypique efficace.



**Figure 18 :** Organoïde folliculaire de cellules B fabriqué *ex vivo*. Schéma des l'interactions *in vivo* entre les cellules B naïves matures avec les cellules T auxiliaires folliculaires (TFH) et les FDCs dans le follicule du tissu lymphoïde. Les FDCs produisent BAFF qui favorise l'activation des cellules B naïves et leur conversion en phénotype de centre germinatif<sup>240</sup>.

Deuxièmement, il est maintenant bien établi que les cellules stromales acquièrent des propriétés différentes selon leur conformation, leur morphologie ainsi que leur organisation spatiale<sup>124</sup>, et que, dans les cultures 2D, les FRCs et les FDCs perdent rapidement leur phénotype. C'est pourquoi Cukierman et al ont comparé la composition et la fonction des cellules stromales cultivées dans une matrice 3D dérivée de tissu et dans une culture cellulaire classique. Il a été clairement mis en évidence que le modèle de matrice 3D différait par son contenu en intégrines alpha5beta1 et alphavbeta3, en paxilline, en d'autres composants du cytosquelette avec d'autre part une activation de la kinase d'adhésion focale (FAK) dans les cellules stromales par rapport à la culture cellulaire 2D <sup>242</sup>.(**Figure 19 et 20**)



**Figure 19 :** Les adhésions *in vivo* sur une matrice 3D diffèrent des adhésions focales ou fibrillaires sur des substrats 2D. (A à E) Images confocales d'une coloration par immunofluorescence indirecte d'un fibroblaste de souris *in vitro* sur lamelle 2D recouverte de fibronectine ; (F à J) sections transversales de mésenchyme d'un embryon de souris E13.5. L'intégrine  $\alpha 5$  [(A) et (F), vert] et la paxilline [(B) et (G), rouge] sont colocalisées avec une organisation fibrillaire dans le tissu mésenchymateux [(H), mais pas sur un substrat 2D *in vitro* (C). La fibronectine

[(D) et (I), bleu] se localise dans les structures fibrillaires *in vivo*. Notez que les adhésions focales (pointes de flèche remplies) et les adhésions fibrillaires (pointes de flèche ouvertes) montrent une localisation différentielle des marqueurs  $\alpha 5$  intégrine et paxilline uniquement sur des substrats plats traditionnels en 2D *in vitro*. Les adhésions matricielles 3D (flèches) identifiées par la triple localisation sont présentes dans des environnements 3D *in vivo*. Barre d'échelle, 5  $\mu m^{242}$ .



**Figure 20 :** Les adhésions aux matrices 3D contiennent de la paxilline phosphorylée sur la tyrosine (pY31), mais pas de FAK phosphorylé sur la tyrosine (pY397). (A) Les fibroblastes ont été cultivés pendant une nuit dans des matrices 3D dérivées de cellules (a à d) ou sur des lamelles recouvertes de fibronectine (e à h). L'intégrine  $\alpha$ 5 (vert) et les molécules suivantes (rouge) : paxilline (a et e), phospho-paxilline31 (b et f), FAK (c et g) ou phospho-FAK397 (d et h) sont présentées dans ces résultats. Notez que même si la protéine FAK se colocalise avec l' $\alpha$ 5intégrine de manière similaire à la paxilline et à la phospho-paxilline31 dans les matrices 3D, ce n'est pas le cas de la phospho-FAK397, sauf dans de petits sites focaux. En revanche, les molécules présentent une colocalisation minimale sur les surfaces recouvertes de fibronectine. (B) Images confocales d'une coloration par immunofluorescence indirecte d'une coupe de mésenchyme d'un embryon de souris E13.5. Les échantillons ont été colorés pour FAK (a, bleu), phospho-FAK397 (b, rouge),  $\alpha$ 5 intégrine (c, vert). Notez que la protéine FAK se colocalisea avec l'intégrine  $\alpha$ 5, mais que le phospho-FAK397 apparaît dans un motif ponctuel se colocalisant mal avec l'intégrine  $\alpha$ 5, comme dans la matrice 3D dérivée des cellules [comparer (A) d à (B) d]. Les encarts sont des vues agrandies des zones encadrées. Barres d'échelle, 5 µm<sup>242</sup>

Troisièmement, les cellules stromales partagent des marqueurs dont certains sont exprimés par les cellules hématopoïétiques. Les quelques marqueurs spécifiques des cellules stromales ne suffisent pas toujours à isoler la minuscule portion de cellules stromales d'un tissu contenant une majorité de cellules hématopoïétiques. Par conséquent, ces cellules restent difficiles à isoler pour des études in vitro. Pour outrepasser ces obstacles, une équipe a mis au point un modèle murin en utilisant le promoteur de Ccl19 pour diriger l'expression de la recombinase CRE dans les cellules stromales lymphoïdes avec une construction de chromosome artificiel bactérien (BAC). Pour évaluer l'évolution des LSC dans ce modèle, ils ont croisé ces lignées transgéniques avec des souris rapporteur de la protéine fluorescente jaune renforcée par Rosa26 (EYFP)<sup>120</sup>. En revanche dans ce modèle, toutes les cellules stromales lymphoïdes sont visualisées, sans distinction. D'autre part, le modèle murin dont la Cre cible le promoteur de CD21 cible également le compartiment B<sup>243</sup>. Une irradiation, suivie d'une reconstitution du compartiment hématopoïétique est donc nécessaire afin d'exclure le ciblage sur les lymphocytes B<sup>244</sup>. Le modèle CXCL13-Cre a permis de démontrer que la solubilisation de CXCL13 par la cathepsin est un élément clef pour l'organisation du centre germinatif<sup>116</sup>. Les souris ColVI-Cre ciblent spécifiquement les MRCs et les FDCs, et non les FRCs dans les plaques de Peyer ; mais pas dans les ganglions périphériques <sup>245</sup>. Un autre modèle présente une disparition du compartiment FRC par croisement du modèle murin précédent avec une souris transgénique contenant le récepteur de la toxine Rosa26-diphteria. Cela a conduit à une délétion efficace du compartiment FRC après l'administration de la toxine diphtérique aux souris <sup>246</sup>. Ces modèles ont mis en évidence la capacité des FRCs à maintenir la survie des cellules B et l'organisation des follicules, et ont caractérisé l'organisation fonctionnelle des FRCs selon la "topologie du petit monde", un réseau parfaitement organisé en trois dimensions. De plus, par l'imagerie in vivo, ils ont pu étudier la migration des leucocytes. Récemment, Marc Bajénoff et son équipe ont développé des modèles de type Ubow (Figure 21) permettant d'identifier l'origine d'un type cellulaire in situ en suivant les cellules filles qui toutes harborent la même couleur que la cellule mère qui a proliféré. Ainsi, son groupe a démontré que lors du développement des ganglions lymphatiques et d'une réponse immunitaire, les FDCs proviennent chez la souris, de la différenciation des progéniteurs MRCs<sup>247</sup>.

Un système organotypique fonctionnel d'amygdale a récemment été mis en culture afin de récapituler les principales caractéristiques des centres germinatifs *in vitro*, notamment la production d'anticorps spécifiques d'antigènes, les hypermutations somatiques et la maturation par affinité, la différenciation des plasmablastes et la recombinaison par commutation de classe pour les tests de différents vaccins dans un système humanisé <sup>248</sup>.



Trends in Immunology

**Figure 21 :** Principe des stratégies Brainbow. (A) Dans Brainbow-1.0, des paires de variants lox incompatibles (LoxP et loxN) sont imbriquées, créant deux possibilités d'excision mutuellement exclusives, médiées par la Crerecombinase. Chacune de ces excisions déclenche l'expression de CFP ou de YFP. (B) Dans Brainbow-2.1, les sites loxP sont positionnés dans des orientations opposées, définissant deux cassettes inversables dans lesquelles deux gènes codant pour des protéines fluorescentes [(n)GFP/nYFP nucléaire et RFP/CFP] sont placées tête-bêche. Cette construction peut être excisée et inversée tant que la Cre est active. Lorsqu'elle se stabilise, le gène codant pour la protéine fluorescente se terminant dans une orientation sens est exprimé. Notez que si une cellule exprime de manière constitutive la Cre chez les souris Brainbow-2.1, elle continuera à changer de couleur pendant toute sa durée de vie. Au contraire, une cellule individuelle exprimant la Cre acquerra une seule couleur pendant toute sa durée de vie chez les souris Brainbow-1.0. Comme chaque copie de Brainbow se comporte indépendamment des autres, la présence de copies multiples donne lieu à des combinaisons de couleur supplémentaires (ici, deux copies de Brainbow-1.0 donnant lieu à six résultats possibles)<sup>247</sup>.

# C. Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers niveaux par ses interactions avec le microenvironnement

Le lymphome folliculaire (FL) est le lymphome indolent le plus fréquent, il se définit dans la quatrième édition de la WHO (Classification of tumors of hematopoïetic and lymphoïd tissues) comme une néoplasie des lymphocytes B du centre germinatif avec au minimum un pattern histologique folliculaire focal <sup>249</sup>.

# 1. Généralités et épidémiologie

Cette pathologie affecte en premier lieu les adultes avec une médiane d'âge de 55 ans et un sexe ratio estimé à 1,2. La survie globale et la survie nette 5 ans après le diagnostic sont relativement proches (respectivement de 79 % et 87 %), signifiant que les personnes atteintes de lymphome folliculaire décèdent plus fréquemment de leur maladie dans les 5 ans suivant leur diagnostic (réseau FRANCIM FRAnce Cancer Incidence et Mortalité)<sup>250</sup>.

# a) Une entité clinique hétérogène

La plupart des patients présentent une atteinte ganglionnaire disséminée atteignant les ganglions périphériques, les ganglions médiastinaux, les ganglions rétropéritonéaux et la moelle osseuse, qui est envahie dans 60% des cas et constitue un facteur prédictif péjoratif indépendant de rechute  $^{249,251}$ . Certains jeunes adultes sont touchés à l'âge de 20 ans, avec une atteinte prédominante au niveau de la tête et de la sphère ORL<sup>249</sup>. Cette entité est en réalité multiple, se divisant en différents sous-types histologiques, définis pour certains d'entre eux par l'OMS comme des variants, essentiellement reliés à leur localisation primaire. Actuellement; l'OMS reconnait 5 variants dans cette pathologie: le lymphome folliculaire de type duodénal, le lymphome folliculaire extra ganglionnaire (majoritairement cutané), le lymphome folliculaire diffus à délétion 1p36 (majoritairement inguinal) et le lymphome folliculaire avec mutations de *NOTCH 1* et *NOTCH 2*.

# b) Facteurs de risques

Peu de facteurs de risque sont décrits actuellement et il existe beaucoup d'études contradictoires à ce propos : pour Troy *et al*, le tabac aurait un rôle protecteur <sup>252</sup>, pour Talamini

*et al* et Morton *et al*, son rôle serait délétère <sup>253,254</sup>. Un indice de masse corporelle élevé pourrait constituer un facteur de risque selon Skibola *et al* <sup>255</sup>. L'exposition aux herbicides utilisés sur les cultures (notamment le glyphosate), ainsi que la proximité résidentielle des installations industrielles ont été reliées à un risque plus élevé de ce cancer <sup>256</sup>. Notons que le glyphosate est commercialisé depuis 1974 par Monsanto et est principalement utilisé pour détruire les adventices. La SNCF est le premier consommateur français de glyphosate. L'utilisation de glyphosate reste autorisée pour les agriculteurs, au moins jusqu'en 2022 (comme dans le reste de l'Union européenne). Par ailleurs, l'exposition aux herbicides a été reliée au développement de la translocation (14-18) <sup>257,258</sup> : en effet, sur une période de 9 ans, on a constaté que la fréquence de cette translocation était augmentée de 253 % dans un groupe exposé aux pesticides, contre 87 % dans un groupe témoin.<sup>258</sup>

### c) Aspects pronostiques et thérapeutiques

Pour 30% des patients la stratégie du « watch and wait » sera la ligne de conduite adoptée. Une stratégie thérapeutique peut cependant être décidée et associera un anticorps monoclonal anti-CD20 (comme le Rituximab) à une chimiothérapie (CHOP ou Bendamustine). Le LF présente une évolution clinique hétérogène et il existe des groupes de patients à haut risque de transformation en lymphome agressif, ou de rechute après une première ligne de traitement. Lorsqu'elle survient, avec ou sans traitement, la progression de la maladie se produit généralement dans un intervalle médian de 31 mois. En effet, une vaste analyse prospective regroupant des essais randomisés de chimiothérapie, d'immunothérapie et de chimioimmunothérapie démontre que la CR30<sup>259</sup> (étude du taux de réponse complète à 30 mois) est un critère de substitution de la survie sans progression (en général faisant l'objet d'une surveillance sur 7 ans) dans les essais de traitement de première ligne du LF. L'utilisation de ce critère peut permettre d'anticiper la décision thérapeutique pour cette population de patients des années avant que les résultats de la PFS n'arrivent à maturité. Environ 20% des patients connaissent une progression rapide de la maladie après le traitement de première ligne. La progression de la maladie dans les 24 mois suivant le premier traitement (POD24) a été identifiée comme un prédicteur robuste de la réduction de la survie globale (OS) <sup>260</sup> <sup>261</sup>. Par ailleurs, la transformation histologique constitue un événement important dans l'histoire naturelle du FL expliquant environ 40% des échecs au cours de la première année suivant l'initiation du traitement <sup>262</sup>. La transformation histologique s'accompagne toujours d'une réduction de la survie et reste un défi thérapeutique majeur.

# Introduction Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers niveaux par ses interactions avec le microenvironnement

Les scores m7-FLIPI et 23-gènes, qui intègrent des paramètres biologiques définies par l'expression ou les mutations d'un panel de gènes ont une valeur pronostique démontrée mais restent largement dépendants des décisions thérapeutiques <sup>263–266</sup>. Le modèle pronostique appelé m7-FLIPI intègre le statut mutationnel de sept gènes (Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), AT-Rich Interaction Domain 1A (ARID1A), Myocyte-specific Enhancer-binding Factor 2 (MEF2B), E1A binding protein p300 (EP300), Forkhead Box O1 (FOXO1), CREB Binding Protein (CREBBP) et Caspase Recruitment Domain Family Member 11 (CARD11)) avec des paramètres de risque clinique (tels que le FLIPI) <sup>264</sup>. Cette approche prometteuse permettrait d'identifier les patients présentant un risque accru d'échec à l'immunochimiothérapie de première ligne. Il est intéressant de noter que plusieurs de ces gènes sont impliqués dans la régulation épigénétique et pourraient avoir un impact théranostique potentiel également. De même, un panel de quatre gènes mutés NOTCH2, Deltex E3 Ubiquitin Ligase 1 (DTX1), Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 A (UBE2A) et Histone cluster 1, H1e (HIST1H1E) fortement liés à un risque plus élevé de transformation en DLBCL a récemment été décrit, offrant un outil moléculaire utile pour l'identification des patients dont le délai de transformation est plus court <sup>267</sup>. Une large étude a récemment proposé le taux de NK circulants comme un nouveau marqueur prédictif de la réponse à l'immunochimiothérapie dans le FL <sup>268</sup>. Malgré leur intérêt clinique apparent, ces modèles ne sont toujours pas utilisés dans la routine quotidienne.

Une étude nationale LymphoCare, a montré que la PFS diminuait avec l'augmentation du nombre de lignes de traitement : 6,6, 1,5, 0,83, 0,69 et 0,68 ans après la première, la deuxième, la troisième, la quatrième et la cinquième ligne de traitement, respectivement <sup>269</sup>. Pour les patients recevant une troisième ligne de traitement ou plus, plusieurs nouvelles options sont disponibles, telles que les inhibiteurs de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et, récemment, les inhibiteurs de EZH2, tels que le tazemetostat. Parmi les différents agents en développement, il convient de mentionner les CAR-T cells, qui ont obtenu des résultats prometteurs <sup>270</sup> <sup>271</sup>.

# 2. Toutes les routes mènent à l'hétérogénéité tumorale dans le lymphome folliculaire

- a) Lymphomagénèse
  - 1. Initiation de la lymphomagénèse

Dans le LF, le premier événement oncogénique se produit dans la cellule pré-B de la MO avec l'acquisition de la translocation t(14;18) conduisant à l'expression constitutive de la protéine anti-apoptotique BCL-2. Au cours de la transition des cellules pro/pré-B, la translocation place le proto-oncogène BCL2 sous le contrôle des activateurs de transcription d'IgH sur l'allèle IgH non exprimé lors de la recombinaison des segments V-D-J. Lors d'une stimulation antigénique, les cellules B naïves t(14;18)+ sont activées de la même manière que les cellules B naïves normales et possèdent un avantage sélectif lors de leur passage dans le CG, ce qui leur permet de survivre même sans forte affinité pour l'antigène et de circuler à nouveau sous forme de cellules B mémoires atypiques. La t(14;18), si elle s'avère nécessaire à la lymphomagénèse du LF dans 90% des cas, n'est cependant pas suffisante pour générer ce lymphome. Des cellules B mémoires t(14 ;18)+ sont en effet fréquemment observées chez des individus sains, avec une incidence croissante avec l'âge. Cependant, la majorité de ces individus ne développeront pas la maladie <sup>272</sup>. Ces cellules sont de ce fait des candidats potentiels très probables pour devenir des Clones Précurseurs Communs (CPCs)<sup>273</sup>. En effet, les cellules B mémoire, ont une longue durée de vie et peuvent persister pendant des décennies, elles ont un potentiel d'auto-renouvellement <sup>274</sup>, et partagent des similarités transcriptomiques avec les cellules souches hématopoïétiques 275. Elles ont une capacité intrinsèque à se disséminer dans tout le corps et à adopter un état quiescent dans la moelle osseuse <sup>27226</sup>. Lors d'une nouvelle stimulation antigénique, la plasticité des cellules B mémoires leur permet de subir une différenciation plasmocytaire terminale ou plus rarement, de subir de nouvelles HMS en repassant par le CG<sup>276</sup>. Elles accumuleraient ainsi un premier set de mutations, comme des gènes MML2, CREBBP, EZH2 pour devenir des CPCs <sup>277,278</sup>. En considérant que ces cellules soient à l'origine d'un clone tumoral, ce phénomène pourrait expliquer l'évolution très indolente de la maladie: ainsi, les cellules B mémoires transloquées (14;18) pourraient persister longtemps en tant que précurseurs de cellules tumorales, avant d'entrer dans le CG avec un avantage de survie conduisant à une exposition répétée aux HMS<sup>279</sup>, favorisant l'accumulation de mutations off target <sup>280</sup>. A noter que l'existence de CPCs est attestée dans des cas où la greffe de CSHs entre frères a abouti au développement d'un LF issu du même clone chez le donneur et le receveur de façon synchronisée plusieurs années après la greffe <sup>281,282</sup>.

De façon intéressante, une large fraction des B mémoires t(14;18)+ expriment une IgM de surface alors que l'allèle transloqué porte des stigmates de CSR <sup>283</sup>, confirmant que ces cellules possèdent des caractéristiques de type pré-FL. En effet, la présence de CSR sur l'allèle non fonctionnel, et non sur l'allèle productif, est atypique parmi les cellules B mémoires circulantes normales. Ce "paradoxe allélique" est une caractéristique du LF. Dans le LF, la CRS se produit aussi fréquemment sur les deux allèles, mais à une fréquence inhabituellement élevée sur l'allèle productif, épargnant spécifiquement la région Cµ de la délétion et permettant l'expression de IgM/D<sup>283</sup>. Par conséquent, bien que la CSR se produise sur les deux allèles dans >80% des cas, la plupart des cas de LF expriment toujours une IgM et seule une minorité exprime un IgG, un IgA, ou aucun Ig<sup>283</sup>. Ce paradoxe allélique indique la présence d'une pression sélective en faveur de l'expression de l'IgM sur une population de cellules B. L'évolution de la cellule transloquée en LF implique de plus un blocage de maturation lié à une perturbation de la fonction normale d'un ou plusieurs régulateurs épigénétiques, codées par les gènes Lysine Methyltransferase 2D (KMT2D/MLL2), EZH2, CREBBP, p300/EP300 ou Histone cluster 1 H1 (HIST1H1) dans plus de 95 % des cas. Ces cellules acquièrent ainsi dans les CG des dizaines d'aberrations génétiques supplémentaires qui influencent des voies clés contrôlant leur développement physiopathologique Au cours du processus d'HMS, les mutations ont tendance à se concentrer dans les régions déterminant la complémentarité (CDR)<sup>284</sup>. Des motifs de séquence d'acides aminés consistant en Asn-X-Ser/Thr peuvent apparaître, où X peut représenter n'importe quel acide aminé sauf la proline. Ces motifs sont des indices pour l'ajout dans le réticulum endoplasmique (RE) d'une chaîne oligosaccharidique (Mannose) qui se liera au résidu Asparagine, un processus connu sous le nom de Nglycosylation. Le résultat est l'expression d'un glycane mannosylé inhabituel dans le site de liaison à l'antigène de presque tous les cas de LF.

Comme chaque cas de LF possède un récepteur distinct et que l'antigène original (étranger) a probablement disparu, un autre ligand, pouvant résider dans les tissus, pourrait être réactif. Comme pour les cellules B normales, l'immunoglobuline pourrait se lier à certains autoantigènes <sup>285,286</sup>. La vimentine a été identifiée comme un potentiel auto-antigène et serait un facteur prédictif de transformation dans le lymphome folliculaire <sup>287,288</sup>. Cependant, le spectre de l'autoréactivité semble variable et est moins fréquent que pour les autres tumeurs des cellules B. Introduction Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers niveaux par ses interactions avec le microenvironnement



**Figure 22 :** Visualisation de la structure clonale des LF évolués et transformés, déduite des études de séquençage. On voit l'expansion des clones préexistants et résistants aux traitements entre le diagnostic et la progression, ce qui contraste avec l'expansion clonale du lymphome folliculaire. L'émergence tumorale proviendrait d'une cellule progénitrice commune (CPC) portant des événements génétiques clés<sup>289</sup>.

# 2. Un profil moléculaire tumoral complexe s'inscrivant dans un contexte d'hétérogénéité cinétique et spatiale

Dans cette partie, nous rapporterons les principales mutations retrouvées dans les clones et les sous-clones du LF. En effet, certaines mutations apparaissent au cours de l'évolution de la maladie, de façon métachrone, sous l'effet de l'activité continue de l'enzyme AID, mais peuvent également être présentes dans une autre niche synchrone à celle de la tumeur d'origine, définissant ainsi des sous-clones.

Les mutations faux-sens inactivatrices du domaine de l'histone acétyltransférase CREBBP sont présentes dans 50 à 75 % des cas. Elles entrainent une baisse de l'expression des molécules du CMH de classe II dans les LF <sup>290</sup>. Ces mutations sont retrouvées dès le début de la pathogenèse <sup>277,291</sup>. *KMT2D/MLL2* code pour une histone méthyltransférase mutée dans 89% des cas de LF<sup>292</sup>. La perte d'expression de MLL2 entraîne une diminution des niveaux globaux de méthylation de H3K4 et une régulation négative d'ensembles de gènes clés impliqués dans la différenciation des cellules B, avec une recombinaison défectueuse du commutateur de classe et un blocage strict des cellules dans un isotype IgM <sup>293</sup>. Sur la base de l'hétérogénéité de l'expression tumorale du CD20, une étude a montré une représentation inégale des mutations de *MLL2* entre les sous-populations tumorales au sein d'un même patient. De plus, ces mutations de *MLL2* seraient apparues tardivement suggérant que la mutation de *MLL2* serait un

événement secondaire dans la lymphomagenèse. Ceci contraste avec d'autres études qui ont observé des mutations MML2 au moment du diagnostic et de la rechute <sup>277,294</sup>. EZH2 est une méthyltransférase qui est affectée par un gain de fonction somatique dans 30 % des cas ce qui entraîne une répression de la signature de différenciation des plasmocytes <sup>295</sup>. En conséquence, les lymphocytes B du CG ne sont plus capables de réintégrer la zone sombre mais peuvent proliférer en tant que centrocytes. Le gain de fonction de EZH2 peut apparaître dans la tumeur transformée comme un sous-clone dominant <sup>294</sup>, ou être présent dans la tumeur initiale et son expression est généralement conservée à travers le temps et les différentes niches <sup>277,294</sup>. Dans une étude récente, deux mutations EZH2 différentes ont été trouvées dans le ganglion lymphatique inguinal de LF et dans l'échantillon de LF duodénal transformé d'un patient <sup>296</sup>. Les mutations d'EZH2 ont été associées à une durée de vie plus longue chez les patients traités par CHOP/CVP, mais pas chez les patients traités par Bendamustine<sup>264</sup>. Le gène TNF Receptor Superfamily Member 14 (TNFRSF14) code pour un ligand du récepteur inhibiteur B- and T-Lymphocyte Attenuator (BTLA). TNFRSF14 est inactivé par des mutations et/ou des délétions chez la moitié des patients atteints de LF. Cette perte de fonction empêche l'interaction entre HVEM et BTLA qui fournit normalement des signaux inhibiteurs à la signalisation du BCR. Pour certaines études, la mutation de *TNSFR14* est un événement tertiaire <sup>291,294</sup>, présent dans les sous-clones, et non présent lors de la rechute, mais il est également considéré par d'autres comme un événement clonal <sup>277</sup>. Les mutations activatrices de Ras-related GTP binding C (RRAGC) se produisent chez 17 % des patients. La mutation de RRAGC entraine une activation des lymphocytes B, mais de manière autonome, en réduisant la dépendance vis-à-vis des TFHs 297

La cathepsine S (codée par *CTSS*), qui est d'expression aberrante chez environ 20 % des patients atteints de LF par mutation ponctuelle activatrice ou par amplification <sup>298</sup>, est nécessaire à la liaison du CMH aux peptides antigéniques <sup>299</sup> et entraîne une régulation positive des gènes du CMH de classe II et une infiltration plus importante des cellules T CD4+ <sup>298,300</sup>. Les gènes *B2M* et *CD58*, impliqués dans l'évasion immunitaire et nécessaires à la reconnaissance des cellules T cytotoxiques CD8+ et à la réponse des cellules NK <sup>301</sup>, peuvent être retrouvés dans certains sous-clones <sup>298</sup>. L'interruption de la voie S1PR2/Ga13 par des mutations inactivatrices chez 10 % des patients conduit à la dissémination du LF et a été détectée chez un seul patient lors de la rechute et de la transformation par Araf *et al.* La perte d'expression de S1PR2 est associée à la persistance des cellules B dans le CG, à une apoptose altérée et à des hypermutations somatiques continues, conduisant à une augmentation de l'hétérogénéité génétique des cellules B tumorales <sup>233,302</sup>. Une proportion plus faible de patients

atteints de LF est également porteuse de mutations de *STAT6* (8 à 12 %). L'activation constitutive de ce gène empêche l'apoptose, en faveur de la survie et de la prolifération des cellules tumorales. Les mutations de *STAT6* amplifient la cascade de signalisation JAK-STAT induite par l'IL-4 <sup>303</sup>. La mutation de *STAT6* est trouvée à un stade précoce de la maladie <sup>291,294</sup>.

### 3. Une plasticité cellulaire tumorale transcriptionnelle

La plasticité des cellules B tumorales dans le LF a été largement étudiée, soit pour identifier des CPCs, soit pour relier un état de différenciation à un profil transcriptionnel ou mutationnel et comprendre l'évolution clonale dynamique des cellules tumorales (Figure 22). Ainsi, Carlotti et al ont étudié les HMS dans les IgH-VH en utilisant une technologie à haut débit sur de l'ADN extrait de 4 sous-populations triées en cytométrie de flux, correspondant à 4 stades de maturation différents des cellules B, sur des biopsies séquentielles <sup>281</sup>. L'hétérogénéité clonale s'est avérée beaucoup plus importante que prévu, elle est cependant restée stable lorsque des cas de rechute ou de transformation de LF ont été analysés. Ainsi, le stade de maturation B ne correspondait pas à des populations sous-clonales spécifiques. D'autre part, aucune des sous-populations triées n'a conduit à l'identification d'un clone avec un profil d'HMS compatible avec celui d'un CPC potentiel <sup>304</sup>. De la même manière, Milpied et al, ont montré que les cellules d'un sous-clone donné pouvaient se trouver dans différents états de maturation cellulaire <sup>305</sup>. Ils n'ont trouvé aucun lien entre le profil d'HMS de la chaîne d'immunoglobuline et l'état transcriptionnel de la cellule de LF, ce qui suggère que d'autres acteurs impactent la diversité phénotypique de la cellule tumorale. Cela contraste avec Andor et al qui ont détecté des fréquences alléliques de gènes mutés variant entre les sous-clones définis par leur expression transcriptionnelle, suggérant que l'hétérogénéité transcriptionnelle dans les cellules B de LF est, en partie, attribuable à l'hétérogénité sous-clonale <sup>306</sup>. De plus, Attaf et al ont démontré que les cellules B de LF pourraient évoluer entre des états transitoires correspondant à des cellules B du CG proliférantes exprimant la Regulator of G-protein signaling 13 (RGS13), ou des cellules B quiescentes de type mémoire surexprimant CXCR4 et CCR7. Cette plasticité des cellules tumorales soulève des questions sur leur localisation et leur microenvironnement relatif dans les zones intra et inter folliculaires respectivement <sup>307</sup>. De la même manière, une approche centrée sur l'étude des éléments régulateurs de l'expression des gènes a révélé deux sous-types distincts de LF de bas grade <sup>308</sup>. La population de sous-type 1 se rapporterait au profil des centrocytes, tandis que la population de sous-type 2 serait plus

# Introduction Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers niveaux par ses interactions avec le microenvironnement

proche des B activés, reproduisant un modèle proche de celui de la classification de Hans des lymphomes B diffus grandes cellules (DLBCL). Cela pose des questions sur ces modes d'évolution divergents. Le sous-type 1 maintiendrait les voies de survie en aval de la signalisation tonique du BCR. En revanche, le sous-type 2 régirait les gènes qui répondent à la signalisation chronique du BCR. Bien que le lien n'est pas été réalisé, il est intéressant de noter que ces voies d'activation pourraient être liées aux profils mutationnels, car les cellules B de LF porteuses des mutations des gènes CD79B et Caspase Recruitment Domain Family Member 11 (CARD11) présentent une signalisation BCR de type chronique entraînant une activation constitutive de la voie NF-κB. Des mutations de *CD79B* et Phosphatase and TENsin homolog (PTEN) ont été trouvées dans des sous-clones de LF chez des patients par Araf et al <sup>294</sup>, contrastant avec Okosun et al qui considèrent les mutations de CARD11 et CD79B comme des événements clonaux. La signalisation active chronique du BCR se distingue de la signalisation tonique de ce dernier par sa dépendance au complexe CBM (CARD11-BCL10-. MALT1) et par le regroupement des BCRs à la membrane. La signalisation tonique est transmise par Syk, qui semble activer la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mTOR <sup>309</sup>. L'inhibition du signal tonique BCR entraîne une activation accrue du gène Forkhead Box O1 (FOXO1) qui peut être muté avec un gain de fonction dans le LF, avec une expression accrue de ses gènes cibles, y compris l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>309</sup>. D'autre part, ces profils d'activation chronique et tonique du BCR pourraient être liés à une capacité d'interaction avec un microenvironnement stromal spécifique, par exemple, il existe une expression accrue du gène CCR7 dans le sous-type 2.

Cette plasticité transcriptionnelle ne peut donc être exclusivement expliquée par les altérations génétiques survenant dans les lymphocytes B tumoraux .

# 4. Une hétérogénéité cytologique qui constitue le premier degré de l'hétérogénéité tissulaire:

Nous avons vu précédemment que certaines mutations pouvaient définir les sous-clones tumoraux, sur les plans cinétique et spatial, constituant un degré d'hétérogénéité tumoral participant à la lymphomagénèse du LF et que l'hétérogénéité transcriptionnelle constituait un degrés d'hétérogénéité supplémentaire. Nous allons constater dans cette partie que les cellules tumorales sont morphologiquement et phénotypiquement hétérogènes également.

Les follicules tumoraux se caractérisent par la présence de cellules tumorales de phénotype CD20+, BCL2+, CD10+, BCL6+ <sup>249</sup>. Ces cellules prolifèrent peu et sont

# Introduction Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers niveaux par ses interactions avec le microenvironnement

morphologiquement très hétérogènes au sein du follicule, adoptant une petite taille cellulaire avec un cytoplasme peu abondant et un noyau clivé, ou une grande taille cellulaire avec un cytoplasme abondant, un noyau pléiomorphe et un ou plusieurs nucléoles bien visibles. La taille des cellules est hétérogène dans les cellules tumorales. Ces cellules tumorales sont, de par leur morphologie, appelées centrocytes pour les cellules de petite taille ou centroblastes pour les celules de grande taille <sup>249</sup>. La proportion de grandes cellules tumorales au sein des follicules a une valeur pronostique et conduit à la classification du LF en plusieurs grades. Un système de classification basé sur le compte du nombre absolu de centroblastes dans 10 follicules néoplasiques par champ à fort grossissement est utilisé pour caractériser le grade histologique. Les grades 1-2 (0 à 15 centroblastes par champs à fort grossissement) sont majoritaires (80%). Les LF de grade 3 se définissent comme ayant plus de 15 centroblastes par champs à fort grossissement et sont ensuite subdivisés en LF 3A (centrocytes encore présents) et LF 3B (composés exclusivement de centroblastes), les LFs de grade 3B étant habituellement considérés comme un lymphome agressif similaire au DLBCL<sup>310</sup>. Cependant, on peut affirmer que les grandes cellules ont une localisation intrafolliculaire préférentielle et que les petites cellules semblent transiter plus facilement entre la zone interfolliculaire<sup>249</sup>, la circulation sanguine<sup>311</sup> et la moelle osseuse<sup>312</sup>. La plupart des patients atteints de LF présentent un petit nombre de cellules B tumorales circulantes. Les cellules tumorales circulantes sont petites, clivées de manière irrégulière et présentent une morphologie résiduelle de centrocytes <sup>313</sup>. Les cellules tumorales interfolliculaires des ganglions lymphatiques et les cellules tumorales de la moelle osseuse ont en commun une petite taille cellulaire et fréquemment une perte ou une diminution de l'expression du CD10<sup>313,314</sup>. Cependant, aucune étude n'a comparé le profil mutationnel et transcriptomique des cellules tumorales circulantes et des cellules tumorales situées dans la moelle osseuse. Dans le cas du LF, il est établi que les cellules tumorales peuvent présenter une maturation post-GC en cellules B mémoires et en plasmocytes. En effet, même si le phénotype plasmocytaire tumoral est très rare, une restriction de la chaîne légère dans les plasmocytes néoplasiques peut être observée dans les zones intra et interfolliculaires, et cet état de différenciation est associé à une lymphocytose absolue dans le sang périphérique <sup>315</sup>. En plus de ces différents états cellulaires, une étude suggère que les cellules de la zone du manteau IgD+ peuvent être porteuses d'une t(14;18)  $^{316}$  et donc faire partie du clone tumoral, ce qui souligne une énorme plasticité de ces dernières, tout au moins sur les plans morphologiques et phénotypiques.

L'hétérogénéité génétique, transcriptionnelle, phénotypique et morphologique des cellules B tumorales pourrait dépendre de deux mécanismes non mutuellement exclusifs: des

altérations génétiques intrinsèques à la cellule, ou la modification de facteurs extrinsèques fournis par le microenvironnement. Nous allons ainsi présenter dans une deuxième partie les acteurs du microenvironnement dans le LF.

### b) Hétérogénéité du microenvironnement de soutien du LF

Le LF dépend d'un microenvironnement complexe co-évoluant avec les cellules B tumorales, qui favorise la création d'une niche de soutien à la tumeur <sup>317</sup>. En accord avec cette idée, la majorité des études portant sur les biomarqueurs dans le LF ont montré que les critères prédictifs étaient majoritairement liés à la composition et l'organisation du microenvironnement tumoral (TME) plutôt qu'à son profil génétique. Cette notion amène incontestablement à l'idée que cette entité est avant tout déterminée par la nature du microenvironnement local, lui-même hétérogène d'une niche tumorale à l'autre. La niche tumorale du LF dans le ganglion conserve une architecture folliculaire, les follicules envahis contiennent, semblablement aux follicules physiologiques, des FDCs et des TFHs associés à des cellules B tumorales, et la zone extrafolliculaire environnante présente un réseau dense de cellules réticulaires fibroblastiques (FRCs) et de LT CD8. Cependant, les acteurs de ces niches tumorales présentent des caractéristiques phénotypiques, transcriptomiques et fonctionnelles spécifiques, mettant en évidence des interactions dynamiques avec les cellules B tumorales, interagissant également eux même entre eux. De façon intéressante, l'infiltration de la MO au moment du diagnostic est caractérisée par une différenciation ectopique de cellules stromales de type FDCs et FRCs surexprimant CXCL12 et la Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich (SPARC) <sup>318</sup> impliquée dans le dépôt et l'organisation du collagène, et exprimant de façon ectopique CXCL13 et CCL19/21<sup>79</sup>. Il existe également un enrichissement local en LT CD4<sup>319</sup>. La présence de ces acteurs suggère une dépendance des cellules B tumorales à un TME proche de celui des ganglions.

### 5. Le microenvironnement lymphocytaire T

Les cellules T interagissent avec les cellules tumorales en favorisant des réponses antitumorales ou, au contraire, en fournissant des signaux pro-tumoraux de soutien. Les cellules cytotoxiques CD8+, avec les cellules NK et les cellules T $\gamma/\delta$ , sont les médiateurs des réponses antitumorales <sup>320,321</sup>. Cependant, les cellules de LF peuvent contrecarrer cet effet antitumoral *via* de nombreux mécanismes. Tout d'abord les cellules B tumorales sécrétent de l'interleukine
12 (IL-12) qui conduit à l'épuisement des cellules T CD8+ et au recrutement de cellules Trégulatrices CD4+, les Tregs <sup>322</sup>. Les cellules T de LF présentent également une motilité altérée dépendante de LFA-1<sup>323</sup> et perdent leur capacité à former la synapse immunologique avec les cellules tumorales <sup>324</sup>, alors que les cellules T CD8 armées de Granzyme B sont retenues à la périphérie des follicules tumoraux <sup>325</sup>. Le compartiment des cellules TFHs est amplifié dans le LF. Plusieurs études ont récemment décrit le phénotype et la fonction des LT CD4 dans la niche de LF, révélant que les TFHs de LF surexpriment l'IL-4 et le CD40L, impliqués dans l'activation directe des cellules tumorales <sup>319,326</sup>. De plus, les cellules TFHs intratumorales exprimant l'IL-4 et le CD40L induisent la production de CCL17 et CCL22 par les cellules tumorales favorisant ainsi le recrutement des Tregs <sup>327</sup>. L'IL-4 induit la phosphorylation du signal transducteur et activateur de transcription 6 (STAT6) dans les cellules de LF primaires <sup>327</sup> et la majorité des cellules tumorales p-STAT6+ sont localisées à proximité des TFHs <sup>326</sup>. D'autre part, il a été récemment démontré que les TFHs et les cellules tumorales proliférantes formaient des synapses immunitaires <sup>328</sup>. La production d'IL-4 par les TFHs est également impliquée dans la production de CXCL12 par les cellules stromales de LF<sup>79</sup>. CXCL12 induit la migration des cellules B primaires de LF, leur adhésion au stroma et l'activation par phosphorylation de la tyrosine kinase Syk, un autre médiateur clé de la signalisation du BCR, et de sa cible en aval, la Extra cellular Regulated Kinase (ERK) 79. En conséquence, la migration des cellules B de LF est drastiquement diminuée en réponse à un inhibiteur du récepteur CXCR4, à l'inhibiteur de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK) ou ibrutinib, ainsi qu'à l'inhibiteur sélectif de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) qui se lie au domaine catalytique de la PI3K\delta, l'idelalisib<sup>79</sup>. D'autre part, le CD40L produit par les TFHs stimulerait la capacité des cellules B de LF à répondre à l'IL-15 dérivé des macrophages associés aux tumeurs (MATs)<sup>329</sup>. Par ailleurs, la production d'IL-4 par les TFHs augmente l'expression de la protéine Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) par les cellules myéloïdes et d'IgM par les cellules B de LF, favorisant ainsi l'interaction BCR/DC-SIGN et, de ce fait, l'activation du BCR <sup>330</sup>. Il a également été proposé que les cellules B de LF engagent le récepteur inhibiteur BTLA sur les cellules Τγδ infiltrantes, bloquant ainsi leur prolifération <sup>331</sup>. Cependant, il faut rappeler que HVEM, le ligand de BTLA, est perdu par mutation chez environ 40% des LFs<sup>332</sup>. Les cellules NK présentent également un phénotype modifié et pourraient être directement inhibées par un ligand du récepteur inhibiteur CD161, le lectin-like transcript 1 (LLT1), surexprimé par les cellules B de LF <sup>333</sup>. L'expansion des cellules immunosuppressives est une autre caractéristique de la niche du LF avec une forte amplification des cellules T régulatrices

Introduction Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers niveaux par ses interactions avec le microenvironnement

CD25<sup>hi</sup> activées, notamment les Tregs classiques CXCR5negPD1neg et les cellules T régulatrices folliculaires (TFR) CXCR5posPD1pos <sup>334,335</sup>. Au-delà de leur recrutement, les cellules B de LF sont impliquées dans la polarisation des cellules T vers le phénotype régulateur, par la surexpression d'ICOS-L<sup>336</sup>, de CD70<sup>337</sup>. Les TFR sont connus pour contrôler la réaction normale du CG en supprimant à la fois la fonction des TFHs et des cellules B<sup>338</sup>. Dans le LF, les Treg/TFR pourraient inhiber les TFHs et l'activation des cellules B<sup>334,335</sup>, entravant ainsi la croissance du LF. Ces activités opposées, entre TFH et Treg, pourraient expliquer la controverse sur la valeur pronostique du nombre et de la localisation des Tregs dans les LF. Par exemple, les patients présentant des cellules FoxP3+ (forkhead box protein 3) intrafolliculaires ou périfolliculaires ont un risque significativement plus élevé de transformation histologique et une survie plus courte que ceux présentant des cellules FoxP3+ dispersées dans un pattern diffus <sup>339</sup>. En revanche, un nombre élevé de cellules FoxP3+ infiltrant la tumeur est lié à une meilleure survie globale (OS) dans le LF <sup>340</sup>. La pertinence clinique de l'étude des Tregs et des TFHs dans le LF a été mise en évidence par l'effet d'un inhibiteur de PI3Kô, l'idelalisib qui perturbe le dialogue entre les cellules LF et les TFHs. Des études in vitro ont également montré que l'idelalisib, diminuait la prolifération des cellules tumorales et remodelait le microenvironnement immunitaire en inhibant le recrutement des cellules Treg par le biais d'une diminution de sécrétion de CCL22 341. Ce microenvironnement lymphocytaire T est de ce fait hétérogène de part l'identité de ses acteurs, mais aussi de par son organisation spatiale.

# 6. Le microenvironnement macrophagique

Les macrophages présentent une plasticité remarquable et ont été initialement divisés en six sous-types (immunosuppresseur, angiogénique, associé aux métastases, invasif, activé et périvasculaire), en fonction des stimuli qui déclenchent leur activation <sup>342</sup>. Les MATs se caractérisent par une grande hétérogénéité morphologique, phénotypique et fonctionnelle <sup>343</sup>. Cependant, de façon très grossière et imparfaite les MATs ont été historiquement divisés en M1 (proinflammatoires) et M2 (anti-inflammatoires), représentant probablement les deux extrémités d'un spectre continu de différentiation<sup>344–346</sup>. Les MATs M1 pourraient provoquer une réponse Th-1 pour jouer un rôle antinéoplasique conduisant à la suppression de la tumeur, tandis que les MATs M2, avec une faible capacité de présentation de l'antigène, pourraient favoriser la croissance et la survie de la tumeur en induisant l'angiogenèse et l'immunosuppression <sup>347</sup>. Le recrutement des MATs est médié par des chimiokines telles que

CCL2, CCL5, CCL7 et CXCL1 et par le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) <sup>348–353</sup>. Au niveau du site tumoral, une interaction complexe se produit entre les MATs, les cellules malignes et les cellules stromales, dans laquelle les facteurs dérivés du stroma et de la tumeur, tels que IL4, IL-10, IL-13 et TGF-β, provoquent un changement vers la polarisation M2  $^{354-357}$ . Le sous-type M1, induit par le GM-CSF et l'interféron- $\gamma$ , sécréte des molécules proinflammatoires, telles que l'interleukine (IL)-1, IL-6, IL-12, IL-23, TNF-a, NO, CXCL9, CXCL10, CXCL11 et des radicaux libres ; à l'inverse, le sous-type M2 exprime des molécules anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, le Tumoral Growth Factor (TGF- $\beta$ ), CCL17, CCL18, CCL22, le récepteur de mannose C de type 1 (CD206), le récepteur scavenger de classe A (CD204) et le récepteur scavenger de l'hémoglobine (CD163), qui sont actuellement utilisés comme marqueurs associés aux M2 <sup>344–347</sup>. La molécule cluster of differentiation 47 (CD47) est une protéine membranaire largement distribuée sur les surfaces membranaires de diverses cellules, y compris les cellules tumorales. Son ligand correspondant, la protéine régulatrice du signal alpha (SIRPα), est une protéine membranaire exprimée notamment sur les macrophages, leur interaction directe inhibe la phagocytose. C'est pourquoi le CD47 est souvent appelé le signal "don't-eat-me". Chen et al ont récemment proposé une autre classification des macrophages dans le LF: ils ont ainsi identifié trois sous-populations de monocytes/macrophages basés sur l'expression de CD14 et SIRPa (CD14+SIRPahi, CD14-SIRPalow, et CD14-SIRPaneg). Les cellules CD14+SIRPahi seraient immunosuppressives en inhibant l'activité cytotoxique T. Les cellules CD14-SIRPalow présenteraient des capacités de mobilité et de phagocytose moindres, et stimuleraient la fonction des cellules T au lieu de la supprimer. Il est intéressant de noter que le sous-ensemble CD14-SIRPaneg exprime des marqueurs macrophagiques distincts par rapport aux deux autres sous-populations. En effet, sa capacité à migrer et à phagocyter serait plus limitée. Ces derniers conserveraient cependant une fonction de stimulation des lymphocytes T. L'utilisation de SIRPa-Fc pour bloquer l'interaction entre SIRPa et CD47, seul ou en association avec le rituximab, montre une augmentation de la phagocytose de manière générale pour les trois sous-populations. Cliniquement, l'augmentation du nombre de cellules CD14+SIRPahi serait associée à une survie inférieure dans le LF. En revanche, la présence de cellules CD14-SIRPalow semblerait être corrélée à une meilleure survie 358.

Même si la valeur pronostique de CD163 comme marqueur M2 est débattue dans le LF, une densité élevée de MATs CD163-positifs a été associée à une néovascularisation située dans la zone interfolliculaire <sup>359</sup>. A l'ère du pré-rituximab certaines études ont suggéré que

# Introduction Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers niveaux par ses interactions avec le microenvironnement

l'infiltration de macrophages était corrélée à une survie plus faible, cependant d'autres études ont montré des résultats opposés <sup>339,360–363</sup> depuis l'ajout du rituximab à la chimiothérapie. Ainsi, un taux élevé de macrophages chez les patients traités par R-CHOP a finalement été associé à une meilleure survie globale. Le Colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) exprimé par les macrophages constitue un élément important dans la différenciation et la survie de ces derniers. Il convient de noter que des niveaux élevés d'expression du CSF-1R dans le LF ont été associé à un grade histologique plus élevé et à un risque de transformation, ce qui suggère que l'inhibition de CSF-1R pourrait être pertinente dans le traitement de la maladie <sup>364</sup>. Bien que CSF-1R soit exprimé dans les sous-types M1 et M2, son inhibition par le pexidartinib diminue préférentiellement la viabilité des macrophages M2 et les repolarise en macrophages M1, ce qui suggère qu'il pourrait rééduquer les MATs. Les sites de N-glycosylation sont introduits chez plus de 80% des patients au sein de régions variables des chaînes lourdes et légères du BCR et sont occupés par des oligomannoses atypiques <sup>365</sup>. Cette modification est un événement précoce dans la pathogenèse des LF et est conservée à travers les événements de rechute et de transformation malgré des preuves d'évolution subclonale du BCR, suggérant un avantage sélectif des clones de cellules B hébergeant des BCR N-glycosylés 366. Les macrophages surexprimant le DC-SIGN <sup>330</sup>, sont capables de déclencher une agrégation et une activation prolongées du BCR N-glycosylé <sup>367</sup>. Par ailleurs, une étude récente suggère que la liaison du DC-SIGN sur les cellules de LF fournit un signal indépendant de l'antigène qui, bien que de faible niveau, permettrait d'engager des voies de signalisation favorisant la survie et la prolifération des cellules B tumorales <sup>368</sup>. Les macrophages synthétisent également la protéine SPARC/osteonectine, qui est importante pour le dépôt de collagène IV, l'invasion accrue des cellules tumorales et l'adhésion à d'autres composants de la MEC (comme la fibronectine). Il a été démontré que SPARC/osteonectine était nécessaire à la formation de métastases spontanées à partir de la tumeur primaire <sup>369</sup>. Le collagène 1 fibrillaire favorise également le processus d'invasion, car les cellules tumorales et les macrophages se déplacent environ dix fois plus vite sur ces structures que dans le stroma lui-même. Cela a pour conséquence de recruter les cellules vers les vaisseaux sanguins étant donné que ces fibrilles collagéniques ancrent également ces structures <sup>370</sup>. Pendant le développement de la glande mammaire, il a été démontré que les macrophages favorisaient la fibrillogenèse du collagène <sup>371</sup>. Ainsi, les macrophages sur les vaisseaux émettent des signaux qui entraînent la migration des cellules tumorales le long des fibrilles de collagène vers les vaisseaux où les cellules tumorales peuvent s'échapper dans le système vasculaire avec l'aide des macrophages. Toutes ces études ne situent cependant pas ces différentes sous-populations de macrophages au sain d'une niche spatiale tumorale de LF, ce qui reste à caractériser afin d'identifier l'impact de ces sous populations au sein de l'organisation de la niche tumorale.

# 7. Mécanismes de l'activité pro-tumorale des cellules stromales

Les activités pro-tumorales des CAFs, notamment la survie, la prolifération et la dissémination des cellules cancéreuses, l'échappement immunitaire et la résistance aux médicaments, ont été récemment décrites dans les cancers solides. Ils pourraient également contribuer au recrutement des cellules de LF et à leur adhésion à des niches cellulaires protectrices. En effet, la valence des cellules stromales est double: d'une part elles présentent des propriétés fonctionnelles propres leur permettant d'interagir avec les autres types cellulaires, et d'autre part, elles constituent l'échafaudage, l'organisation et la protection physique de la tumeur de par leur conformation tridimensionnelle et leur organisation spatiale. On notera par ailleurs que cette conformation tridimensionnelle est un facteur clé de leur fonctionnalité.

# (a) Sur le plan fonctionnel

Une augmentation de la production de CXCL12 a récemment été mise en évidence dans les FL-CAF du ganglion et de la moelle contribuant à la migration, à l'adhésion et à l'activation des cellules B tumorales qui présentent un phénotype CXCR4posCXCR5posCCR7lo<sup>79</sup>. Il est intéressant de noter qu'il a été récemment démontré que l'héparanase, une endoglycosidase qui déclenche le désassemblage de la matrice extracellulaire et augmente la biodisponibilité des facteurs de croissance liés aux sulfates d'héparine, y compris CXCL12, est fortement exprimée dans environ 50 % des LFs et DLBCLs <sup>372</sup>. De plus, VCAM-1/CD106, le ligand de l'intégrine 4 (VLA-4), aurait une implication dans la lymphomagénèse des lymphomes à cellules B du CG et la résistance à l'anticorps anti-CD20 Rituximab<sup>373</sup>. Il a également été démontré que les FL-CAFs pouvaient empêcher l'apoptose des cellules B tumorales in vitro grâce à un ensemble de mécanismes qui n'ont été que partiellement élucidés, avec notamment la production de ligands Hedgehog (Hh), de BAFF et de TGF-b, la molécule immunosuppressive prostaglandine E2 (PGE2), la production des transporteurs ABC de résistance aux médicaments et l'activation de *C-MYC* dans les cellules tumorales  $^{227,373-376}$ . Outre ces fonctions de soutien direct des cellules B, les FL-CAFs ont été proposés comme organisateurs de la niche cellulaire du LF. Les FL-CAFs surexpriment CCL2 et recrutent des monocytes, qui se transforment ensuite en macrophages pro-angiogéniques et anti-inflammatoires <sup>377</sup>. Les FL-CAFs favorisent également le recrutement et la survie des neutrophiles pro-tumoraux, au moins en partie par la libération de grandes quantités d'IL-8 <sup>378</sup>. Par ailleurs, il a été proposé que les cellules stromales favorisent la croissance des lymphomes à cellules B dans un modèle murin de lymphome des glandes lacrymales par le recrutement de cellules Tregs et de cellules myéloïdes <sup>379</sup>.

Il convient de noter que la majorité des études fonctionnelles ont été réalisées à l'aide de cellules stromales maintenues in vitro sur le long terme et qu'une caractérisation détaillée in situ/ex-vivo de l'hétérogénéité et de la fonction des CAFs reste toujours un véritable défi. Comme nous l'avons vu plus haut, les cellules stromales lymphoïdes forment une entité hétérogène et plastique au sein des tissus lymphoïdes normaux, posant la question de la nature des cellules stromales dans le LF. Il a été démontré que les FDCs disparaissent progressivement dans le ganglion de LF, survenant de manière concomitante à une forte diminution de la production de LT par les cellules B tumorales par rapport aux cellules B normales du CG <sup>79,380,381</sup>. On ne sait pas encore si cette disparition des FDCs résulte de leur dédifférenciation ou de leur remplacement par un autre sous-type de cellules stromales. Il est intéressant de noter que les MRCs, des précurseurs supposés des FDCs, sont pratiquement absents du ganglion de LF (nos données non publiées). En revanche, le fait que les FL-CAFs et les DZ-FDCs sécrètent du CXCL12 indépendamment du niveau de sécrétion de lymphotoxine fait suggérer que les DZ-FDC pourraient constituer une partie du pool des FL-CAFs<sup>382</sup>. Très récemment, nous avons également mis en évidence une surexpression de la chimiokine CCL21 par les FL-CAFs, à la fois en péri et en intrafolliculaire ce qui pourrait participer à la sortie des B de LF qui expriment fortement CXCR4 et CCR7 mais down-régulent l'expression des récepteurs de confinement S1PR2 et P2RY8 dans le CG<sup>117</sup>. Finalement, il existe certainement plusieurs sous-types de FL-CAF organisant les différentes niches cellulaires avec des fonctions spécifiques, comme cela a été récemment proposé dans le cancer du sein <sup>383</sup>.

Quelle que soit leur origine, connaitre les mécanismes qui sous-tendent la différenciation des FL-CAFs et leur organisation reste d'un intérêt crucial compte tenu de leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques. Les cellules B de LF pourraient contribuer directement à l'activation du réseau de FRCs, en induisant la production de CCL2 et d'IL-8 de manière TNF-dépendante <sup>78,377,378</sup>. Le TNF et la LT agiraient en synergie avec le TGF– $\beta$ , exprimé par les B tumoraux, pour induire un phénotype de type FL-CAF <sup>117</sup> à partir des précurseurs locaux. Cependant, les cellules non malignes du microenvironnement pourraient également participer à la polarisation des FL-CAFs. Par exemple, les neutrophiles, recrutés par les cellules stromales productrices d'IL-8, contribuent à leur polarisation par l'activation de la voie NF-kB <sup>378</sup>. De plus, les TFHs surexpriment l'IL-4 qui induit un phénotype caractérisé par une forte expression de transglutaminase, VCAM-1, CXCL12 et une baisse d'expression de la podoplanine dans les

progéniteurs mésenchymateux humains et les cellules de type FRC, un profil proche de celui identifié *in situ*<sup>79</sup>. Les TFHs produisent également de grandes quantités de TNF et de LT et les cellules stromales sont plus aptes à sécréter du CXCL12 sous la dépendance de l'IL-4, une fois polarisées par le TNF/LT <sup>79</sup>. (**Figure 23**). Il est également intéressant de noter la mise en évidence d'un nouveau mécanisme de polarisation à distance du stroma pro-tumoral médullaire: la production de vésicules extracellulaires (EVs) par les B tumoraux, ces EVs étant capables d'induire la synthèse de CXCL12 mais également d'autres facteurs caractéristiques des niches de soutien médullaires par des précurseurs mésenchymateux.



**Figure 23:** Interactions entre les cellules B et les cellules stromales au sein des niches tumorales de LF. Les fibroblastes associés au cancer du LF (FL-CAF) forment un compartiment hétérogène surexprimant des facteurs impliqués dans l'activation directe des cellules B du LF et dans le recrutement et l'activation d'autres composants de la niche tumorale, tels que les macrophages associés à la tumeur (TAM) et les Tfh. Dans la moelle osseuse de LF, les vésicules extracellulaires (EVs) dérivées des cellules B de LF contribuent à la polarisation des cellules stromales mésenchymateuses de la moelle (BM-MSC) pour créer une niche tumorale comprenant finalement des cellules stromales lymphoïdes matures et des cellules T CD4pos mélangées à des cellules B malignes dans des agrégats nodulaires<sup>384</sup>.

# (b) Les interaction B/ stroma dans le lymphome folliculaire: comment les étudier

Si les interactions B/stroma en situation physiologique se révèlent être cruciales dans la maturation et l'activation du lymphocyte B, le microenvironnement stromal est tout simplement indispensable pour la survie des cellules tumorales de LF. Etudier ces interactions permettrait

# Introduction Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers niveaux par ses interactions avec le microenvironnement

d'une part d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la survie des cellules B tumorales, et d'autre part, d'identifier des cibles thérapeutiques. Plusieurs équipes ont rapporté que les cellules stromales lymphoïdes du LF sont impliquées dans l'organisation de la niche et soutiennent la survie des cellules B tumorales <sup>78</sup>. Plusieurs questions restent cependant en suspens : premièrement : quel est le phénotype stromal requis pour les interactions stroma/cellules B dans le LF ? Deuxièmement : les cellules stromales dans le LF évoluent-elles à partir d'un précurseur indifférencié ou d'un sous-type stromal physiologique bien différencié comme les FRCs ou les FDCs ? Une autre question sans réponse est la nature des interactions directes et indirectes qui entrent en jeu dans l'effet de soutien des cellules stromales de LF. Et enfin, les cellules B tumorales sont-elles nécessaires à l'acquisition et au maintien du phénotype de ces cellules stromales ? D'autre part, l'implication de la matrice extracellulaire et les forces biolomécaniques médiant les interactions entre les cellules B tumorales et les cellules stromales sont des phénomènes très peu étudiés, nécessitant des modèles d'études complexes, laissant la question de leur mise en jeu en suspens. Pour étudier les interactions entre les cellules stromales et les cellules B tumorales dans le ganglion lymphatique de LF, de nombreuses limites restent à outrepasser: premièrement, les lignées de cellules B présentent un index de prolifération élevé, alors que les cellules B tumorales adoptent une évolution indolente. Deuxièmement, la conformation spatiale des cellules stromales est un élément clé de leur fonctionnalité. Par conséquent, les modèles 2D sont limités pour les études des propriétés des cellules stromales en présence de cellules B tumorales. Un autre point nécessite de prendre en compte les interactions avec la matrice extracellulaire et les forces mécaniques médiant les interactions entre les cellules B tumorales et les cellules stromales, connues pour exercer une influence majeure sur le comportement du lymphocyte B. Les modèles murins restent actuellement très imparfaits même s'ils ont permis une grande avancée dans la compréhension de la lymphomagénèse et de l'influence de certaines anomalies génétiques dans la progression tumorale.

Les études *in situ* restent également limitées: les tissus humains s'avèrent être de moins en moins disponibles en raison de l'avènement des micro-biopsies. Pourtant les organoïdes de lymphomes dérivés de patients reproduisent les interactions réelles au sein du microenvironnement du patient et pourraient constituer un modèle pertinent pour récapituler le profil transcriptionnel et mutationnel ainsi que la réponse thérapeutique de la tumeur primaire <sup>385,386</sup>. Ces modèles peuvent être générés directement à partir d'une biopsie, en préservant les cellules immunitaires endogènes et les autres types de cellules ou être établis séparément des cellules avant la co-culture, ce qui facilite l'étude des interactions cellule-cellule spécifiques <sup>387</sup>. Ils représentent un outil prometteur pour développer et tester des approches de médecine personnalisée<sup>388</sup>. L'une des principales limites des organoïdes impliquant différents types de cellules est que les conditions de co-culture doivent être optimisées pour atteindre un équilibre qui convient à tous les types cellulaires impliqués.

Les sphéroïdes tumoraux 3D sont des amas tumoraux formés in vitro par la culture cellulaire 3D. Ces sphéroïdes imitent l'architecture tridimensionnelle des organes et les limites de diffusion des molécules thérapeutiques ainsi que le transport de molécules autre dans les tumeurs, ce qui se révèle être pertinent pour une analyse précise de l'efficacité des médicaments <sup>389</sup>. Au cours des dernières décennies, diverses méthodes de culture de sphéroïdes 3D ont été développées, dont la culture de sphéroïdes 3D avec ou sans « échafaudage » (structure prédéterminée). La culture cellulaire 3D à base d'échafaudage utilise des polymères naturels ou synthétiques mimant la MEC, favorisant ainsi la croissance cellulaire. L'introduction de matériau de MEC permet d'établir des interactions solides entre les cellules et la MEC. La culture cellulaire 3D sans échafaudage ne nécessite pas de matériaux externes en suspension et oblige ainsi les cellules à s'agréger. De ce fait, flacons rotatifs et spinners, gouttes suspendues, plaques à fixation ultra-faible (plaques en U) et plaques microporeuses sont des outils fréquemment utilisés dans la culture 3D. Cependant, ces méthodes ont leurs propres inconvénients. Les flacons rotatifs et les flacons tournants par exemple, induisent une contrainte de cisaillement élevée, ce qui peut entraîner des dommages cellulaires pendant la culture. Il est donc difficile de contrôler l'uniformité des sphéroïdes. Une première avancée a été de prendre en compte à la fois la conformation tridimensionnelle des cellules, mais aussi l'organisation relative au sein des trois dimensions, pouvant être médiée par un maillage modulable de la MEC. Le modèle d'hydrogels chargés par des poly-éthylène glycols (PEG), développé par Tian et al, a permis la fonctionnalisation de l'hydrogel avec une densité et une spécificité précise des intégrines. Ils ont également intégré à la matrice des liaisons di-thiolées pouvant se dégrader enzymatiquement à façon en fonction de la conformation du maillage souhaitée et ont incorporé des cellules stromales lymphoïdes comme sous-type de cellules stromales de soutien. De cette façon, ils ont montré une expression différentielle des intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha 4\beta 1$  dans les lymphomes à cellules B<sup>390</sup>. Des essais in vitro et in vivo ont récemment montré que la rigidification du maillage stromal, la nature de la MEC et des intégrines sont critiques pour la survie et la signalisation des cellules tumorales. De plus, comme il a été démontré que le flux lymphatique et la vascularisation sont amplifiés dans les lymphomes B, il a été proposé, que les contraintes mécaniques et de cisaillement des fluides peuvent agir comme un stimulus biophysique important sur les cellules de lymphome<sup>391</sup>.



**Figure 22 :** Apoorva *et al.* font état d'un microréacteur de lymphome permettant de comprendre les facteurs biophysiques qui régulent la croissance des lymphomes et leurs réponses thérapeutiques. Ils décrivent le rôle des forces des fluides, provenant des lymphatiques et néo-vaisseaux, dans la mécanomodulation des signalisations des intégrines et des récepteurs des cellules B.

Ainsi, les contraintes de cisaillement des fluides rapportées dans le sinus sous-capsulaire, influenceraient la signalisation des intégrines et celle du BCR avec des conséquences sur la prolifération cellulaire. De plus, la sécrétion de TNF par la lignée de lymphome utilisée a augmenté dans des conditions de flux après 72h<sup>391</sup>.

Mannino et al ont proposé un modèle *in vitro* récapitulant à l'aide d'un système microfluidique, l'impact du flux vasculaire sur la diffusion des drogues au sein des DLBCLs et de leur microenvironnement à l'aide d'une membrane poreuse circulaire traversant un hydrogel contenant les cellules du microenvironnement <sup>392,393</sup>.

Introduction Le lymphome folliculaire, une pathologie dont l'hétérogénéité est médiée à divers niveaux par ses interactions avec le microenvironnement



**Figure 23 :** Le modèle de microvascularisation de DLBCL sur puce est fabriqué à l'aide d'articles de laboratoire courants. A) Schéma général mettant en évidence l'hydrogel intégré (à gauche) dans la macrostructure polydimethylsiloxane-based (PDMS) (à droite). B) Schéma du processus de fabrication. Le PDMS a été moulé autour d'un fil d'acier inoxydable, et un trou a été percé. Ce trou a été rempli avec l'hydrogel contenant les cellules tumorales qui a polymérisé. Le fil en acier inoxydable a été retiré et le microcanal résultant a été cultivé avec des cellules endothéliales<sup>392,393</sup>.

Le premier modèle de culture 3D des LF sans échafaudage, donc en auto organisation, a été le Multi Aggregates of Lymphoma Cells (MALC)<sup>394</sup> adapté de la méthode de la goutte suspendue. Ce modèle génère de petites gouttes en suspension de cellules, conduisant à l'agrégation de cellules primaires de LF. Ainsi, dans ce modèle, les études de comparaison de l'expression génique des cellules cultivées en 3D par rapport à celles cultivées en 2D ont permis d'identifier plus de 7000 gènes différentiellement exprimés. Les gènes les plus différentiellement exprimés étaient impliqués dans la réponse à l'hypoxie, la signalisation NFkB, la régulation négative de l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire. Il est intéressant de noter que les profils d'expression génique en réponse à l'hypoxie étaient analogues à ceux des biopsies de LF, contrairement aux cultures 2D, ce qui suggère que les cultures 3D sont plus proches des conditions in situ dans ce type de modèle. Ces agrégats de LF étaient également associés à une résistance à la doxorubicine et la bendamustine. Tous ces résultats ont mis en évidence l'importance de l'organisation spatiale et des interactions cellulaires en culture 3D dans la biologie des LFs. Les essais en gouttes suspendues nécessitent cependant un travail intensif et une culture à long terme, et ces cultures ne sont pas stables, en raison de l'évaporation. De plus, elles ne contiennent aucune cellule du TME ce qui en limite l'intérêt.

De la même manière, une étude a montré que les cellules lymphomateuses proliféraient mieux en 3D qu'en 2D <sup>395</sup> et une autre étude a montré que la culture en 3D influençait considérablement l'action des anti-CD20 <sup>396</sup>. Cependant, dans ces modèles, l'influence du

microenvironnement n'est pas prise en considération. Foxall et al montrent un dialogue induit en 3D entre les cellules DLBCL et des cellules stromales issues de tissu adipeux, par l'induction de podoplanine et de BAFF suite à la production de TNF par les cellules DLBCL en 3D<sup>397</sup>. Ce modèle constitue le premier exemple d'étude en 3D de l'interaction B/stroma dans un lymphome B mais n'a pas été testé dans le LF. Certaines études ont rajouté des macrophages à la composante stromale du microenvironnement dans les cultures 3D validant l'utilisation de drogues tels que des inhibiteurs de CSF-R1<sup>392</sup>, les anti-BCL2 et les anti-CD20<sup>397</sup> (ces derniers constituant des molécules de grande taille et ayant pourtant une diffusion limitée dans le modèle MALC ).

Des modèles 3D ont également tenté de représenter les interactions de la niche de la MO, montrant une mise en jeu de molécules d'adhésion comme la N-Cadhérine et moins bonne réponse aux drogues en 3D <sup>398,399</sup>.

Outre les modèles 3D in vitro, l'établissement de modèles murins de LF reste le meilleur outil pour étudier la coévolution cinétique et spatiale des cellules tumorales avec leur microenvironnement de soutien. La translocation t(14;18) associée à la surexpression de BCL2, n'est pas suffisante pour la lymphomagénèse du LF puisqu'une faible proportion de cellules B t(14;18)pos peut être détectée dans le sang périphérique de la plupart des individus sains. Les souris transgéniques Eµ-BCL2, dans lesquelles Bcl2 est sous le contrôle du facteur de transcription des gènes d'immunoglobuline, développent simplement une hyperplasie folliculaire et non un LF, probablement en raison de la faible expression de Bcl2, du manque de spécificité des cellules B matures (le promoteur Eµ drivant plus spécifiquement l'expression des immunoglobulines durant la différentiation B, contrairement à l'enhancer 3'RR) et de l'absence d'anomalies génétiques supplémentaires. A l'inverse, le modèle vavP-BCL2 a été rapporté comme produisant un LF chez la souris sur 12 mois, et a permis de montrer que des altérations supplémentaires fréquentes chez les patients atteints de LF pouvaient accélérer la lymphomagenèse <sup>400–402</sup>. Cependant, dans ce modèle, *Bcl2* est surexprimé dans toutes les cellules hématopoïétiques, y compris les cellules T du microenvironnement. Globalement, il n'existe pas de modèle de lymphome reproduisant totalement les principales caractéristiques du LF. Néanmoins, les données récentes montrent que la suppression du récepteur inhibiteur HVEM chez les souris transgéniques vavP-BCL2 accélère le développement du LF en association avec une activation des cellules TFH et stromales <sup>332</sup> suggérant un modèle se rapprochant de la biologie du LF. Il a été démontré que les mutations de gain de fonction d'EZH2 survenant tôt au cours de la lymphomagénèse limitent la dépendance au compartiment TFH, tout en maintenant une interaction étroite avec le compartiment FDC 403. De même, des mutations ponctuelles de l'activateur de mTORC1 *Rragc* sont associées à une diminution de l'abondance des cellules TFH à la fois chez les souris VavP-Bcl2 ; RagCmut et chez les patients atteints de LF portant des mutations RRAGC <sup>297</sup> . Enfin, les altérations génétiques du gène de la cathepsine S (*Ctss*), qui entraînent une hyperactivité aberrante de cette protéase et une augmentation de la présentation des antigènes par le CMH de classe II, déclenchent et accélèrent le développement de lymphocytes T CD4pos alors que les lymphocytes T CD8pos sont réduits et exclus du CG <sup>298,300</sup>. Dans l'ensemble, ces données démontrent que la génétique tumorale a un impact considérable sur la reprogrammation du TME dans le LF. Ces modèles restent cependant imparfaits et limités pour de multiples raisons: ils reposent souvent sur des chimères hématopoiétiques, procédé très lourd créant des animaux tous différents ; générant des tumeurs très oligoclonales en lien sans doute avec la survenue de l'anomalie driver sur tous ou une grande proportion des lymphocytes B et la dérégulation de Bcl2 dans tout le compartiment hématopoïétique rend difficile l'interprétation des phénotypes tumoraux.

Les modèles de xénogreffe de souris impliquent la transplantation de cellules de lymphome humain (soit dérivées de patients, PDX, soit de lignées cellulaires, CDX), dans des souris immunodéficientes, pour favoriser la prise de greffe de la tumeur <sup>404</sup>. Les modèles CDX générés par l'injection de SUDHL-4 sont utiles pour des tests de drogues, mais les lignées cellulaires contiennent des mutations natives qui peuvent ne pas être observées dans le lymphome folliculaire <sup>405-409</sup>. Les PDX, d'autre part, conservent les caractéristiques du lymphome primaire, y compris du TME et de la signature génétique. Cela permet de tester rigoureusement des traitements médicamenteux et des schémas thérapeutiques pour les lymphomes. Malheureusement, les taux de prise de greffe pour le LF sont très faibles et il existe une limite dans les possibilités d'étudier les interactions immunitaires <sup>404,407,410,411</sup>. Cette limitation peut être surmontée par des greffes en série, cependant, cela conduit à la perte progressive des caractéristiques de la tumeur primaire.

# 3. Concept d'hétérogénéité tissulaire dans le lymphome folliculaire

# a) Introduction au concept d'hétérogénéité tissulaire

Le terme d'hétérogénéité concerne aussi bien les cellules tumorales que le microenvironnement. En effet, sur le plan cellulaire, le LF ne doit pas être considéré comme un simple agglomérat de cellules tumorales, mais plutôt comme une entité morpho-fonctionnelle complexe évoluant dans différents compartiments, qui représentent ce que l'on appelle l'hétérogénéité intra-tumorale. La plupart des patients atteints de LF présentent une tumeur disséminée dans de multiples ganglions lymphatiques (constituant eux-mêmes des niches extrêmement hétérogènes) et dans la moelle osseuse, il apparait d'un intérêt majeur de considérer l'étendue et l'impact de l'hétérogénéité spatiale des niches sur l'évolution clinique du patient, pour guider au mieux les choix thérapeutiques. Avec cette idée, il a été suggéré que les tumeurs solides pourraient être caractérisées par l'évolution clonale au cours du temps et par ses interactions avec les ressources disponibles du microenvironnement <sup>412</sup>.

Par des interactions directes et indirectes, le microenvironnement va induire une plasticité phénotypique et fonctionnelle des cellules tumorales au niveau morphologique, protéique et transcriptionnel. L'hétérogénéité spatiale est un niveau d'hétérogénéité sous-estimé. En effet comme évoqué précédemment les ganglions sont très hétérogènes en fonction de leur localisation spatiale et présentent d'autre part une hétérogénéité anatomique intrinsèque. La MO dans le LF présente de manière ectopique certaines caractéristiques communes avec les tissus lymphoïdes et nous n'avons aucune idée de la manière dont le TME soutient spécifiquement les cellules tumorales, caractérisées par un grade cytologique inférieur, une prolifération réduite, un phénotype modifié avec une expression réduite du CD10 et un profil d'expression génétique inconnu<sup>294,413,414</sup>. Notre équipe a récemment démontré que les cellules B du LF produisent des vésicules extracellulaires qui peuvent être internalisées par les cellules stromales de la MO, ce qui les rend plus efficaces pour soutenir la survie et la quiescence des cellules B de LF<sup>415</sup>. Cette étude suggère des schémas d'interactions moléculaires localement spécifiques avec les cellules B malignes, contribuant à l'hétérogénéité spatiale de la tumeur.

L'hétérogénéité peut également se manifester au cours de l'évolution tumorale. De nombreuses études ont décrit l'hétérogénéité tumorale chez les individus au moment du diagnostic et de la transformation pour étudier les sous-clones sujets à la transformation.

Le microenvironnement joue un rôle crucial dans le pronostic de la maladie du LF. Le Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium a confirmé que le microenvironnement aurait une influence significative sur le pronostic, et que des pourcentages plus faibles de cellules T CD8+, la présence de macrophages M2 CD163+, le statut de type sauvage EZH2 et de gain du chromosome 18 dans la tumeur initiale étaient des prédicteurs de mauvais pronostic<sup>362</sup>. Cependant, l'introduction du rituximab inverse ce phénomène, et une forte densité en macrophages associés à la tumeur est corrélée à des taux de survie plus longs après R-CHOP<sup>360</sup>. Ces résultats soulignent l'implication des altérations génétiques des cellules B tumorales et de la composition du microenvironnement mais sans considérer son hétérogénéité spatiale et son organisation relative au sein de chaque niche tumorale, expliquant les nombreuses études contradictoires jusqu'alors menées sur les acteurs pronostiques du microenvironnement. De plus, notre compréhension du degré d'hétérogénéité spatiale ou intra-tumorale chez les patients est considérablement limitée par l'avènement des prélèvements micro biopsiques qui prennent souvent le pas sur l'exérèse des ganglions lymphatiques pour le diagnostic.

Concernant le microenvironnement, il conviendra de distinguer l'hétérogénéité du microenvironnement physiologique intrinsèque du ganglion lymphatique et de la moelle osseuse et l'hétérogénéité façonnée par l'hétérogénéité des cellules B de la tumeur elle-même, ce qui sous-tend un autre degré de complexité s'inscrivant également dans le temps avec l'évolution clinique et les traitements. De plus, les altérations génétiques moléculaires et le microenvironnement s'influencent probablement mutuellement : les altérations génétiques sont permissives pour la croissance des cellules cancéreuses, mais le microenvironnement peut favoriser le développement de sous-clones spécifiques par rapport à d'autres et le microenvironnement peut également évoluer dans le temps et avec la thérapie. Une question rémanente est d'identifier les sous-niches favorisant la localisation des CPCs.

Dans cette revue, nous décrivons l'hétérogénéité spatiale stromale et l'organisation dans les deux principales niches du LF, nous tenterons de définir l'hétérogénéité des cellules B tumorales et de comprendre dans quelle mesure l'étude de cette hétérogénéité tumorale reliée à celle de son microenvironnement, et notamment le microenvironnement stromal, est pertinente pour prédire la rechute, la transformation et/ou influencer le succès thérapeutique.

b) Comment relier l'hétérogénéité tumorale à celle de son microenvironnement ?

				Check for updates
D 1 464 10004		A 1 40 M 0004		
Received: 16 April 2021	Revised: 9 May 2021	Accepted: 10 May 2021		
DOI: 10.1111/imr.12983				
INVITED REVI	EW		Immunological Reviews 🕠	<b>ILEY</b>

# B cell/stromal cell crosstalk in health, disease, and treatment: Follicular lymphoma as a paradigm

Claire Lamaison MD<sup>1</sup> | Karin Tarte Pharm D, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UMR\_S 1236, Université Rennes 1, INSERM, Etablissement Français du Sang, Rennes, France <sup>2</sup>SITI, Pôle de Biologie, CHU Pontchaillou, Rennes, France

INVITED REVIEW THEMED ISSUE

#### Correspondence

Karin Tarte, INSERM UMR U126, Faculté de médecine, 2 avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France. Email: karin.tarte@univ-rennes1.fr

## Funding information

FHU CAMIn; Région Bretagne; Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, Grant/Award Number: PGA1 RF20170205386; Institut National du cancer, Grant/Award Number: INCA AAP PNP-19-009; LLS, Grant/Award Number: TRP 6593-20

### Abstract

Stromal cells organize specific anatomic compartments within bone marrow (BM) and secondary lymphoid organs where they finely regulate the behavior of mature normal B cells. In particular, lymphoid stromal cells (LSCs) form a phenotypically heterogeneous compartment including various cell subsets variably supporting B-cell survival. activation, proliferation, and differentiation. In turn, activated B cells trigger in-depth remodeling of LSC networks within lymph nodes (LN) and BM. Follicular lymphoma (FL) is one of the best paradigms of a B-cell neoplasia depending on a specific tumor microenvironment (TME), including cancer-associated fibroblasts (CAFs) emerging from the reprogramming of LN LSCs or poorly characterized local BM precursors. FL-CAFs support directly malignant B-cell growth and orchestrate FL permissive cell niche by contributing, through a bidirectional crosstalk, to the recruitment and polarization of immune TME subsets. Recent studies have highlighted a previously unexpected level of heterogeneity of both FL B cells and FL TME, underlined by FL-CAF plasticity. A better understanding of the signaling pathways, molecular mechanisms, and kinetic of stromal cell remodeling in FL would be useful to delineate new predictive markers and new therapeutic approaches in this still fatal malignancy.

## KEYWORDS

cancer-associated fibroblasts, cell plasticity, fibroblastic reticular cells, follicular dendritic cells, lymphoma, tumor microenvironment

# 1 | INTRODUCTION

B cells initially differentiate within the bone marrow (BM), before reaching the periphery as BCR-expressing immature B cells, able to gain secondary lymphoid organs (SLO). Recognition of their cognate antigen drives then naive B-cell activation, proliferation, selection, and differentiation into memory B cells and plasma cells, ultimately homing to the BM as long-lived antibody-producing cells. All stages of B-cell life rely on strong interactions with specific subsets of stromal cells, organized as discrete microanatomic areas controlling Bcell fate through direct B-cell supportive functions and through the

This article is part of a series of reviews covering Immunological functions of fibroblasts in human health and disease appearing in Volume 302 of *Immunological Reviews*.

© 2021 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

the differentiation and functional plasticity of B-cell-interacting stromal cells are influenced by their contact with B cells. In agreement, the development of B-cell malignancies profoundly affects the B-cell/stromal cell bidirectional crosstalk, leading to a coevolution of both partners and resulting in malignant B-cell growth.

recruitment and polarization of other immune cell subsets. In turn,

Follicular lymphoma (FL) is the most frequent indolent lymphoma<sup>1</sup> and is one of the best paradigms of a B-cell malignancy strongly dependent on a permissive tumor microenvironment (TME) including FL cancer-associated fibroblasts (FL-CAFs).<sup>2-4</sup> FL results from the clonal expansion of germinal center (GC) B cells, even if malignant transformation is initiated during early B-cell development in the BM, by aberrant repair failure of V(D)J recombination. The resulting t(14;18)

Immunological Reviews. 2021;302:273–285.

wilevonlinelibrary.com/journal/imr 273

# WILEY- Immunological Reviews

translocation promotes high expression of the anti-apoptotic protein BCL2, providing survival advantage to B cells during GC reaction.<sup>5</sup> a place where BCL2 is normally actively repressed by the GC-specific transcriptional machinery. Indeed, up to 50% of GC B cells undergo apoptosis every 6 hours unless they are positively selected.<sup>6</sup> B cells carrying t(14:18) translocation recirculate as atypical memory B cells considered as FL precursors and detected in the peripheral blood of most healthy individuals.<sup>7,8</sup> These pre-FL cells are enriched as nonproliferating GC B cells in hyperplastic lymph nodes (LN), thus mimicking the low proliferation rate of FL B cells.<sup>9</sup> Transformation into overt FL is a very rare event, associated with the accumulation of numerous secondary genetic hits following a complex evolutionary dynamics from premalignant stage to FL diagnosis and progression.<sup>10,11</sup> The current view of FL pathogenesis is based on the concept of long-lived cancer precursor cells (CPCs) exhibiting driver genetic alterations and that follow divergent intraclonal evolution, creating a landscape of genetically distinct subclones.<sup>8,12,13</sup> CPCs are responsible for late relapses or transformation into aggressive lymphoma.<sup>14</sup> Importantly, FL is a disseminated disease, characterized by a frequent BM involvement,  $^{15,16}$  a property shared with t(14;18)  $^{\rm pos}$  pre-FL cells. How the spatial and functional heterogeneity of stromal cell niches modulates FL B-cell survival, growth, subclonal evolution, and drug resistance remains essentially unknown. Moreover, the signaling pathways, molecular mechanisms, and kinetics of stromal cell reprogramming in FL have been poorly defined. Finally, a better understanding of FL B-cell/ FL-CAF interplay would be useful to delineate new predictive markers and new therapeutic approaches in this still fatal malignancy.

# 2 | FUNCTIONAL HETEROGENEITY OF THE STROMAL CELL NICHES OF NORMAL MATURE B CELLS

BM constitutes the primary site for the maintenance and differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs) and for B-cell lymphopoiesis. It has long been assumed that different stromal cell niches dynamically control these processes. Seminal papers have recently proposed a molecular atlas of the BM stromal cells at the single-cell resolution, providing clues on how various stromal cell subtypes could interact with HSCs and differentiating B-cell subsets by producing soluble factors, such as CXCL12 and IL-7, and signals involved in cell adhesion and retention, such as VCAM-1 or Nidogen-1.  $^{18,19}$ In addition, differentiation trajectories within these newly identified stromal cell subtypes were inferred from single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data and were shown to be affected in case of acute myeloid leukemia.20 Finally, a combination of scRNA-seq and spatial transcriptomics was used to define a spatial map of BM niches. confirming the existence of perisinusoidal and periarteriolar niches orchestrating different aspects of hematopoiesis and B-cell differentiation.<sup>21</sup> An endosteal niche including osteoblasts and lining Podoplanin/gp38<sup>pos</sup> fibroblasts was also identified.

Besides its key hematopoietic function, the BM is a functional reservoir for mature immune cells.<sup>22</sup> Long-lived plasma cells are the

#### LAMAISON AND TARTE

best-characterized mature lymphocyte subset residing in the BM, localizing close to CXCL12-producing stromal cells. However, BM contains also significant numbers of resident memory B cells, which can rapidly differentiate into plasma cells locally upon stimulation.<sup>23</sup> Interestingly, reactive GC, including mature follicular dendritic cells (FDCs) and follicular helper T cells (Tfh), can be rarely found within BM, in the context of autoimmune diseases, infections, or malignancies, and exhibit a non-paratrabecular localization. The precursors and differentiation pathways of these ectopic BM FDCs are unknown. Moreover, how differentiating and mature B cells contribute to the plasticity of BM stromal cells has never been explored.

Within SLO, lymphoid stromal cells (LSCs) pattern discrete anatomical niches and orchestrate adaptive immune response by supporting lymphocyte recruitment, survival, activation, and differentiation.<sup>25,26</sup> Mature LSCs are phenotypically defined by their expression of gp38, in the absence of hematopoietic, epithelial, and endothelial markers.<sup>27</sup> In mouse adult SLO, perivascular cells have been proposed as the local precursors of LSCs even if competing views exist concerning their specific origin, including gp38<sup>neg</sup> mural cells and gp38<sup>pos</sup>CD34<sup>pos</sup> adventitial cells.<sup>28-30</sup> Historically, the two best-defined LSC subsets are CD21/CD35<sup>pos</sup> FDCs, populating the light zone (LZ) of the GC and regulating guidance and selection of high-affinity B cells, and CD21<sup>neg</sup> fibroblastic reticular cells (FRCs), residing outside the follicles and supporting antigen delivery, naive lymphocyte and mature dendritic cell recruitment, and T-cell survival and activation.<sup>31</sup> However, new strategies of cell-fate mapping, high-resolution imaging, and scRNA-seq have recently revealed a higher level of diversity in LSCs, reflecting their various functions and anatomical location.32,33

In particular, the genetic targeting of CXCL13-expressing cells has been used to characterize B-cell-interacting reticular cell (BRC)  $\mathsf{subsets.}^{33}$  Two subsets of FDCs could be highlighted, sitting in GC LZ and dark zone (DZ), respectively. Classical LZ FDCs are known to recruit and sequester CXCR5-expressing GC B cells and Tfh through the production of high amounts of CXCL13 and to retain intact antigens for extended period of times by continuous recycling.<sup>34</sup> LZ GC B cells, called centrocytes, compete with each other for the capture of antigens from LZ FDCs through a specific immune synapse architecture allowing stringent affinity discrimination.<sup>35</sup> Antigenic peptides could then be presented by high-affinity centrocytes to cognate Tfh that in turn trigger GC B-cell recycling to the DZ for further rounds of proliferation/somatic hypermutations. GC B cells ultimately differentiate into memory B cells and plasma cells, exiting the GC with a different kinetic of preferential output. Besides BCR activation. which is a primary determinant of GC B-cell fate, LZ FDCs have been suggested to contribute to GC B-cell survival through a combination of membrane and soluble factors including VCAM-1, Notch ligands, BAFF/TNFRSF13B, IL-15, Wnt5a, or Shh,<sup>36-41</sup> but the precise roles of these molecules remain unknown, LZ FDCs also regulate apoptotic B-cell clearance through the production of MFGE8, promoting GC B-cell phagocytosis by tingible body macrophages.<sup>42</sup> Conversely, DZ FDCs are characterized by their low expression of CD21/CD35 and their high production of CXCL12. CXCL12 is involved in the

localization of CXCR4<sup>hi</sup> proliferating centroblasts into the DZ and plays a determinant role in the efficacy of the GC response by orchestrating BRC topology and resulting B-Tfh crosstalk.  $^{26,43,44}\ \text{Of}$ note, the glycosaminoglycan-binding property of CXCL12 is critical for the correct GC organization, likely reflecting local retention of CXCL12 by DZ FDCs.43 DZ and LZ FDCs share similar morphology and expression of the transcription factor SOX9, <sup>32</sup> suggesting a common origin, but subset specification of LZ and DZ FDCs was found to be predetermined in the steady state.<sup>33</sup> Besides FDCs, BRCs also comprise marginal reticular cells (MRCs), interfollicular reticular cells (IFRCs), T-B border reticular cells (TBRCs), and medullary reticular cells (MedRCs), all located outside the GC. MRCs, primarily sitting at the edge of the follicle, lining the subcapsular sinus, capture and transfer immune complexes to B cells.<sup>45</sup> Of note, they have also been proposed as precursors of FDCs during inflammation-induced LN remodeling.46 TBRCs express both CXCL13 and CCL19/CCL21 and support naive B-cell survival by producing high amounts of BAFF.47 In agreement, ablation of CCL19-expressing cells in vivo reduces substantially B-cell viability within LN, whereas FDC loss has a minor impact on B-cell homeostasis.47,48 Some TBRCs producing APRIL, IL-6, and CXCL12 were also shown to support plasmablast exit from the GC and differentiation into plasma cells.49 IFRCs are transcriptionally close to TBRCs and express high amounts of the cholesterol-25-hydroxylase (Ch25h), a crucial enzyme in the production of 7 $\alpha$ ,25-hydroxycholesterol,  $^{32}$  the ligand of the EBI2 receptor guiding activated B cells and T cells and favoring their interaction at the T-B border and interfollicular areas.<sup>50</sup> Finally, MedRCs form a dense meshwork throughout medullary cords, express high amounts of leptin receptor, and guide plasma cell migration and survival by producing BAFF, IL-6, CXCL12, and APRIL together with an intermediate level of CXCL13.51 Apart from BRC subsets, the last wellcharacterized LSC population is that of T-cell zone reticular cells (TRCs) producing high amounts of CCL19/CCL21. Importantly, even if they were initially identified for their crucial role on T-cell behavior, TRCs promote the recruitment of naive CCR7<sup>pos</sup> B cells and ensure their guided trafficking from the paracortex to B-cell follicles. Altogether, B cells are engaged in a sequential crosstalk with virtually all LSC subsets that differentially regulate each step of their activation and differentiation within SLO. However, this detailed characterization of LSC heterogeneity has been performed in mice and very few data are available on human LSC diversity, plasticity, and function. Very recently, we proposed that CD49a/Integrin  $\alpha \textbf{1}$ could be used to sort human immune cell-interacting gp38  $^{\rm pos}$  FRCs and gp38<sup>neg</sup> perivascular cells displaying features of LSC precursors, allowing further molecular and functional studies.<sup>52</sup> Such approach could be useful to analyze LSC remodeling during inflammation and cancer

Importantly, B cells have also a huge impact on LSC dynamics in response to inflammatory stimuli. Within GC, the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and lymphotoxin  $\alpha1\beta2$  (LT) by B cells is required for FDC maturation and maintenance and is dependent on stimulation by FDC-derived CXCL13.<sup>53,54</sup> B cells are crucial not only for FDC organization. In particular, B cell-derived

# Immunological Reviews -WILEY 275

LT, upregulated in response to IL-4 stimulation, is involved in the proliferation and robust transcriptional remodeling of FRCs in response to viral infection 55,56 and in the stretching and maturation of TBRCs into CXCL13-expressing stromal cells in response to the early swelling of GC within follicles.<sup>57</sup> Conversely to FRCs, modest changes have been described in the FDC transcriptional program in response to infection.  $^{\rm 33}$  Importantly, other cell partners have a strong impact on TRC proliferation and differentiation. CLEC-2 expressed by migratory dendritic cells interacts with gp38 on the surface of TRCs and promotes the relaxation of their actomyosin cytoskeleton.58 TRCs then stretch and elongate, the reticular network relaxes, and LN swell to accommodate the rapid increase in lymphocyte number following immune response initiation.<sup>58,59</sup> TRC relaxation is later followed by TRC proliferation.<sup>59</sup> LT deficiency in B cells or dendritic cells results in a premature contraction of the FRC network. Additionally, IL-17 produced by locally differentiating Th17 cells triggers metabolic reprogramming of TRCs required to support their proliferation and survival.<sup>60</sup> In addition, IL-17 drives the differentiation of IL17Rc<sup>pos</sup> pulmonary stromal cells from bronchus-associated lymphoid tissues into gp38<sup>pos</sup>CD21/35<sup>neg</sup>CX-CL12pos follicular stromal cells allowing GC formation in the absence of both FDC and LT<sup>pos</sup> B cells.<sup>61</sup> B cells are thus engaged in a bidirectional crosstalk with both FRCs and FDCs and cooperate with other cell partners to trigger their differentiation and activation during physiological immune response, in particular through the production of LT.

# 3 | GENERAL ORGANIZATION OF FL STROMAL CELL NICHES

FL B cells exhibit the general hallmark of centrocytes and accumulate primarily within LN follicles whereas BM infiltration, found in 40%-70% of FL patients at diagnosis, is an important adverse factor in FL clinical risk-stratification scores.<sup>15,62,63</sup> Macroscopically, FL LN retain well-defined follicles, where FDCs and Tfh are found admixed with malignant B cells without DZ/LZ organization, and a surrounding extrafollicular zone, exhibiting a dense network of FRCs and CD8 T cells. However, whereas LN expansion is rapid but transient during normal immune response, remaining confined by the capsule limit, FL LN are chronically enlarged, with frequent capsule disruption and invasion of the adipose perinodal tissue by ectopic GC-like structures (Figure 1A-D). Moreover, FL LN are uniformly invaded by tumor follicles in the cortex, paracortex, and medullary areas. Importantly, a huge intra-tissular heterogeneity could be found both within and outside follicles, including for the density, phenotype, and organization of FDC and FRC networks (Figure 1E-G). How the specific anatomic and phenotypic properties of stromal cells impact their reprogramming during FL lymphomagenesis and support malignant B cells with specific subclonal and/or transcriptomic features has not been explored.

Invaded FL BM do not exhibit a diffuse infiltration by tumor cells that are found as nodular aggregates including mature LSCs



FIGURE 1 Human stromal niche organization within FL lymph nodes. A) Normal reactive lymph node with an intact capsule (yellow dotted line) and a well-delimited medullary zone (white dotted line). FRCs are stained by anti-collagen IV antibody (COLLIV, yellow) and FDCs by anti-CD21 antibody (CD21, red). Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 5mm. B) FL lymph node with capsule disruption (yellow arrows) and invasion of the medulla (white arrows) by malignant follicles. FRCs are stained by anti-collagen IV antibody (COLLIV, yellow) and FDCs by anti-CD21 antibody (CD21, red). Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 5mm. B) FL lymph node with capsule (COLLIV, yellow) and FDCs by anti-CD21 antibody (CD21, red). Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 5mm. C-D) FL lymph node with perinodal follicular expansion in surrounding adipose tissue. FRCs are stained by anti-collagen IV antibody (COLIV, green) and FDCs by anti-CD21 antibody (CD21, yellow). (C) Scale bar, 5mm; (D) Scale bar, 1mm. White arrow highlights a perinodal follicie. Capsule is indicated by yellow dotted line. E-F-G) FDC heterogeneity in FL. FRCs are stained with an anti-collagen IV antibody (COLIV, yellow) and FDCs by an anti-CD21 antibody (CD21, green). (E) Intact FDC network; (F) variably disrupted FDC network; (G) lack of FDC network

and PD-1<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup> T cells. Conversely to reactive GC, malignant follicles essentially display paratrabecular localization (Figure 2). LN FL-FDCs progressively loose expression of CD21, CD23, and CD35, a process associated with the strongly reduced expression of LT by malignant FL B cells compared with normal GC B cells.<sup>64,65</sup> Conversely, mature FDCs expressing CD21 and producing CXCL13 could be ectopically detected in the center of BM FL B-cell aggregates, distant from the bone.<sup>66</sup> FRC-like cells are also identified within these BM follicle-like structures. These data suggest that ectopic localization of FL B cells within BM requires FDCs, whereas FL LN B cells lose their dependency toward LZ FDCs and/or become dependent on functionally different LSC subsets. Besides sharing lymphoid-like properties, BM and LN FL stromal cells display common extracellular matrix composition features including upregulation of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), a matricellular protein involved in collagen deposition and

FIGURE 2 Human stromal niche organization within FL bone marrow. A) Invaded FL bone marrow showing FRC-like cells stained with antitransglutaminase antibody (green), FDClike cells with anti-CD21 antibody (red), and FL B cells with anti-CD20 antibody (blue). Dotted lines indicate the bone. Box indicates the area magnified in lower panel. Scale bars, 100 µm. B) Invaded FL bone marrow showing FRC-like cells stained with anti-transglutaminase antibody (green), FDC-like cells with anti-CXCL13 antibody (red), and FL B cells with anti-CD20 antibody (blue). Dotted point line indicates the bone. Scale bar, 100 µm



organization.<sup>67</sup> However, gene expression profile analysis has underlined key differences in the phenotype of FL-CAFs within BM and LN niches.<sup>68</sup> In agreement, BM FL B cells are also characterized by a lower cytological grade, a decreased proliferation, a modified phenotype with reduced CD10 expression, and an altered gene expression profile compared with LN FL B cells.<sup>68,69</sup> Moreover, somatic hypermutation analysis and targeted deep sequencing have demonstrated that different FL B-cell subclones could be detected within LN versus BM, and suggest that FL originates in the LN and infiltrates BM early in the course of the disease, allowing further accumulation of BM-specific mutations.<sup>69-71</sup> Yet, no study has been designed to specifically interrogate the consequences of the differences in FL-CAF phenotype in LN versus BM on FL B-cell genetic heterogeneity.

# 4 | FUNCTIONAL HETEROGENEITY OF FL STROMAL CELL NICHES

CAFs exert key protumoral functions including direct impact on tumor cell survival, proliferation, and dissemination and indirect effects on tumor organization and anti-tumor immunity, altogether promoting tumor growth and drug resistance. FL-CAFs have been initially characterized at the functional and transcriptomic levels after short-term in vitro expansion. Even if such approach could be associated with culture-related artifacts and with a loss of stromal cell heterogeneity, it is interesting to notice that culture-adapted human mesenchymal stromal cells obtained from BM (BM-MSC) and adipose tissue (ASC) retain the main transcriptomic and functional differential features of their native counterparts, demonstrating an imprinting of the tissue origin on stromal cell properties.<sup>72</sup> In agreement, several deregulated pathways have been identified in in vitro-expanded FL-CAFs and further confirmed in situ in both BM and LN FL tissues (Figure 3). In particular, FL-CAFs were proposed as main organizers of FL cell niche. First, FL-CAFs overexpress CCL2, detected at high levels in FL BM plasma, and recruit monocytes, further converted into proangiogenic and anti-inflammatory macrophages, at least in part through Notch-dependent signaling.73 Interestingly, FL tumorassociated macrophages (FL-TAMs) have been shown to trigger FL B-cell activation and survival through the transpresentation of IL-15, able to activate STAT5 in B cells and to collaborate with Tfhderived CD40L signaling.74 Conversely to normal B cells, FL BCR harbor in more than 80% of cases unusual N-glycosylation sites occupied by immature oligomannose residues.<sup>75</sup> This modification is an early event in FL pathogenesis and is retained across relapse and transformation events.<sup>76</sup> The lectin DC-SIGN specifically recognizes FL N-glycosylated BCR and triggers its delayed but longlasting aggregation and activation.<sup>77</sup> DC-SIGN is inducible by IL-4, a cytokine overexpressed by FL-Tfh, and is thus overexpressed on FL-infiltrating myeloid cells.78 IL-4 also increases IgM expression on FL B cells thus further favoring BCR/DC-SIGN crosstalk. Strikingly, FL-LSCs contribute to the polarization of FL-Tfh by favoring the early commitment of PD1<sup>dim</sup>CXCR5<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup> cells, corresponding to pre-Tfh cells, into IL-4<sup>hi</sup> producers, in a Notch and ICAM1/LFA1-dependent manner.79 Altogether, these data highlight FL-CAFs as central coordinators of the FL-Tfh/FL-TAM/B-cell tripartite crosstalk. Besides CCL2, FL-CAFs also overexpress IL-8, thus favoring the recruitment and survival of protumoral neutrophils.<sup>80</sup> Whereas PGE2 has been proposed as upregulated in



interactions within FL cell niches. FL cancer-associated fibroblasts (FL-CAF) form a heterogeneous compartment overexpressing factors involved in direct FL B-cell activation and in the recruitment and activation of other components of tumor supportive cell niche such as tumor associated macrophages (TAM) and T follicular helper (Tfh). In FL bone marrow, FL B cell-derived extracellular vesicles (EVs) contribute to the early commitment of BM mesenchymal stromal cells (BM MSC) toward FL permissive stromal niche ultimately including mature lymphoid stromal cells and CD4pos T cells admixed with malignant B cells within nodular

 $\mathsf{FL}\text{-}\mathsf{CAFs}^{\texttt{81}}$  and despite the accumulating evidence showing a role for CAFs in immune escape and resistance to immunotherapy in solid cancers,82 no data are currently available on their immunosuppressive activity in FL.

More recently, in situ analysis of FL-CAFs has highlighted a strong upregulation of CXCL12 expression in FL-FDCs, FL-FRCs, and FL BM stromal cells with a parallel increase in CXCL12 level in FL BM plasma.<sup>66</sup> Moreover, heparanase, an endoglycosidase increasing the bioavailability of heparin-binding factors like CXCL12, is strongly expressed in about 50% of FL.<sup>83</sup> CXCL12 triggers FL Bcell activation, migration, and adhesion. Within FL follicles, this upregulation of CXCL12 parallels the disappearance of CD21<sup>pos</sup> FDCs. The lack of specific marker for DZ FDCs precludes any definitive conclusion on whether this remodeling of malignant follicles actually corresponds to an expansion of the DZ EDC network. However, unlike LZ FDCs and TBRCs, DZ FDCs were proposed to not require LT and TNF for the maintenance of CXCL12 expression and network morphology,44 thus providing an argument in favor of a DZ FDC origin for CXCL12<sup>hi</sup> follicular stromal cells supporting LT<sup>Io</sup> FL B cells. In order to further delineate the properties of FL-CAFs in situ, we recently analyzed the gene expression profile of sorted gp38<sup>pos</sup>CD21<sup>pos</sup> FDCs, gp38<sup>pos</sup>CD49a<sup>pos</sup>CD21<sup>neg</sup> LSCs, including FRCs and DZ FDC-like cells, and their putative gp-38posCD49aneg local LSC precursors in FL LN and reactive SLO.52 Interactome analysis demonstrated that FL B cells had a higher capacity to interact with CD21<sup>neg</sup> LSCs than with CD21<sup>pos</sup> FDCs, providing a molecular support for the disruption of LZ FDC network within FL follicles. Moreover, we confirmed the deregulation of CXCL12 and highlighted an overexpression of CCL19/CCL21 by FL-CAFs. Interestingly, FL-LSC precursors already displayed a

specific gene expression profile, suggesting an early commitment toward tumor supportive phenotype. A more detailed study of the heterogeneity of FL-CAF precursors remains to be performed, taking into account the spatial specificities of FL niches. In fact, besides MRCs and perivascular cells, preadipocytic cells, already shown to migrate into newborn LN and differentiate into a variety of LSCs,<sup>84</sup> are an interesting putative precursor of FL-CAFs supporting the formation of the perinodal FL follicles found in the surrounding fat. Moreover, the question of the local precursors of BM FL-CAFs and whether endosteal, perisinusoidal, and/or periarteriolar stromal cells could be involved remain completely open.

Interestingly, FL B cells express higher levels of CCR7 and CXCR4 than normal CC.<sup>52</sup> Together with their reduced expression of the GC-confinement receptors S1PR2 and P2RY8, and their increased expression of the S1PR1 egress receptor,52 these data suggest that FL B cells are prone to interact with FL-LSCs both within and outside follicles, thus contributing to their disseminated profile. An important unsolved question remains the direct and indirect impacts of the modifications of extracellular matrix composition, organization, and stiffness, which are largely dependent on stromal cells, on FL growth. Recently, relevant 3D in vitro models have suggested that mechanical forces resulting from compressive stress and cell contractility, two processes finely regulated by FRCs, may influence integrin and BCR signaling in GC B-cell lymphomas, with functional consequences on cell proliferation and drug resistance.85

Of note, new strategies of scRNA-seq combined with spatial transcriptomic/multiparametric imaging will make it possible to better define FL-CAF precursors and differentiation trajectories and to draw a more complete picture of how each CAF subset specifically

Immunological Reviews -WILEY 279

interacts with malignant B cells and with the other components of TME, how this crosstalk is dynamically affected during the course of the disease, and how it could provide relevant stratification markers and therapeutic targets.

# 5 | FL STROMAL NICHE COMMITMENT, HETEROGENEITY, AND DYNAMICS

FL-CAFs have emerged as highly heterogeneous and plastic stromal cell subsets, raising the question of the cellular interactions, molecular mechanisms, and kinetic of their reprogramming, with a major clinical interest for understanding the primary TME alterations supporting pre-FL stage and early CPC as well as the treatment-induced TME plasticity.

Within FL LN, a first challenging issue is to understand how FL-CAFs accommodate the chronic LN enlargement associated with lymphoma growth. The proportion of dendritic cells is strongly reduced in FL<sup>86</sup> and FL-CAFs display a reduced expression of gp38,<sup>66</sup> suggesting that the CLEC-2/gp38 loop is not the main driver of the chronic FRC network expansion in FL. Moreover, FL B cells downregulate LT<sup>65</sup> and the Th17/Treg balance is specifically skewed toward Treg differentiation,<sup>87</sup> whereas FL-Tfh poorly express Th17related markers, including *IL-17*, *IL-26*, and *RORC*.<sup>87,88</sup> These data argue against a role for B cell-derived LT and T cell-derived IL-17 in FL-FRC proliferation. In agreement, FL LN are characterized by a disorganized and partly disrupted collagen-based reticular network.

Malignant B cells have been initially proposed as the main drivers of the modifications of FL stromal cell phenotype and gene expression profile. In particular, B-cell-derived TNF triggers CCL2 and IL-8 expression in LN and BM stromal cells and supports the differentiation of BM-MSCs toward FL-supportive FRC-like cells in vitro.<sup>73,80</sup> Moreover, our recent RNA profiling of FL-CAF subsets highlighted a putative role for B cell-derived TGF- $\beta$ ,<sup>52</sup> a factor already identified as upregulated within FL cell niches<sup>89</sup> where it impacts intratumoral

FIGURE 4 Main genetic alterations affecting B/CAF/Tfh crosstalk in FL. Schematic representation on the main individual recurrent B-cell intrinsic genetic alterations affecting the crosstalk between immune and stromal TME and FL (pre)malignant B cells to promote lymphomagenesis T-cell function.<sup>90,91</sup> Interestingly, TNF/LT and TGF- $\beta$  synergize to induce FL-CAF markers, including CXCL12, CCL19, and CCL21, on LN LSC precursors. Moreover, we could demonstrate a correlation between TGFB1 and CCL21 expression across large series of FL patients.<sup>52</sup>

Importantly, non-malignant cells also contribute to FL-CAF reprogramming. Whereas FL B cells are not able to upregulate CXCL12 when cocultured with stromal cells, FL-Tfh induce CXCL12 in an IL-4-dependent manner.<sup>66</sup> Accordingly, a correlation was found between CXCL12 and p-STAT6, a surrogate marker of IL-4 production, in a large series of FL LN. TNF/LT and IL-4, both overexpressed in FL-Tfh, synergize to trigger a transglutaminase higp38loVCAM-1hi CXCL12<sup>hi</sup> phenotype in stromal cell precursors and FRC-like cells in vitro, thus closely mimicking the phenotype of FL-FRCs in situ. In fact, TNF/LT upregulate STAT6 and IL4R expression in stromal cells, suggesting differentiated LSCs respond more efficiently to IL-4 compared with undifferentiated stromal cells. FL-Tfh also overexpress IFN-y,92 able to induce indoleamine-2,3 dioxygenase (IDO) in human FRC-like cells in vitro.93 By catalyzing the tryptophan metabolism, IDO inhibits CD4<sup>pos</sup> and CD8<sup>pos</sup> T-cell but also normal and malignant B-cell proliferation. It is tempting to speculate that FL tissues are organized in discrete areas where different subsets of FL-Tfh and FL stromal cells variably regulate FL B cell/FL immune microenvironment interplay.

The hypothesis that specific genetic alterations directly impact the capacity of malignant FL B cells to drive the development of specific TME patterns has emerged only recently (Figure 4). Initially, loss-of-function mutations of the H3K27/H3K18 acetyltransferase CREBBP, detected in about 50% of FL patients, were associated with a decrease in MHC class II expression resulting in reduced CD4<sup>pos</sup> and CD8<sup>pos</sup> T-cell infiltration and proliferation.<sup>94</sup> Interestingly, CREBBP alterations are considered early events potentially playing a major role in the initiation of FL tumors.<sup>95</sup> Human FL tumors are heavily mutated, with numerous subclones harboring different patterns of genetic alterations. In addition, they could essentially



# WILEY- Immunological Reviews

be analyzed once, at the diagnosis, making it difficult to infer the direct impact of each single genetic event on B-cell/TME crosstalk over the course of the disease. To fill this gap, genetically engineered mouse models have been proposed in the past few years, studying how the deregulation of a single genetic target synergizes with BCL2 overexpression to promote FL-like tumors. These models are not optimal, in particular since they are using essentially the vavP promoter to deregulate BCL2, leading to BCL2 overexpression in all hematopoietic cells, and do not mimic the rare occurrence of FL-promoting mutations. However, they have been shown useful to figure out the impact of FL recurrent mutations on GC reaction and early lymphomagenesis. Recently, gain-of-function mutations of the histone methyltransferase EZH2, occurring early during transformation in 20%-30% of FL and initially thought to display B-cell intrinsic protumoral effects,<sup>96</sup> were proposed to uncouple GC B cells from the critical Tfh checkpoint whereas switching them to FDC dependency.<sup>97</sup> EZH2-mutated GC B cells downregulate many genes linked to Tfh signaling, fail to engage Tfh, thus limiting recycling toward the DZ, and survive in the LZ as proliferating centrocytes overexpressing LT, TNF, and BAFFR, all involved in GC B-cell/FDC crosstalk. Such model seems thus to mimic well the early stages of FL initiation, and perhaps also what happens ectopically in FDC-rich invaded FL BM. However, it also gives clues on the development of overt FL since EZH2-mutated human FL feature greater association with intact FDC network as compared to unmutated FL, suggesting that early events could imprint later FL development and evolution. Whereas EZH2 mutations are proposed to directly impact FL stroma, other recurrent alterations could indirectly promote LSC reprogramming. This is in particular the case for loss-offunction mutations/deletions of TNFRSF14/HVEM that are found in about 40% of FL patients, disrupt the HVEM/BTLA inhibitory loop, and accelerate FL development in the vavP-BCL2 mouse model.  $^{98}$ HVEM/BTLA paracrine interaction is lost in most FL B cells by either HVEM mutations or BTLA transcriptional repression, favoring a cell-autonomous B cell activation by reinforcing BCR signaling in both mouse and human cells. Moreover, Tfh express huge amount of BTLA, and BTLA engagement in Tfh reduces TCR signaling and CD40L mobilization at the immunological synapse, thus diminishing Tfh help to GC B cells.<sup>99</sup> HVEM mutations thus favor B cell/Tfh crosstalk and outgrowth of premalignant B cells. Accordingly, Tfh infiltration and STAT6 phosphorylation are higher in  $\mathsf{HVEM}^{\mathsf{lo}}$  human FL tumors.98 Interestingly, FRC and FDC activation could be detected in HVEM-deficient mouse lymphomas, potentially related to the upregulation of TNF and LT expression by Tfh. Likewise, HVEM specifically decreases LT expression by human Tfh in vitro without impacting their survival or CXCL13 and IL-21 expression. Altogether, HVEM mutations strongly impact FL TME features including FL-CAF network organization. Recently, other genetic alterations were associated with FL-Tfh reprogramming. Even if the resulting stromal cell phenotype has not been studied, the major effect of Tfh on LSC activation and plasticity suggests that a comparative analysis of FL-CAF phenotype in response to different genetic backgrounds would be of great interest. Point-activating mutations in the mTORC1

#### LAMAISON AND TARTE

activator RRAGC are associated with a decrease in Tfh infiltration in both vavP-Bcl2; RagC<sup>mut</sup> mice and FL patients harboring RRAGC mutations.<sup>100</sup> Cathepsin S (CTSS) alterations detected in 20% of FL patients, upregulate MHC class II antigen presentation, and are associated with a higher CD4<sup>pos</sup> T cell infiltration whereas CD8<sup>pos</sup> T cells are excluded from the GC in mutated mice.<sup>101,102</sup> Again. FL patients with deregulated CTSS had a higher intrafollicular CD4pos T cell infiltration, supporting a stronger dependency on Tfh cell help. Interestingly, both RRAGC mutations, conferring independence from Tfh, and CTSS mutations, modulating Tfh/CD8 T cell balance, were found mutually exclusive with HVEM mutations.  $^{100,102}$  However, the net impact of harboring various combinations of EZH2, CREBBP, HVEM, RRAGC, CTSS, MLL2, and the other less characterized genetic alterations on TME modifications is unknown and very difficult to model, in particular, since numerous subclones harboring different mutational profiles coexist within each FL biopsy.<sup>103</sup>

In fact, the relationship between B-cell subclonal and transcriptional heterogeneity in FL is not completely solved. Tracking subclonal divergences through the analysis of BCR diversification reveals that B-cell subclones do not massively differ at the transcriptional levels,  $^{12,104}$  suggesting that other drivers of phenotypic diversity are stronger than genetic events. However, other studies propose either that copy number variations could represent an important layer of transcriptional heterogeneity and  $\mathsf{drug}\text{-}\mathsf{response}^{105}$  or that patients exhibiting divergent BCR evolution between 2 distant tumor sites also exhibit divergent tumor gene expression and cell surface protein  ${\rm profiles.}^{106}$  An interesting finding is that FL tumor B cells are not, at the single-cell level, frozen in a specific GC stage of differentiation and could thus not be directly compared with the different subsets of normal GC B cells recently identified.<sup>104</sup> Yet, FL B cell transcriptomic profile within a single biopsy dynamically spans a continuum of transitional states between proliferating GC-like and quiescent memorylike states, with rare cells carrying a plasma cell-like profile.<sup>107</sup> It is likely that, together with tumor genetics, this transcriptional plasticity impacts FL B cell intra-tissular localization and interactions with TME, including with various specialized subsets of LSCs.

As a disseminated disease, spatial heterogeneity is another level of heterogeneity in FL, with a specific emphasis on BM versus LN niches. CCL19 and CXCL13 are highly expressed within FL BM and correlate with TNF expression, suggesting common driver mechanisms for the development of BM FRC-like/FDC-like stromal cells (unpublished personal data). Conversely, BM CXCL12 is not correlated with TNF level and, as previously described in FL LN, is associated with IL-4 expression.<sup>66</sup> FL B cells and immune TME have thus been proposed to cooperate in the induction of BM FL-CAF polarization. Importantly, very few T cells with a full Tfh phenotype could be detected in FL BM and CD4/CD8 ratio was found increased only in heavily involved  $\mathsf{BM},^{108}$  whereas the level of CXCL12 is already increased in non-involved BM plasma<sup>68</sup>. This discrepancy has been recently solved by the demonstration that FL B cells produce extracellular vesicles that could be internalized by BM stromal cells, making them more efficient to support BM FL B-cell survival and quiescence, at least in part through the production of CXCL12.68

This study further suggests that differences in LN versus BM FL stromal cell phenotypes and mechanisms of reprogramming could drive locally specific patterns of molecular interactions with malignant B cells and contribute to tumor spatial heterogeneity. Interestingly, TGF- $\beta$  signaling was identified as one of the underlying pathway supporting BM stromal cell activation by FL B cell-derived extracellular vesicles.  $^{69}$  A scRNA-seq study comparing distant FL LN from the same patients further highlights a specific correlation between site-to-site tumor heterogeneity and Tfh cell abundance, raising the question of the underlying stromal cell functional features.  $^{106}$  Having discussed how malignant B cells and their stromal inchedynamically co-evolve to support FL initiation and progression, a remaining bullet point is the question of the clinical consequences of this crosstalk on patient behavior and treatment.

# 6 | CLINICAL IMPACT OF FL B CELL/ STROMAL CELL CROSSTALK

In agreement with the key role of TME in FL pathogenesis, the majority of biomarker studies have proposed predictive parameters reflecting TME composition and organization rather than tumor genetic landscape.<sup>3</sup> These studies gave controversial conclusions, with a huge impact of the treatment schedule on the predictive value of each identified biomarker. Moreover, whereas T cell and myeloid cell subsets have been extensively associated with patient outcome, no study has been designed to specifically challenge the predictive value of FL-CAF heterogeneity. LZ FDCs, easily detectable by their specific expression of CD21/CD23, have been variably connected with FL prognosis and a meta-analysis of the literature recently identified high FDC density as associated with poor outcome.  $^{109}\,$ Importantly, none of these biomarker studies includes tumor genetics in the interpretation of the data. The demonstration that numerous recurrent alterations alter TME composition and organization. together with the spatial heterogeneity of B cells and TME, limits the clinical impact of these studies on patient stratification and follow-up.

Considering FL treatment, FL-CAFs should be considered not only for their putative interest as therapeutic targets but also for their impact on resistance to treatments targeting tumor B cells and immune response. A first strategy would be to target B-cell retention within their supportive niche or FL-CAF downstream molecular effectors. Interestingly, both the disruption of CXCL12/CXCR4 axis and the use of BCR inhibitors have been shown to impair Bcell interactions with stromal cells.<sup>110</sup> An intriguing hypothesis is that some specific genetic hits favoring B-cell/stromal cell interplay, such as EZH2 mutations, could sensitize FL B cells to therapeutic approaches aiming at abrogating B-cell/stromal cell interactions. Whether the reprogramming of B-cell/TME crosstalk contributes to the clinical efficacy of EZH2 inhibitors against EZH2 mutated FL remains to be explored. It will require sequential biopsies of LN and BM in order to capture the kinetic of B-cell/TME coevolution under treatment. Moreover, a better understanding of epigenetic

# Immunological Reviews -WILEY

and metabolic pathways underlying FL-CAF commitment and plasticity would provide new therapeutic opportunities. Finally, CAFs have been proposed to strongly impact the response to immunotherapies, including immune checkpoint inhibitors and CAR-T cells, notably by creating a physical barrier maintaining anti-tumor T cells at the periphery of the tumor in collagen-rich areas, and by recruiting and activating Treg, whereas inhibiting CD8<sup>pos</sup> T cell and NK cell cytotoxicity.<sup>111</sup> Blocking of TGF $\beta$  in a mouse model recapitulating immune-excluded phenotype was shown to synergize with anti-PDL1 antibodies by facilitating the penetration of T cells into the center of the tumor thus converting tumors from an excluded to an inflamed phenotype.<sup>112</sup> The enrichment for TGF- $\beta$  signaling within FL tumor niches and the exclusion of CD8 T cells from FL follicles raise the question of the targeting of CAFs or CAF-derived extracellular matrix proteins in FL.

Whereas several 3D models have been recently developed for drug screening in lymphoma, the introduction of LSCs/FL-CAFs in these approaches is mandatory to take into account the major role of B-cell/CAF crosstalk in malignant B-cell survival and drug resistance. Recently, a 3D collagen spheroid model incorporating adiposederived stromal cells has been used to support survival of primary B cells in aggressive lymphoma and was shown useful to evaluate therapeutic compounds.<sup>113</sup> Such approach would be highly valuable in FL, in particular, with additional incorporation of Tfh-mimicking signals, such as CD40L and IL-4.

# 7 | CONCLUDING REMARKS

Functionally and spatially specialized stromal cell subsets collectively contribute to each stage of normal mature B-cell recruitment, homing, survival, activation, proliferation, selection, and differentiation in both LN and BM. These cells are the local precursors of tumorinfiltrating stromal cells in B-cell lymphomas but they have surprisingly received very little attention in FL, until CAFs were recently identified as a major component of tumor-promoting microenvironment in solid cancers. In fact, rapid advances have been made recently in the molecular characterization of CAE diversity even if their origin and commitment/polarization pathways remain poorly defined. In FL, tumor heterogeneity relies on a coevolution of FL B cells and TME. whose dynamic has only been partly deciphered in the absence of sequential sampling of patients in early stage, late stage, relapse, and progression. In particular, the nature of CPC and minimal residual disease stromal niches is of major interest and can hold therapeutic potential in FL, where clinical evolution is marked by cycles of remissions and relapses, which will be gradually less sensitive to treatment. The clinical impact of this new research avenue remains to be explored through well-designed controlled trials including state-of-the-art ancillary studies repositioning B-cell heterogeneity within its ecosystem.

# ACKNOWLEDGEMENTS

CL is a recipient of a fellowship from the FHU CAMIn and the Région Bretagne. This work is supported by the Fondation ARC pour la

# WILEY- Immunological Reviews

Recherche sur le Cancer (Grant PGA1 RF20170205386), the Institut National du cancer (INCA AAP PNP-19-009), and the LLS (TRP 6593-20).

# CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no other competing financial interest.

### ORCID

Karin Tarte b https://orcid.org/0000-0002-6809-917X

### REFERENCES

- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390.
- Huet S, Sujobert P, Salles G. From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. Nat Rev Cancer. 2018;18(4):224-239.
- 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.
- Lamaison C, Tarte K. Impact of B cell/lymphoid stromal cell crosstalk in B-cell physiology and malignancy. *Immunol Lett.* 2019;215: 12-18.
- Milpied P, Nadel B, Roulland S. Premalignant cell dynamics in indolent B-cell malignancies. Curr Opin Hematol. 2015;22(4):388-396.
- Mayer CT, Gazumyan A, Kara EE, et al. The microanatomic segregation of selection by apoptosis in the germinal center. *Science*. 2017;358(6360):eaao2602.
- Roulland S, Navarro J-M, Grenot P, et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. J Exp Med. 2006;203(11):2425-2431.
- Roulland S, Kelly RS, Morgado E, et al. t(14;18) Translocation: a predictive blood biomarker for follicular lymphoma. JCO. 2014;32(13):1347-1355.
- Tellier J, Menard C, Roulland S, et al. Human t(14;18)positive germinal center B cells: a new step in follicular lymphoma pathogenesis? Blood. 2014;123(22):3462-3465.
- Okosun J, Bödör C, Wang J, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. Nat Genet. 2014;46(2):176-181.
- 11. Pasqualucci L, Khiabanian H, Fangazio M, et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep.* 2014;6(1):130-140.
- Carlotti E, Wrench D, Rosignoli G, et al. High throughput sequencing analysis of the immunoglobulin heavy chain gene from flowsorted B cell sub-populations define the dynamics of follicular lymphoma clonal evolution. *PLoS One*, 2015;10(9):e0134833.
- Weigert O, Kopp N, Lane AA, et al. Molecular ontogeny of donorderived follicular lymphomas occurring after hematopoietic cell transplantation. *Cancer Discov.* 2012;2(1):47-55.
- Ruminy P, Jardin F, Picquenot J-M, et al. Sµ mutation patterns suggest different progression pathways in follicular lymphoma: early direct or late from FL progenitor cells. *Blood*. 2008;112(5):1951-1959.
- Federico M, Bellei M, Marcheselli L, et al. 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. 2009;27(27):4555-4562.
- Rambaldi A, Carlotti E, Oldani E, et al. Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH+ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2005;105(9):3428-3433.

#### LAMAISON AND TARTE

- Sungalee S, Mamessier E, Morgado E, et al. Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. J Clin Invest. 2014;124(12):5337-5351.
- Balzano M, De Grandis M, Vu Manh T-P, et al. Nidogen-1 contributes to the interaction network involved in Pro-B cell retention in the Peri-sinusoidal hematopoietic stem cell niche. *Cell Rep.* 2019;26(12):3257-3271.e8.
- Tikhonova AN, Dolgalev I, Hu H, et al. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature*. 2019;569(7755):222-228. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1104-8
- Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, et al. A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia. *Cell*. 2019;177(7):1915-1932.
- Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. Nat Cell Biol. 2020;22(1):38-48. https://doi.org/10.1038/s41556-019-0439-6
- Schürch CM, Caraccio C, Nolte MA. Diversity, localization and (patho)physiology of mature |ymphocyte populations in the bone marrow. Blood. 2021;https://doi.org/10.1182/blood.20200 07592
- Paramithiotis E, Cooper MD. Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(1):208-212.
- Agbay RLMC, Medeiros LJ, Khoury JD, Salem A, Bueso-Ramos CE, Loghavi S. Characteristics and clinical implications of reactive germinal centers in the bone marrow. *Hum Pathol*. 2017;68:7-21. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.03.024
- Krishnamurty AT, Turley SJ. Lymph node stromal cells: cartographers of the immune system. *Nat Immunol.* 2020;21(4):369-380. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0635-3
- Pikor NB, Cheng H-W, Onder L, Ludewig B. Development and immunological function of lymph node stromal cells. J Immunol. 2021;206(2):257-263. https://doi.org/10.4049/jimmu nol.2000914
- Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, et al. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol*. 2012;13(5):499-510. https://doi. org/10.1038/ni.2262
- Chai Q, Onder L, Scandella E, et al. Maturation of lymph node fibroblastic reticular cells from myofibroblastic precursors is critical for antiviral immunity. *Immunity*. 2013;38(5):1013-1024. https:// doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.012
- Sitnik K, Wendland K, Weishaupt H, et al. Context-dependent development of lymphoid stroma from adult CD34+ adventitial progenitors. *Cell Rep.* 2016;14(10):2375-2388. https://doi. org/10.1016/j.celrep.2016.02.033
- Golub R, Tan J, Watanabe T, Brendolan A. Origin and immunological functions of spleen stromal cells. *Trends Immunol.* 2018;39(6):503-514. https://doi.org/10.1016/j.it.2018.02.007
- Perez-Shibayama C, Gil-Cruz C, Ludewig B. Fibroblastic reticular cells at the nexus of innate and adaptive immune responses. *Immunol Rev.* 2019;289(1):31-41. https://doi.org/10.1111/ imr.12748
- Rodda LB, Lu E, Bennett ML, et al. Single-cell RNA sequencing of lymph node stromal cells reveals niche-associated heterogeneity. *Immunity*. 2018;48(5):1014-1028.
- Pikor NB, Mörbe U, Lütge M, et al. Remodeling of light and dark zone follicular dendritic cells governs germinal center responses. *Nat Immunol.* 2020;21(6):649-659. https://doi.org/10.1038/s4159 0-020-0672-y
- Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(7):495-504. https://doi.org/10.1038/nri3689
- 35. Nowosad CR, Spillane KM, Tolar P. Germinal center B cells recognize antigen through a specialized immune synapse architecture.

Nat Immunol. 2016;17(7):870-877. https://doi.org/10.1038/ ni.3458

- Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, et al. 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. 1994;152(8):3760-3767.
- Yoon S-O, Zhang X, Berner P, Blom B, Choi YS. Notch ligands expressed by follicular dendritic cells protect germinal center B cells from apoptosis. J Immunol. 2009;183(1):352-358. https://doi. org/10.4049/jimmunol.0803183
- Sacedón R, Díez B, Nuñez V, et al. Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. J Immunol. 2005;174(3):1456-1461.
- Park C-S, Yoon S-O, Armitage RJ, Choi YS. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J Immunol*. 2004;173(11):6676-6683.
- Gorelik L, Gilbride K, Dobles M, Kalled SL, Zandman D, Scott ML. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. J Exp Med. 2003;198(6):937-945. https://doi.org/10.1084/jem.20030789
- Kim J, Kim DW, Chang W, et al. Wnt5a is secreted by follicular dendritic cells to protect germinal center B Cells via Wnt/Ca2+/NFAT/ NF-xB-B cell lymphoma 6 signaling. *J Immunol.* 2012;188(1):182-189. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102297
- Kranich J, Krautler NJ, Heinen E, et al. Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. *J Exp Med.* 2008;205(6):1293-1302. https://doi.org/10.1084/jem.2007 1019
- Bannard O, Horton RM, Allen CDC, An J, Nagasawa T, Cyster JG. Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity*. 2013;39(5):912-924. https://doi. org/10.1016/j.immuni.2013.08.038
- Rodda LB, Bannard O, Ludewig B, Nagasawa T, Cyster JG. Phenotypic and morphological properties of germinal center dark zone Cxcl12expressing reticular cells. J Immunol. 2015;195(10):4781-4791. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501191
- Katakai T. Marginal reticular cells: a stromal subset directly descended from the lymphoid tissue organizer. Front Immunol. 2012;3: https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00200
- Jarjour M, Jorquera A, Mondor I, et al. Fate mapping reveals origin and dynamics of lymph node follicular dendritic cells. J Exp Med. 2014;211(6):1109-1122. https://doi.org/10.1084/jem.20132409
- Cremasco V, Woodruff MC, Onder L, et al. B cell homeostasis and follicle confines are governed by fibroblastic reticular cells. Nat Immunol. 2014;15(10):973-981. https://doi.org/10.1038/ni.2965
- Wang X, Cho B, Suzuki K, et al. Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. J Exp Med. 2011;208(12):2497-2510. https://doi. org/10.1084/jem.20111449
- Zhang Y, Tech L, George LA, et al. Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells. J Exp Med. 2018;215(4):1227-1243. https://doi.org/10.1084/ jem.20160832
- Lu E, Cyster JG. G-protein coupled receptors and ligands that organize humoral immune responses. *Immunol Rev.* 2019;289(1):158-172. https://doi.org/10.1111/imr.12743
- Huang H-Y, Rivas-Caicedo A, Renevey F, et al. Identification of a new subset of lymph node stromal cells involved in regulating plasma cell homeostasis. PNAS. 2018;115(29):E6826-E6835. https://doi.org/10.1073/pnas.1712628115
- Mourcin F, Verdière L, Roulois D, et al. Follicular lymphoma triggers phenotypic and functional remodeling of human lymphoid stromal cell landscape. *Immunity*. 2021; in press.
- Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, et al. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin β receptor by

radioresistant stromal cells and of lymphotoxin  $\beta$  and tumor necrosis factor by B cells. *J Exp Med.* 1999;189(1):159-168. https://doi.org/10.1084/jem.189.1.159

Immunological Reviews -WILEY

- Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*. 2000;406(6793):309-314. https://doi.org/10.1038/35018581
- Dubey LK, Lebon L, Mosconi I, et al. Lymphotoxin-dependent B cell-FRC crosstalk promotes de novo follicle formation and antibody production following intestinal helminth infection. *Cell Rep.* 2016;15(7):1527-1541. https://doi.org/10.1016/j. celrep.2016.04.023
- Gregory JL, Walter A, Alexandre YO, et al. Infection programs sustained lymphoid stromal cell responses and shapes lymph node remodeling upon secondary challenge. *Cell Rep.* 2017;18(2):406-418. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.038
- Mionnet C, Mondor I, Jorquera A, et al. Identification of a new stromal cell type involved in the regulation of inflamed B cell follicles. *PLoS Biol.* 2013;11(10):e1001672. https://doi.org/10.1371/ journal.pbio.1001672
- Astarita JL, Cremasco V, Fu J, et al. The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. Nat Immunol. 2015;16(1):75-84. https:// doi.org/10.1038/ni.3035
- Yang C-Y, Vogt TK, Favre S, et al. Trapping of naive lymphocytes triggers rapid growth and remodeling of the fibroblast network in reactive murine lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(1):E109-118. https://doi.org/10.1073/pnas.1312585111
- Majumder S, Amatya N, Revu S, et al. IL-17 metabolically reprograms activated fibroblastic reticular cells for proliferation and survival. Nat Immunol. 2019;20(5):534-545. https://doi.org/10.1038/ s41590-019-0367-4
- Fleige H, Ravens S, Moschovakis GL, et al. IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. J Exp Med. 2014;211(4):643-651. https://doi.org/10.1084/jem.20131737
- Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood.* 2004;104(5):1258-1265. https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4434
- Bachy E, Maurer MJ, Habermann TM, et al. A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. *Blood.* 2018;132(1):49-58. https://doi. org/10.1182/blood-2017-11-816405
- Chang K-C, Huang X, Medeiros LJ, Jones D. Germinal centrelike versus undifferentiated stromal immunophenotypes in follicular lymphoma. J Pathol. 2003;201(3):404-412. https://doi. org/10.1002/path.1478
- Pepe G, Napoli AD, Cippitelli C, Scarpino S, Pilozzi E, Ruco L. Reduced lymphotoxin-beta production by tumour cells is associated with loss of follicular dendritic cell phenotype and diffuse growth in follicular lymphoma. *The Journal of Pathology: Clinical Research*. 2018;4(2):124-134. https://doi.org/10.1002/cjp2.97
- Pandey S, Mourcin F, Marchand T, et al. IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood.* 2017;129(18):2507-2518. https://doi.org/10.1182/blood -2016-08-737239
- Sangaletti S, Tripodo C, Portararo P, et al. Stromal niche communalities underscore the contribution of the matricellular protein SPARC to B-cell development and lymphoid malignancies. Oncoimmunology. 2014;3:e28989. https://doi.org/10.4161/onci.28989
- Dumontet E, Pangault C, Roulois D, et al. Extracellular vesicles shed by follicular lymphoma B cells promote the polarization of bone marrow stromal cell niche. *Blood*. Published online February 24, 2021. doi:10.1182/blood.2020008791
- Bognár Á, Csernus B, Bödör C, et al. Clonal selection in the bone marrow involvement of follicular lymphoma. *Leukemia*. 2005;19(9):1656-1662. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403844

# WILEY- Immunological Reviews

- Wartenberg M, Vasil P, Bueschenfelde CMZ, et al. Somatic hypermutation analysis in follicular lymphoma provides evidence suggesting bidirectional cell migration between lymph node and bone marrow during disease progression and relapse. *Haematologica*. 2013;98(9):1433-1441. https://doi.org/10.3324/ haematol.2012.074252
- Araf S, Wang J, Korfi K, et al. Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2018;32(5):1261-1265. https://doi.org/10.1038/s41375-018-0043-y
- Ménard C, Dulong J, Roulois D, et al. Integrated transcriptomic, phenotypic, and functional study reveals tissue-specific immune properties of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2020;38(1):146-159. https://doi.org/10.1002/stem.3077
- Guilloton F, Caron G, Ménard C, et al. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood.* 2012;119(11):2556-2567. https://doi.org/10.1182/blood -2011-08-370908
- 74. Epron G, Ame-Thomas P, Le Priol J, et al. Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia*. 2012;26(1):139-148. https://doi.org/10.1038/leu.2011.179
- Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(43):18587-18592. https://doi.org/10.1073/pnas.1009388107
- Odabashian M, Carlotti E, Araf S, et al. IGHV sequencing reveals acquired N-glycosylation sites as a clonal and stable event during follicular lymphoma evolution. *Blood.* 2020;135(11):834-844. https://doi.org/10.1182/blood.2019002279
- Linley A, Krysov S, Ponzoni M, Johnson PW, Packham G, Stevenson FK. Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood.* 2015;126(16):1902-1910. https://doi.org/10.1182/blood -2015-04-640805
- Amin R, Mourcin F, Uhel F, et al. DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood*. 2015;126(16):1911-1920. https://doi. org/10.1182/blood-2015-04-640912
- Misiak J, Jean R, Rodriguez S, et al. Human Lymphoid Stromal Cells Contribute to Polarization of Follicular T Cells Into IL-4 Secreting Cells. Front Immunol. 2020;11: https://doi.org/10.3389/ fimmu.2020.559866
- Grégoire M, Guilloton F, Pangault C, et al. Neutrophils trigger a NFxB dependent polarization of tumor-supportive stromal cells in germinal center B-cell lymphomas. *Oncotarget*. 2015;6(18):16471-16487. https://doi.org/10.18632/oncotarget.4106
- Gallouet A-S, Travert M, Bresson-Bepoldin L, et al. COX-2-Independent Effects of Celecoxib Sensitize Lymphoma B Cells to TRAIL-Mediated Apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2014;20(10):2663-2673. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2305
- Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(3):463-479.e10. https://doi. org/10.1016/j.ccell.2018.01.011
- Weissmann M, Arvatz G, Horowitz N, et al. Heparanaseneutralizing antibodies attenuate lymphoma tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(3):704-709. https:// doi.org/10.1073/pnas.1519453113
- Bénézech C, Mader E, Desanti G, et al. Lymphotoxin-β Receptor Signaling through NF-xB2-RelB Pathway Reprograms Adipocyte Precursors as Lymph NodeStromal Cells. *Immunity*. 2012;37(4):721-734. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.010
- Apoorva F, Loiben AM, Shah SB, et al. How Biophysical Forces Regulate Human B Cell Lymphomas. Cell Rep. 2018;23(2):499-511. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.069

#### LAMAISON AND TARTE

- Fiore F, Von Bergwelt-Baildon MS, Drebber U, et al. Dendritic cells are significantly reduced in non-Hodgkin's lymphoma and express less CCR7 and CD62L. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(4):613-622. https://doi.org/10.1080/10428190500360971
- Yang Z-Z, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Malignant B Cells Skew the Balance of Regulatory T Cells and TH17 Cells in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Res.* 2009;69(13):5522-5530. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0266
- Amé-Thomas P, Hoeller S, Artchounin C, et al. CD10 delineates a subset of human IL-4 producing follicular helper T cells involved in the survival of follicular lymphoma B cells. *Blood*. 2015;125(15):2381-2385. https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-625152
- Pangault C, Amé-Thomas P, Rossille D, et al. Integrative Analysis of Cell Crosstalk within Follicular Lymphoma Cell Niche: Towards a Definition of the FL Supportive Synapse. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10): https://doi.org/10.3390/cancers12102865
- Yang Z-Z, Grote DM, Ziesmer SC, et al. Soluble and Membrane-Bound TGF-p-Mediated Regulation of Intratumoral T Cell Differentiation and Function in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *PLoS One*. 2013;8(3): https://doi.org/10.1371/journ al.pone.0059456
- Yang Z-Z, Grote DM, Xiu B, et al. TGF-β upregulates CD70 expression and induces exhaustion of effector memory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2014;28(9):1872-1884. https://doi.org/10.1038/leu.2014.84
- Amé-Thomas P, Le Priol J, Yssel H, et al. Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. *Leukemia*. 2012;26(5):1053-1063. https://doi.org/10.1038/leu.2011.301
- Maby-El Hajjami H, Amé-Thomas P, Pangault C, et al. Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res.* 2009;69(7):3228-3237. https://doi.org/10.1158/0008-5472. CAN-08-3000
- Green MR, Kihira S, Liu CL, et al. Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(10):E1116-E1125. https://doi.org/10.1073/pnas.1501199112
- Green MR. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. Blood. 2018;131(6):595-604. https://doi.org/10.1182/ blood-2017-08-737361
- Béguelin W, Rivas MA, Calvo Fernández MT, et al. EZH2 enables germinal centre formation through epigenetic silencing of CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop. *Nat Commun.* 2017;8: https://doi.org/10.1038/s41467-017-01029-x
- Béguelin W, Teater M, Meydan C, et al. Mutant EZH2 Induces a Pre-malignant Lymphoma Niche by Reprogramming the Immune Response. *Cancer Cell*. 2020;37(5):655-673.e11. https://doi. org/10.1016/j.ccell.2020.04.004
- Boice M, Salloum D, Mourcin F, et al. Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. Cell. 2016;167(2):405-418.e13. https://doi.org/10.1016/j. cell.2016.08.032
- Mintz MA, Felce JH, Chou MY, et al. The HVEM-BTLA Axis Restrains T Cell Help to Germinal Center B Cells and Functions as a Cell-Extrinsic Suppressor in Lymphomagenesis. *Immunity*. 2019;51(2):310-323.e7. https://doi.org/10.1016/j. immuni.2019.05.022
- Ortega-Molina A, Deleyto-Seldas N, Carreras J, et al. Oncogenic Rag GTPase signaling enhances B cell activation and drives follicular lymphoma sensitive to pharmacological inhibition of mTOR. *Nat Metab.* 2019;1(8):775-789. https://doi.org/10.1038/s42255-019-0098-8
- Bararia D, Hildebrand JA, Stolz S, et al. Cathepsin S Alterations Induce a Tumor-Promoting Immune Microenvironment in Follicular Lymphoma. *Cell Rep.* 2020;31(5):107522. https://doi. org/10.1016/j.celrep.2020.107522

- Dheilly E, Battistello E, Katanayeva N, et al. Cathepsin S Regulates Antigen Processing and T Cell Activity in Non-Hodgkin Lymphoma. Cancer Cell. 2020;37(5):674–689.e12. https://doi.org/10.1016/j. ccell.2020.03.016
- Andor N, Simonds EF, Czerwinski DK, et al. Single-cell RNA-Seq of follicular lymphoma reveals malignant B-cell types and coexpression of T-cell immune checkpoints. *Blood.* 2019;133(10):1119-1129. https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-862292
- Milpied P, Cervera-Marzal I, Mollichella M-L, et al. Human germinal center transcriptional programs are de-synchronized in B cell lymphoma. *Nat Immunol.* 2018;19(9):1013-1024. https://doi. org/10.1038/s41590-018-0181-4
- Roider T, Seufert J, Uvarovskii A, et al. Dissecting intratumour heterogeneity of nodal B-cell lymphomas at the transcriptional, genetic and drug-response levels. *Nat Cell Biol*. 2020;22(7):896-906. https://doi.org/10.1038/s41556-020-0532-x
- 106. Haebe SE, Shree T, Sathe A, et al. Single Cell Analysis Can Define Distinct Evolution of Tumor Sites in Follicular Lymphoma. *Blood.* Published online March 16, 2021. doi:10.1182/ blood.2020009855
- Attaf N, Cervera-Marzal I, Gil L, et al. Single-cell RNA sequencing identifies a pseudo-immune differentiation axis as the main source of functional heterogeneity in follicular lymphoma B-cells. *Blood.* 2019;134(Supplement\_1):548.
- Wahlin BE, Sander B, Christensson B, et al. Entourage: the immune microenvironment following follicular lymphoma. *Blood Cancer J.* 2012;2(1):e52. https://doi.org/10.1038/bcj.2011.53
- 109. Xie M, Jiang Q, Zhao S, Zhao J, Ye X, Qian W. Prognostic value of tissue-infiltrating immune cells in tumor

Immunological Reviews -WILEY 285

microenvironment of follicular lymphoma: a meta-analysis. *Int Immunopharmacol.* 2020;85:106684. https://doi.org/10.1016/j. intimp.2020.106684

- Mourcin F, Pangault C, Amin-Ali R, Amé-Thomas P, Tarte K. Stromal cell contribution to human follicular lymphoma pathogenesis. *Front Immunol.* 2012;3: https://doi.org/10.3389/ fimmu.2012.00280
- Mhaidly R, Mechta-Grigoriou F. Fibroblast heterogeneity in tumor micro-environment: Role in immunosuppression and new therapies. Semin Immunol. 2020;48:101417. https://doi.org/10.1016/j. smim.2020.101417
- Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, et al. TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*. 2018;554(7693):544-548. https://doi.org/10.1038/natur e25501
- 113. Foxall R, Narang P, Glaysher B, et al. Developing a 3D B Cell Lymphoma Culture System to Model Antibody Therapy. Front Immunol. 2021;11: https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.605231

How to cite this article: Lamaison C, Tarte K. B cell/stromal cell crosstalk in health, disease, and treatment: Follicular lymphoma as a paradigm. *Immunol Rev.* 2021;302:273–285. https://doi.org/10.1111/imr.12983

# c) Le microenvironnement aura t-il le dernier mot sur l'hétérogénéité tumorale ?

Nous pouvons donc affirmer que les lymphocytes B de LF peuvent faire preuve d'une importante plasticité. De plus, certaines études font état d'une transdifférenciation des cellules tumorales de lymphome folliculaire en néoplasies de la lignée myéloïde (histiocytaire et dendritique) et en lymphome de type anaplasique, démontrant un autre degré de plasticité phénotypique et d'hétérogénéité 416,417. Même si elles sont rares, la capacité des thérapies à promouvoir la transdifférenciation en exerçant une pression sélective sur les cellules malignes doit être également prise en compte <sup>417</sup>. De plus, nous savons que les thérapies impactent le phénotype tumoral et l'activité métabolique et transcriptionnelle des cellules: dans le lymphome du manteau, les cellules résistantes à l'ibrutinib ont remodelé leur métabolisme vers la phosphorylation oxydative <sup>418</sup> et le métabolisme de la glutamine <sup>419</sup> et présentent fréquemment des mutations de TP53<sup>420</sup>. TP53 est l'un des gènes les plus fortement associés à la transformation dans le LF, les mutations étant rares dans les échantillons diagnostiques (~5%) mais fréquentes dans le LF transformé (25%-30%)<sup>278</sup>. Enfin, l'hétérogénéité des LFs ne semble pas seulement être déterminée par leur profil génique ou transcriptionnel. Les LFs de type duodénal, par exemple, sont caractérisés par leur localisation exclusive dans le duodénum avec une progression et une dissémination très indolentes <sup>421,422</sup> et leurs caractéristiques cellulaires sont indiscernables de celles des LFs classiques <sup>249</sup>. Ils présentent un paysage mutationnel très proche . La majorité des gènes mutés de façon récurrente dans le LF, notamment CREBBP, TNFRSF14 et EZH2, sont mutés à des fréquences similaires dans le sous-type duodénal <sup>423</sup>. Hellmuth et al n'ont pas détecté de nouvelles mutations spécifiques par Whole Exome Sequencing et les altérations du nombre de copies étaient similaires au LF typique, comme les délétions de 1p36 (y compris TNFRSF14) et les gains de 7p (y compris EZH2). En contraste avec un paysage mutationnel très similaire, ils ont trouvé des différences marquées dans le milieu des chimiokines/cytokines . En effet, ils ont constaté une plus grande abondance de cellules Th17 dans le LF de type duodénal par rapport au LF ganglionnaire. Des niveaux plus faibles de CCL21 ont également été détectés dans le LF de type duodénal. Cette observation soulève l'hypothèse selon laquelle les CPCs au sein d'un microenvironnement inflammatoire chronique dans le tractus gastro-intestinal peuvent donner naissance à un LF de type duodénal confiné, tandis que les CPC au sein du microenvironnement immunitaire ganglionnaire, permissif à la progression et à la dissémination, seront plus aptes à développer un LF classique.

L'objectif principal au cours de ma thèse était de caractériser les interactions entre la niche stromale et les lymphocytes B dans le LF. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur deux approches :

1) La mise en place d'un modèle de culture *in vitro* permettant de récapituler au mieux les interactions B/stroma *in vivo*, d'étudier de façon cinétique les modifications de chacun des 2 types cellulaires induites par ce crosstalk, de tester avec des approches haut débit de nouveaux agents thérapeutiques ciblant ces interactions. Pour cela nous avons initié une collaboration avec les laboratoires de Laurence Bepoldin et de Pierre Nassoy autour d'un modèle de coculture 3D en billes d'alginate intégrant des B tumoraux, des cellules stromales, et de la matrice extracellulaire, recréant des forces biomécaniques similaires à celles retrouvées au sein des tissus. Nous souhaitions caractériser le devenir des B tumoraux dans ce modèle, établir sa pertinence, et tester la possibilité d'inclure des B primaires de LF. Ces travaux font l'objet du manuscrit présenté, récemment publié dans Blood Advances.

2) L'étude *in situ* chez les patients atteints de LF de l'hétérogénéité spatiale des niches tumorales. Notre équipe avait récemment travaillé sur la comparaison des niches médullaires et ganglionnaires et nous avons voulu ici explorer, au niveau des ganglions envahis, les niches périganglionnaire *versus* intraganglionnaire. Pour cela, nous avons employé des méthodes d'analyse spatiale par microdissection/Nanostring et par Digital Spatial Profiling (DSP). Ces travaux, encore en cours, sont présentés dans une deuxième partie.

CHAPITRE II RESULTAT

# Résultats

# A. Article: A novel 3D culture model recapitulates primary FL B cell features and promotes their survival

Check for updates

nloaded

from

http:

//ashpublications

ss/article-pdf/doi/10.1182/bloodadvances.2020003949/1824025/bloodadvances.2020003949.pdf by guest on 27

Uctobe

2021



American Society of Hemicology 2021 L Street NN, Suite 900, Washington, DC 20036 Phone: 202-776-0544 | Fax 202-776-0545 bloodadvances@hematology.org

# A novel 3D culture model recapitulates primary FL B cell features and promotes their survival

Tracking no: ADV-2020-003949R1

Claire Lamaison (INSERM U1236, France) Simon Latour (University of Toronto, Canada) Nelson Hélaine (UMR 5298 LP2N, France) Valérie Le Morvan (INSERM U1218, France) Julien Saint-Vanne (INSERM U1236, France) Isabelle Mahouche (INSERM U1218, France) LEINE MONVOISIN (UMR 1236 MIC MAC, France) Christelle Dussert (INSERM U1218, France) Laëtitia Andrique (Univ. Bordeaux, France) Laurent Deleurme (UMR1236,) Elise Dessauge (INSERM U1236, France) Celine Pangault (Université Rennes I, France) Sylvain Baulande (Institut Curie Genomics of Excellence (ICGex) Platform, France) Patricia Legoix (Institut Curie Research Center, France) Marine Seffals (Université Rennes 1, France) LáB Eroca-Brisson (U1218, France) Kévin Alessandri (CNRS UMR 5298 LP2N, France) Martina Prochazkova-Carlotti (INSERM U1053 and Univ. Bordeaux, France) Pierre Soubeyran (Institut Bergonie, France) Jean-Philippe Merlio (CHU and Univ. Bordeaux, France) Frederic Mourcin (Inserm U1236, France) Jean-Philippe Merlio (CHU and Univ. Bordeaux, France) LP2N, France) Karin Tarte (Faculté de Médecine, France) BESSON-BEPOLDIN Laurence (INSERM U1053, France)

#### Abstract:

Non-Hodgkin B-cell lymphomas (B-NHL) mainly develop within lymph nodes (LN) as densely packed aggregates of tumor cells and their surrounding microenvironment, creating a tumor niche specific to each lymphoma subtypes. In vitro preclinical models mimicking biomechanical forces, cellular microenvironment, and 3D organization of B-cell lymphomas remain scarce, while all these parameters constitute key determinants of lymphomagenesis and drug resistance. Using a microfluidic method based on cell encapsulation inside permeable, elastic, and hollow alginate microspheres, we developed a new tunable 3D-model incorporating lymphoma B cells, extracellular matrix (ECM), and/or tonsil stromal cells (TSC). We revealed that under 3D confinement lymphoma B cells were able to form cohesive spheroids resulting from overexpression of ECM components. Moreover, lymphoma B cells and TSC dynamically formed self-organized 3D spheroids favoring spheroid growth. 3D culture induced resistance to classical chemotherapeutic agent doxorubicin, but not to BCL2 inhibitor ABT-199, identifying this approach as a relevant in vitro model to assess the activity of therapeutic agents in P-NHL. RNAseq analysis highlighted the synergy of 3D, ECM, and TSC in upregulating similar pathways in malignant B cells in vitro than those overexpressed in primary lymphoma cells in situ. Finally, our 3D model including ECM and TSC allowed long-term in vitro survival of primary follicular lymphoma B cells. In conclusion, we propose a new high throughput 3D model mimicking lymphoma tumor niche and making it possible to study the dynamic relationship between lymphoma B cells and their microenvironment and to screen new anti-cancer drugs.

### Conflict of interest: No COI declared

### COI notes:

Preprint server: Yes; bioRxiv 10.1101/2020.10.17.343657

Author contributions and disclosures: LBB (Laurence Bresson-Bepoldin), KT, PN, FM and GR designed the research, supervised the study and wrote the paper. CL, SL, VLM, FM and LBB (Laurence Bresson-Bepoldin) performed experiments, analyzed the data and wrote the paper. NH, CM, IM, CD, LBB (Lea Broca-Brisson), CP, MS, MC, LA, GR, LD, and KA performed experiments. PS and JPM gave insightful advice and participated in the conduction of the study. SB and PL performed RNAseq. JSV analyzed RNAseq data.

#### Non-author contributions and disclosures: No;

Agreement to Share Publication-Related Data and Data Sharing Statement: Public deposit of RNAseq data Other data available upon request by emails to the corresponding authors

Clinical trial registration information (if any):

# A novel 3D culture model recapitulates primary FL B-cell features and promotes their survival

# Short title: 3D culture model recapitulating lymphoma features

Claire Lamaison<sup>1¥</sup>, Simon Latour<sup>2,3¥‡</sup>, Nelson Hélaine<sup>4 ¥</sup>, Valérie Le Morvan<sup>2,3</sup>, Julien Saint-Vanne<sup>1</sup>, Isabelle Mahouche<sup>2,3</sup>, Céline Monvoisin<sup>1</sup>, Christelle Dussert<sup>2,3</sup>, Laëtitia Andrique<sup>5</sup>, Laurent Deleurme<sup>1</sup>, Elise Dessauge<sup>1</sup>, Céline Pangault<sup>1,6</sup>, Sylvain Baulande<sup>7</sup>, Patricia Legoix<sup>7</sup>, Marine Seffals<sup>8</sup>, Léa Broca-Brisson<sup>2,3‡</sup>, Kévin Alessandri<sup>4‡</sup>, Martina Carlotti<sup>9</sup>, Pierre Soubeyran<sup>2,3</sup>, Jean-Philippe Merlio<sup>9</sup>, Frédéric Mourcin<sup>1</sup>, Pierre Nassoy<sup>4</sup>, Gaëlle Recher<sup>4,\*\*</sup>, Karin Tarte<sup>1,6,\*\*</sup> and Laurence Bresson-Bepoldin<sup>2,3,\*\*‡</sup>

<sup>¥</sup>: co-first authors

\*\*: co-corresponding authors

<sup>1</sup>UMR S 1236, Univ Rennes, INSERM, Etablissement Français du sang, F-35000, Rennes, France.

<sup>2</sup>Univ. Bordeaux, INSERM U1218 ACTION, CNRS, F-33076 Bordeaux, France <sup>3</sup>Institut Bergonié, Comprehensive Cancer Centre, Bordeaux, France

 <sup>4</sup>Univ. Bordeaux, CNRS UMR 5298 LP2N, Laboratoire Photonique Numérique et Nanosciences, Institut d'Optique Graduate School, F-33400 Talence, France
<sup>5</sup>Univ. Bordeaux, TBMCore VoxCell facility, F-33076 Bordeaux, France
<sup>6</sup>Pôle de Biologie, CHU Pontchaillou, F-35000, Rennes, France

 <sup>7</sup> Institut Curie Genomics of Excellence (ICGex) Platform, Institut Curie Research Center, PSL Research University, F-75005, Paris, France
<sup>8</sup>Univ. Rennes1, Inserm, CNRS, UMS Biosit, Core Facility H2P2 Rennes, France

<sup>9</sup>Univ. Bordeaux, INSERM U1053 BARITON, F-33076 Bordeaux, France

\*\*: Corresponding authors:

Laurence Bresson-Bepoldin, Universités de Bordeaux, INSERM U1053 BARITON, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex; e-mail: <u>laurence.bresson-bepoldin@inserm.fr.</u> Phone: +33 5 57 57 10 27 32

Karin Tarte, INSERM, UMR U1236, Faculté de Médecine, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, F-35043 Rennes; e-mail: <u>karin.tarte@univ-rennes1.fr</u>. Phone: +33 (0) 223 234 512

Gaëlle Recher, LP2N - UMR 5298, CNRS, IOGS & Univ Bordeaux, rue François Mitterrand, 33400 Talence, France ; e-mail: <u>gaelle.recher@institutoptique.fr</u>. Phone : + 33 (0) 5 57 01 72 69

Word counts: Text: 4056 Abstract: 243

Figure count: 7 Reference count: 56

\* Present addresses:

S Latour: University of Toronto, Institute of Biomedical Engineering, Toronto, Canada L Broca-Brisson: University Paris-Saclay, CEA, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), F-91191, Gif-sur-Yvette, France.

K Alessandri: TreeFrog Therapeutics, 33600 Pessac, France

L Bresson-Bepoldin: University of Bordeaux, INSERM U1053 BARITON, CNRS, F-33000, Bordeaux, France.

# ABSTRACT

Non-Hodgkin B-cell lymphomas (B-NHL) mainly develop within lymph nodes as aggregates of tumor cells densely packed with their surrounding microenvironment, creating a tumor niche specific to each lymphoma subtypes. In vitro preclinical models mimicking biomechanical forces, cellular microenvironment, and 3D organization of B-cell lymphomas remain scarce, while all these parameters are key determinants of lymphomagenesis and drug resistance. Using a microfluidic method based on cell encapsulation inside permeable, elastic, and hollow alginate microspheres, we developed a new tunable 3D-model incorporating lymphoma B cells, extracellular matrix (ECM), and/or tonsil stromal cells (TSC). Under 3D confinement lymphoma B cells were able to form cohesive spheroids resulting from overexpression of ECM components. Moreover, lymphoma B cells and TSC dynamically formed self-organized 3D spheroids favoring tumor cell growth. 3D culture induced resistance to the classical chemotherapeutic agent doxorubicin, but not to the BCL2 inhibitor ABT-199, identifying this approach as a relevant in vitro model to assess the activity of therapeutic agents in B-NHL. RNA-seq analysis highlighted the synergy of 3D, ECM, and TSC in upregulating similar pathways in malignant B cells in vitro than those overexpressed in primary lymphoma B cells in situ. Finally, our 3D model including ECM and TSC allowed long-term in vitro survival of primary follicular lymphoma B cells. In conclusion, we propose a new highthroughput 3D model mimicking lymphoma tumor niche and making it possible to study the dynamic relationship between lymphoma B cells and their microenvironment and to screen new anti-cancer drugs.
# Key points

1- 3D alginate spheroid model supports self-organization of lymphoma B cells and stromal cells mimicking lymphoma cell niche.

2- This high-throughput 3D model is suitable for testing new therapeutic agents in B-NHL.

# INTRODUCTION

Non-Hodgkin lymphomas (NHL) are a group of common hematological malignancies, with the majority of them originating from B cells. Follicular lymphoma (FL) and diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL), the two most frequent B-cell NHL (B-NHL)<sup>1.2</sup>, result from the malignant transformation of germinal center (GC) or post-GC B cells. FL are indolent lymphomas characterized by the occurrence of the t(14;18)(q32;q21) translocation combined with additional recurrent somatic alterations<sup>3</sup>. Two major subtypes of aggressive DLBCL, GC B-cell (GCB) and activated B-cell (ABC)-DLBCL, have been identified using gene expression profiling, reflecting their putative cell of origin and molecular alterations<sup>4</sup>. Despite a better understanding of the pathophysiology of these tumors, frontline therapy remains based on a combination of conventional chemotherapies such as CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) and a monoclonal antibody against CD20. Nonetheless, relapse/refractory DLBCL, corresponding to about 30% of patients, remains a major unmet medical need with poor outcome, whereas FL is still an incurable disease<sup>3,5</sup>. It is now widely accepted that tumors constitute a complex ecosystem composed of many cell types regulated by biological, structural, chemical, and mechanical cues, that altogether participate in the effectiveness of treatment<sup>6</sup>. The tumor microenvironment (TME) of B-NHL contains highly variable numbers of heterogeneous immune cells, stromal cells, blood vessels, and extracellular matrix (ECM), and the interplay between these elements produces a tumor niche specific to each lymphoma subtype<sup>7,8</sup>. Dave et al<sup>9</sup> initially revealed that the survival of patients with FL correlates with the immune signature of the tumor at diagnosis. Indeed, FL exhibits a high dependence on a GClike microenvironment where immune and stromal cells support survival, proliferation,

and migration of malignant B cells. In turn, FL cells modulate the phenotype and function of their surrounding microenvironment. In particular, FL-infiltrating stromal cells are engaged in a bidirectional crosstalk with malignant B cells within infiltrated lymph nodes (LN) and bone marrow<sup>10-12</sup>. Conversely DLBCL are less dependent on LN microenvironment but specific stromal signatures impact DLBCL prognosis<sup>7,13,14</sup>. Importantly, studies exploring functional interactions between lymphoma B cells and stromal cells generally used 2D in vitro culture models whereas biomechanical forces and 3D organization emerge as key determinants of lymphoma pathogenesis and drug resistance. Multicellular spheroids or tumor organoids represent promising models allowing high-throughput screening of anti-cancer drugs in versatile systems mixing several cell types and ECM components. While 3D culture models are increasingly developed for solid cancer<sup>15</sup>, their transfer to lymphoma modeling is still limited and includes: i) multicellular aggregates of lymphoma cells, which are obtained using the hanging drop and ultra-low attachment method, and are useful for testing drug efficacy but do not account for the effect of cell-cell and cell-ECM interactions<sup>16-18</sup>, ii) 3D lymphoma organoid models integrating lymphoid-like stromal cells or integrin-specific binding peptides recapitulating more accurately lymphoma microenvironment, but difficult to handle and low-throughput<sup>19</sup>, iii) a DLBCL-on-chip model utilizing lymphoma and TME murine cells, enabling the in vitro modeling of DLBCL niche and associated vasculature<sup>20</sup>. However, modeling the interactions of the TME with primary lymphoma B cells in 3D cocultures remains a challenge. In particular, 3D cocultures have been successful only with primary DLBCL cells <sup>21</sup>, but not with primary FL cells.

In the present study, using a microfluidic method based on the encapsulation of cells inside permeable, elastic, and hollow alginate microspheres<sup>22</sup>, we developed a new

tunable 3D model incorporating lymphoma B cells, together with ECM and/or stromal cells. We observed that lymphoma B cells and stromal cells formed 3D spheroids, whose internal architecture was driven by self-organization, and recapitulated some of the molecular features of FL tumors. Moreover, this approach made it possible to assess drug efficacy in a relevant *in vitro* B-NHL model. Finally, this 3D model allowed the survival of primary FL B cells *in vitro*, removing a technological bottleneck to study TME and tumor cell relationships in this still fatal malignancy.

# METHODS

Details regarding reagents and additional experimental methods are provided in the Supplemental Information.

# **Encapsulation procedure**

Cell encapsulation was performed essentially as previously described<sup>23,24</sup>. First, the microfluidic device was 3D printed and a glass capillary (~150 µm diameter) was glued to the exit of the device. Then three solutions loaded in syringes mounted to pumps were injected into the coaxial cones of the device. The outermost cone contained the alginate solution, the intermediate cone contained a 300 mM sorbitol solution, and the innermost cone contained the cells in sorbitol or Matrigel/sorbitol solution. Composite droplets exiting the nozzle fell in a 100mM CaCl<sub>2</sub> bath for gelling on. Once formed, capsules were washed with cell culture medium. Cellular capsules were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS.

# Cell lines and primary stromal and FL cells

Tonsil stromal cells (TSC) were isolated as previously described<sup>10.25</sup> from routine tonsillectomy. SUDHL4 DLBCL and DOHH2 FL cell lines were obtained from the DSMZ cell collection. HLY1 DLBCL cell line was kindly provided by Dr F. Meggetto (CRCT, Toulouse). FL biopsies came from subjects recruited under written informed consent recovery according to the Principles of the Declaration of Helsinki and the French National Cancer Institute (INCa) ethic committee recommendations and were used to purify primary lymphoma B cells.

2021

#### Immunofluorescence staining of spheroids

After fixation, immunofluorescence was performed either *in capsulo* or on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) spheroid sections, as described in Supplemental methods. Images were acquired using a Zeiss LSM 510 meta confocal microscope (Zeiss, Göttingen) with a 25x objective (N.A 0.7) and were then processed using Fiji software.

### Cell co-culture and cell sorting

2D and 3D co-cultures were performed over 3 and 10 days, respectively before staining with mouse anti-human CD20 APC-H7 and mouse anti-human CD73 PE (e-Bioscience) and sorting of CD20<sup>pos</sup>CD73<sup>neg</sup> B cells on a FACSAria II (BD Biosciences).

#### **RNA-seq analysis**

RNA was extracted using the Nucleospin RNA XS Micro kit from Macherey Nagel (Hoerdt). Libraries were prepared using the SMARTer<sup>®</sup> Low Input RNA kit (Takara). All libraries were sequenced on an Illumina Hiseq2500 platform. Data normalization and differential gene expression were performed with the DESeq2 v1.26.0 R package. Significant genes were defined as P< 0.05 after adjustment for multiple testing by False Discovery Rate (FDR) correction and used in downstream analysis. Principal Component Analysis was visualized using the Factoextra v1.0.7 R package. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA version 4.1.0) was used for the analysis of DOHH2 and HLY1 gene expression profile (GEP) to identify the gene sets that were enriched between two conditions. Results were then compared to those obtained by comparing the GEP of purified FL B cells and purified centrocyte (Affymetrix

microarrays, purified centrocytes, GSE136248, n=5; purified FL B cells, GSE85233, n=10)<sup>26</sup> after Limma analysis with a FDR of 5% and an absolute fold change> $1.5^{12}$ .

#### **Statistical analyses**

All data were expressed as means  $\pm$  SEM. The significance of differences was calculated using the parametric ANOVA or the non-parametric U-Mann and Whitney or Wilcoxon tests, as appropriate. (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001).

#### RESULTS

#### B-NHL cell lines form cohesive spheroids in scaffold-free alginate capsules

To produce spheroids from lymphoma B-cell lines, we used the cellular capsule technology, initially developed to generate spheroids from solid cancer tumor cells<sup>22,23</sup>. Three B-NHL cell lines have been selected for encapsulation as representative models for GCB-DLBCL (SUDHL4), ABC-DLBCL (HLY1), and FL (DOHH2). From image-based analysis (N=656), the average capsule diameter was 215.9  $\pm$  1.3 µm and the capsules contained an average of 18.2  $\pm$  0.8 cells/capsule (N=48) (Figure S1). During the first 11 days, SUDHL4 and HLY1 proliferated and aggregated to form spheroids. Contrastingly, DOHH2 cells were not able to grow and form spheroids even after 17 days (Figure 1A) suggesting their requirement of a supportive microenvironment in the context of the low number of cells seeded in each individual capsule. Culture of the 3 B-NHL cell lines in limiting dilution conditions in 2D confirmed the low clonality potential of DOHH2 compared to SUDHL4 (Figure S2). However, HLY1 similarly exhibited a limited clonal activity whereas they efficiently proliferated in 3D spheroids (Figure S2). Cell survival in SUDHL4 and HLY1 spheroids was evaluated at various culture timepoints using propidium iodide

labelling. We defined as 3D confluence the stage when cells filled up the capsule and reached the internal wall of the alginate shell, and as 3D post-confluence the stage when cell growth triggered an increase of the capsule size and a decrease of alginate wall thickness (Figure S3). The percentage of dead cells remained as low as 20-30% during the first week in culture and then increased to about 60% after 8 to 12 days, as evaluated upon spheroid dissociation and flow cytometry quantification (Figure 1B). EdU staining revealed that the early stages of spheroid growth were characterized by a high proliferation rate while the post-confluent stage exhibited a significant decrease in cell proliferation concomitant with cell death increase (Figure S4). To determine whether this survival decrease was associated with the formation and growth of a dead cellular core, as observed in solid tumor spheroids<sup>27,28</sup>, we performed immunostaining for cell proliferation (Ki67) and cell death (cleaved caspase 3). Neither Ki67 nor cleaved-caspase-3 regionalization was detected prior or after 3D confluence (Figure 1C). In the same way, no hypoxic core was observed, even if HLY1 spheroids exhibited more hypoxic cells at post-confluence than SUDHL4 spheroids (Figure S5).

Interestingly, the integrity of the cell aggregates observed after confluence was maintained upon capsule dissolution (Figure 2A and movies 1 and 2), demonstrating that the capsule content was not only a confined cell suspension but rather formed truly cohesive spheroids potentially related to confinement-induced ECM secretion. We thus compared by immunofluorescence the expression of laminin and collagen I, two ECM components expressed in secondary lymphoid organs<sup>29,30</sup>, by cells maintained in suspension (2D) or in capsules (3D). SUDHL4 already expressed collagen I in 2D culture and upregulated laminin in 3D spheroids. Conversely, HLY1 displayed laminin expression in 2D and 3D cultures but increased collagen 1 in 3D

2021

spheroids (Figure 2B). These observations were confirmed by RT-qPCR, revealing the increase of both collagen I and laminin expression in the 2 cell lines in 3D compared to 2D cultures (Figure 2C). Altogether, the cellular capsule technology emerges as a valuable approach to produce cohesive lymphoma spheroids from B-NHL.

# Tumor B-cell and stromal cell co-encapsulation and self-organization promote spheroid growth

Since B-NHL are organized as mixed aggregates of tumor cells and lymphomasupportive non-malignant components<sup>8</sup>, we decided to aim for a more physiopathological model by introducing lymphoid stromal cells isolated from human tonsils (Tonsil Stromal Cells, TSC)<sup>25</sup> and ECM components (Matrigel). Lymphoma cell growth, evaluated by cell counting, was differentially regulated by the presence of ECM and stromal cells. The addition of ECM in capsules had no impact on spheroid formation whatever the cell line studied. However, the presence of ECM and stromal cells significantly increased the growth kinetic of SUDHL4 spheroids, and they even promoted DOHH2-derived spheroid formation and growth, whereas they had no impact on HLY1 spheroid growth (Figure 3A). These results suggest that our 3D model recapitulates the variability of TSC-dependence among B-cell NHL<sup>31</sup>.

We next sought to decipher how stromal cells play a supportive role on DOHH2 spheroid formation. DOHH2 cells were co-encapsulated with TSC in the presence or absence of a layer of Matrigel anchored to the inner wall of the capsules<sup>23</sup>. In the absence of Matrigel, the capsule wall remained cell-repellent and stromal cells formed clusters inside the capsules but were unable to induce DOHH2 spheroid growth (Figure 3B and C). By contrast, in the presence of Matrigel, TSC anchored

and spread onto ECM, leading to the formation of a ramified 3D network that subsequently supported B-cell proliferation (Figure 3 B-D and movies 3-4). We then monitored the stromal cell network dynamic by imaging capsules after 2, 24, 48, 72, and 96h of culture using confocal microscopy (Figure 4A). By solely focusing on stromal cells, we performed 3D+time image analysis and measured sphericity and branchness that both characterized the evolution of the stromal cell network complexity. High sphericity index indicated a compact morphology of the stromal network, thus offering a limited surface of interaction with B cells. Conversely, high branchness index was associated with a ramified network that increased the probability of B cell-stromal cell physical contacts. Stromal cell morphology was significantly modified as early as 24h after encapsulation, as revealed by the opposite variation of the sphericity and branchness indexes (Figure 4B and C). In addition, after a rapid initial change, both parameters underwent a slower but continuous evolution in the same correlated manner, indicating that the increased branching architecture of the stromal network was not a disorganized and random feature but was sustained by a self-organization process (Figure 4D).

### B-NHL sensitivity to chemotherapy in 3D vs 2D cell culture

To determine whether the 3D architecture could alter the drug response of lymphoma B cells, we evaluated the effect of doxorubicin, one of the components of the CHOP multidrug therapy, on cell death of B-NHL cell lines cultured in 2D or 3D at confluence. We revealed that the IC50 for doxorubicin increased in SUDHL4 and HLY1 cells cultured in 3D without ECM and TSC compared to 2D after 24h or 48h of treatment (Figure S6). However, no additional effect was observed in the presence of TSC (Figure 5A-C). Similar increase of resistance to doxorubicin was obtained after

treatment of DOHH2 with doxorubicin in 3D with TSC compared to 2D with TSC. This tumor-supporting activity of 3D coculture was not observed when the BCL2 inhibitor ABT-199 was used, suggesting that malignant B cells retained their dependence on BCL2 for survival in 3D+TSC conditions (Figure 5D).

Impaired diffusion of doxorubicin within the spheroids and resulting decrease in the local concentration of the drug could be the cause of its reduced anti-tumor activity in 3D. We took advantage of the fluorescent properties of doxorubicin to compare its drug penetration in cells cultured in 2D and 3D in the presence or absence of ECM and TSC. Before confluence, we observed no difference in doxorubicin staining between cells cultured in 2D versus 3D or 3D+ECM+TSC, indicating that the alginate shell did not impede drug diffusion. However, at confluence cells cultured in 3D or 3D+ECM+TSC exhibited a decrease in doxorubicin staining compared to cells in 2D (Figure 5E). Altogether, these results suggest that in these conditions of high cell density doxorubicin resistance largely relies on altered drug diffusion inside spheroids.

### Microencapsulated 3D co-cultures recapitulate features of primary FL B cells

In order to better define how 3D and TSC impacted B-NHL growth *in vitro*, we compared by RNAseq the GEP of HLY1 and DOHH2 maintained in 2D versus 3D culture with or without TSC. Unsupervised principal component analysis (PCA) nicely segregated HLY1 maintained in 2D without TSC (H2D), from HLY1 maintained in 2D without TSC (H2D), from HLY1 maintained in 2D with TSC (HT2D), and HLY1 encapsulated in 3D spheroids (Figure S7). However, HLY1 displayed a very similar GEP in 3D culture system, whatever the presence of TSC and ECM, in agreement with the complete lack of impact of TSC on HLY1 cell growth within spheroids (Figure 3A). DOHH2 maintained in 2D without (D2D) or with

(DT2D) TSC, and DOHH2 seeded in alginate spheroids with TSC and ECM (DT3D) exhibited a distinct GEP. We used GSEA to identify the molecular pathways underlying the specific gene signatures identified by DESeq2 analysis of these RNAseq data (Table S1). Concerning HLY1, the same pathways were induced by 3D culture, whatever the presence of TSC and ECM, including numerous cell signatures related to cell proliferation, together with TNF/NF-κB pathway (Figure 6A). These data were confirmed by analyzing the enrichment for transcription factor (TF) targets, identifying several TF involved in cell proliferation as more active in H3D and HT3D than in their 2D counterparts (Figure 6B). Conversely, for DOHH2, whereas culture in 3D with TSC and ECM (DT3D) upregulated cell proliferation pathways compared to 2D coculture (DT2D), this was not associated with an additional activation of NF-κB pathway that was dependent on the contact with TSC (Figure 6C). Moreover, TSC upregulated genes associated with TGF- $\beta$  signaling pathway and hypoxia as shown by the direct comparison of DT2D and D2D conditions. These data were confirmed by analyzing TF target enrichment, identifying NF- $\kappa$ B and SMAD members as activated by the contact of DOHH2 with TSC in both 2D and 3D conditions (Figure 6D). Of note, genes downregulated by TSC in DOHH2 reflected a decreased cell proliferation (Figure S8), confirming that the combination of TSC and 3D organized the best supportive niche for this FL B-cell line by triggering both proliferation and TNF/TGF $\beta$  pathways. Conversely, TSC did not trigger GEP modifications reflecting cell proliferation inhibition in HLY1 in 2D nor 3D (data not shown). To further increase the relevance of our data, we analyzed the molecular pathways activated in purified FL B cells compared to purified normal centrocytes using already published Affymetrix microarray data<sup>12,26</sup> (Figure 6E). Interestingly, TNF/NF-κB, hypoxia, and TGF $\beta$  belonged to the top pathways significantly enriched in FL GEP, as reported for

DOHH2 maintained in 3D spheroids with TSC, suggesting that our spheroid culture model mimicked at least partly, the context of FL LN.

#### Microencapsulated 3D co-cultures enable primary FL B-cell survival

A major challenge in studying primary FL B cells is to maintain them in culture long enough to perform functional experiments. Based on the data obtained with the DOHH2 cell line, we encapsulated FL B cells purified from 2 patients (FL1 and FL2) with Matrigel and TSC and compared the evolution of the B-cell number in 3D with that obtained in 2D with or without TSC. FL B cells were found admixed with stromal cells within 3D spheroids at both Day 3 and Day 14 and showed a good cell viability with less than 10 dead cells/capsule at each time point for both FL samples (Figure 7A, movies 5-6). The number of FL B cells decreased over time but after 2 weeks 3D spheroids still contained about 50% of the number of FL B cells quantified at Day 3 (FL1: D3: 127 ± 13 9. cells/capsule vs D14: 53 ± 11.4 cells/capsule; FL2: D3: 102.7 ± 19.1 cells/capsule vs D14: 47 ± 8.7 cells/capsule), while the number of TSC remained stable. Importantly, the number of FL B cells at Day 11 in 3D coculture with TSC was higher than in 2D without TSC and seemed to be even slightly higher than in 2D with TSC (Figure 7B). These observations constitute a proof-of-concept that cellular capsule technology might be a promising approach to study FL cell physiopathology in a 3D context.

### DISCUSSION

Lymphomas develop as complex cell structures including tumor cells and their microenvironment within mechanically constrained LN. Previous lymphoma spheroid models incorporating only malignant B cells<sup>17,18,32</sup> suggest that the 3D cell

architecture is a key feature for the regulation of lymphoma growth and therapeutic response. LN are highly dynamic structures expanding and becoming mechanically stiff under immune cell recruitment and proliferation, whereas immune response resolution is associated with LN contraction and return to a baseline of mechanical softness<sup>33</sup>. LN mechanical properties rely on several determinants including the external constraint of the capsule and the internal tension created by the TSC network able to produce and contract ECM. Mechanosensing has been recently demonstrated to control T-cell activation and metabolism<sup>34</sup> and mechanical forces are involved in both TCR<sup>35</sup> and BCR<sup>36</sup> signaling. Mouse models of FL and DLBCL cannot entirely recapitulate the biology of these tumors<sup>37</sup> and, due to their inherent complexity and cost, they are not suitable to study specific cell interactions contributing to the organization of lymphoma cell niche or to perform drug screening. The development of 3D lymphoma models including mechanical constraints is therefore of particular relevance to advance the understanding and treatment of these neoplasia. In the present work, we adapted a microfluidic approach to recapitulate the lymphoma microenvironment in hollow, permeable alginate shells, forming high-throughput (~5000/s), size-controlled, and easy to handle spheroids<sup>22</sup>. Such a strategy is ideally suited for drug testing and the versatility of the technique allows generating 3D monocultures (i.e. from tumor B cells only) or co-cultures and to evaluate the impact of ECM.

First, the proliferation of malignant B cells alone within spheroids results in cohesive multicellular aggregates promoted by the over-secretion of ECM in 3D compared to 2D cultures. Although expression and secretion of ECM have been mainly described in stromal cells, we demonstrated here that lymphoma B cells display a similar ability, as already proposed for normal plasmablasts<sup>38</sup> and plasma cells<sup>39</sup>, or leukemic B

cells<sup>40</sup>. How ECM expression is regulated remains unclear. We could however hypothesize that it may originate from the activation of a mechanotransduction pathway as already described in other cell types<sup>41,42</sup>. Remarkably, alginate capsules are elastic, meaning that cell growth past confluence dilates the capsule, which conversely applies a compressive force onto the spheroid<sup>22</sup>. Although not investigated in depth, we observed that the cohesion of spheroids was stronger for post-confluent capsules, which would support this mechanotransduction hypothesis. Second, as previously reported using other 3D models, some B-cell lines were unable to grow and form spheroids when maintained alone in capsules, reproducing the strong dependency of FL on their niche for survival and growth. Guided by our previous studies showing that lymphoid-like stromal cells have a supportive effect on FL B cells<sup>10,25,43</sup>, we added TSC to generate hybrid stroma-tumor 3D lymphoma models. Interestingly, our 3D model reproduced the different levels of NHL microenvironment dependency, mimicking the biology of aggressive versus indolent lymphomas<sup>7</sup>. By contrast with other 3D culture approaches that consist in embedding cells in an ECM scaffold<sup>17,19,44,45</sup>, our alginate spheroid model allows cell motions and interactions, leading to an early self-organization of a stroma-tumor B cell network that could organize localized 3D niches promoting cell interactions within the spheroids.

The 3D-induced drug resistance has been already reported in solid cancers and hematological malignancies<sup>17,19,46</sup>. We confirmed here that the sensitivity to doxorubicin dramatically dropped when cells were cultured in 3D compared to 2D in all investigated B-NHL cell lines. The lack of doxorubicin effect in 3D was at least partly due to a diffusion impairment of the drug caused by the high cell density and ECM secretion in late spheroids and acting as a barrier to drug diffusion. This mimics

what is known in tumors where not all the cancer cells are exposed to the same concentration of drugs because of poor drug diffusion through the ECM<sup>47</sup> causing the tumor to relapse or develop drug resistance. By contrast, the pro-apoptotic activity of ABT-199, mediating the dissociation of BCL2 with the proapoptotic BH3 only proteins, was maintained in 3D co-cultures. This could be attributed to the ability of ABT-199 to induce apoptosis, thus creating channels for drug diffusion inside spheroids, suggesting that ABT-199 could be efficient in patients. Although, the results of the phase 2 CONTRALTO study48 did not demonstrate a clear benefit of venetoclax addition to bendamustine and Rituximab, clinical studies have to be pursued by optimizing the dosage of venetoclax and better selecting patients according to their molecular profiles, as it was recently done in the phase 2 CAVALLI clinical trial in DLBCL<sup>49</sup>. Finally, recent preliminary data concerning the combination of venetoclax with ibrutinib in relapsed or refractory FL seem promising<sup>50</sup>. More generally, the cellular capsule technology adapted for lymphoma 3D culture seems a useful high-throughput platform to screen new therapeutic approaches in B-NHL, taking into account the dynamic crosstalk between tumor cells and their supportive microenvironment.

Interestingly, a thorough analysis of malignant B cell GEP revealed a complementary effect of TSC and 3D culture on the growth of DOHH2 cell line. Whereas we cannot examine the direct impact of 3D constraint alone on DOHH2, it was shown to trigger a massive activation of cell proliferation pathways in HLY1. Conversely, TSC reduced expression of TF and gene pathways associated with cell cycle progression in DOHH2, a suppressive activity already reported in coculture of B-cell NHL with bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSC)<sup>51</sup>. However, TSC activated the NF- $\kappa$ B pathway, a process previously involved with the anti-apoptotic activity of BM-MSC on

2021

primary lymphoma B cells<sup>52,53</sup> and that could be required in 3D conditions, when very few cells were encapsulated in each spheroid. As a whole, the combination of 3D and TSC triggered a GEP close to that of primary FL B cells in the DOHH2 cell line, including in particular a deregulation of TNF/NF- $\kappa$ B, hypoxia, and TGF- $\beta$ /SMAD. Whereas cell-intrinsic or TME-dependent NF-kB activation is a well-described hallmark of B-NHL, FL tumor niche GEP was only recently found enriched for gene networks related to TGF $\beta$  signaling<sup>54</sup>. Moreover, TGF $\beta$  could contribute to the priming by FL B cells of BM-MSC and LN stromal cells into tumor-supportive stromal niche<sup>12,55</sup>. Finally, one study describes an upregulation and an activation of SMAD1 in malignant FL B cells<sup>56</sup> suggesting that TGF- $\beta$  signaling could play a major role in the interplay between B cells and stromal cells in FL. How TSC are phenotypically and functionally remodeled by malignant B cells during 3D coculture remains to be explored. This proximity between DOHH2 co-cultured with TSC in 3D and FL B cells prompted us to evaluate whether our spheroid model could allow the survival of primary lymphoma cells. Interestingly, we demonstrated for the first time that purified FL B cells could be maintained in vitro in 3D conditions, in a model allowing highthroughput drug testing and follow-up of cell behavior and phenotypic evolution.

# DATA ACCESSIBILITY

RNA-seq data are accessible on GEO database under the accession number GSE178935.

# ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM, University of Bordeaux, Ligue Régionale contre le Cancer (comités de Gironde, Charentes, Pyrénées, Landes), the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (Grant PGA1 RF20170205386), the Institut National du cancer (INCA AAP PNP-19-009), Emergence GSO Cancéropole, and SIRIC BRIO. S.L. is supported by Ligue Nationale contre le Cancer and C.L. is a recipient of a doctoral fellowship from the FHU CAMIn and LBB (Léa Broca-Brisson) of a master fellowship from CNRS GDR Imabio. J.S.V. is funded by the Infrastructure eCellFrance (ANR-11-INSB-005). The 3D capsules were obtained from the VoxCell Organoïds Plateform, a service of the CNRS-INSERM and Bordeaux University -UMS TBMCore 3427. We thank Stéphanie Durand-Panteix for her technical support with transduction experiments. We thank Atika Zouine and Vincent Pitard for technical assistance at the Flow cytometry facility, CNRS UMS 3427, INSERM US 005, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France. We acknowledge the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France Biolmaging supported by the French Research Agency (ANR-10-INBS-04). Cell sorting was performed at the Biosit Flow Cytometry and Cell Sorting Facility CytomeTRI (UMS 6480 Biosit, Rennes, France). High-throughput sequencing has been performed by the ICGex NGS platform of the Institut Curie supported by the grants ANR-10-EQPX-03 (Equipex) and ANR-10-INBS-09-08 (France Génomique Consortium) from the ANR, by the ITMO-CANCER,

and by the SiRIC-Curie program (SiRIC Grant INCa-DGOS-4654). The authors are indebted to the Centre de Ressources Biologiques (CRB)-Santé (BB-0033-00056) of Rennes hospital for the processing of biological samples.

# AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

LBB (Laurence Bresson-Bepoldin), KT, PN, FM and GR designed the research, supervised the study and wrote the paper. CL, SL, VLM, FM, and LBB (Laurence Bresson-Bepoldin) performed experiments, analyzed the data and wrote the paper. NH, CM, IM, CD, LBB (Lea Broca-Brisson), CP, MS, MC, LA, GR, LD, and KA performed experiments. PS and JPM gave insightful advice and participated in the conduction of the study. SB and PL performed RNA-seq. JSV analyzed RNA-seq data.

# CONFLICT-OF-INTEREST DISCLOSURE

Authors have no competing interests to declare.

# REFERENCES

- Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *British Journal of Cancer.* 2011;105(11):1684–1692.
- Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, et al. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2016;66(6):443–459.
- 3. Huet S, Sujobert P, Salles G. From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(4):224–239.
- 4. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503–511.
- Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015;125:22–32.
- Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat.Rev.Cancer*. 2001;1:46– 54.
- Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. Nature Reviews Cancer. 2014;14(8):517–534.
- 8. Verdière L, Mourcin F, Tarte K. Microenvironment signaling driving lymphomagenesis. *Current Opinion in Hematology*. 2018;25(4):335–345.
- Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N.Engl.J.Med.* 2004;351:2159–2169.
- Guilloton F, Caron G, Menard C, et al. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood*. 2012;119:2556–2567.

- 11. Pandey S, Mourcin F, Marchand T, et al. IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood*. 2017;129(18):2507–2518.
- 12. Mourcin F, Verdière L, Roulois D, et al. Follicular lymphoma triggers phenotypic and functional remodeling of the human lymphoid stromal cell landscape. *Immunity*. 2021; doi: 10.1016/j.immuni.2021.05.019
- 13. Fowler NH, Cheah CY, Gascoyne RD, et al. Role of the tumor microenvironment in mature B-cell lymphoid malignancies. *Haematologica*. 2016;101:531–540.
- 14. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N.Engl.J.Med.* 2008;359:2313–2323.
- 15. Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*. 2016;165(7):1586–1597.
- Decaup E, Rossi C, Gravelle P, et al. A Tridimensional Model for NK Cell-Mediated ADCC of Follicular Lymphoma. *Front. Immunol.* 2019;10:1943.
- Gravelle P, Jean C, Familiades J, et al. Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in follicular lymphoma. *Am. J. Pathol.* 2014;184(1):282–295.
- Gava F, Faria C, Gravelle P, et al. 3D Model Characterization by 2D and 3D Imaging in t(14;18)-Positive B-NHL: Perspectives for In Vitro Drug Screens in Follicular Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1490.
- 19. Tian YF, Ahn H, Schneider RS, et al. Integrin-specific hydrogels as adaptable tumor organoids for malignant B and T cells. *Biomaterials*. 2015;73:110–119.
- 20. Mannino RG, Pradhan P, Roy K, Lam WA. 3D in vitro microvascular model-based lymphoma model. *Methods in Cell Biology*. 2018;146:149–158.
- Foxall R, Narang P, Glaysher B, et al. Developing a 3D B Cell Lymphoma Culture System to Model Antibody Therapy. *Front Immunol*. 2020;11:605231.

- 22. Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2013;110:14843–14848.
- 23. Alessandri K, Feyeux M, Gurchenkov B, et al. A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). *Lab Chip.* 2016;16:1593–1604.
- Doméjean H, Pierre M de la MS, Funfak A, et al. Controlled production of submillimeter liquid core hydrogel capsules for parallelized 3D cell culture. *Lab Chip*. 2016;17(1):110–119.
- 25. Ame-Thomas P, Maby-El HH, Monvoisin C, et al. 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*. 2007;109:693–702.
- Desmots F, Roussel M, Pangault C, et al. Pan-HDAC Inhibitors Restore PRDM1 Response to IL21 in CREBBP-Mutated Follicular Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2019;25(2):735–746.
- Däster S, Amatruda N, Calabrese D, et al. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget*. 2016;8(1):1725–1736.
- Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*. 1988;240(4849):177–184.
- 29. Chen J, Alexander JS, Orr AW. Integrins and Their Extracellular Matrix Ligands in Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis. *Int J Cell Biol*. 2012;2012: 853703.

- 30. Sobocinski GP, Toy K, Bobrowski WF, et al. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins of the lymph node cortex: evidence supporting the reticular network as a pathway for lymphocyte migration. *BMC Immunol*. 2010;11:42.
- 31. Ciavarella S, Vegliante MC, Fabbri M, et al. Dissection of DLBCL microenvironment provides a gene expression-based predictor of survival applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Annals of Oncology*. 2018;29(12):2363–2370.
- 32. Decaup E, Jean C, Laurent C, et al. Anti-tumor activity of obinutuzumab and rituximab in a follicular lymphoma 3D model. *Blood Cancer J*. 2013;3:e131.
- Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K. Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15(6):350–361.
- 34. Meng KP, Majedi FS, Thauland TJ, Butte MJ. Mechanosensing through YAP controls T cell activation and metabolism. *Journal of Experimental Medicine*. 2020;217(8):e20200053.
- Hu KH, Butte MJ. T cell activation requires force generation. The Journal of cell biology. 2016;213(5):535–542.
- Apoorva F, Loiben AM, Shah SB, et al. How Biophysical Forces Regulate Human B Cell Lymphomas. *Cell Reports*. 2018;23(2):499–511.
- 37. Ramezani-Rad P, Rickert RC. Murine models of germinal center derivedlymphomas. *Current Opinion in Immunology*. 2017;45:31–36.
- 38. Della-Torre E, Rigamonti E, Perugino C, et al. B lymphocytes directly contribute to tissue fibrosis in patients with IgG4-related disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;145(3):968-981.

- 39. Tancred TM, Belch AR, Reiman T, Pilarski LM, Kirshner J. Altered Expression of Fibronectin and Collagens I and IV in Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(3):239–247.
- 40. Mikaelsson E, Danesh-Manesh AH, Lüppert A, et al. Fibromodulin, an extracellular matrix protein: characterization of its unique gene and protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Blood*. 2005;105(12):4828–4835.
- Coplen DE, Macarak EJ, Howard PS. Matrix synthesis by bladder smooth muscle cells is modulated by stretch frequency. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal.* 2003;39(3):157–162.
- 42. He Y, Macarak EJ, Korostoff JM, Howard PS. Compression and Tension: Differential Effects on Matrix Accumulation by Periodontal Ligament Fibroblasts In Vitro. Connective Tissue Research. 2004;45(1):28–39.
- Gallouet AS, Travert M, Bresson-Bepoldin L, et al. COX-2-independent effects of celecoxib sensitize lymphoma B cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Clin.Cancer Res.* 2014;20:2663–2673.
- 44. Purwada A, Jaiswal MK, Ahn H, et al. Ex vivo engineered immune organoids for controlled germinal center reactions. *Biomaterials*. 2015;63:24–34.
- 45. Sabhachandani P, Sarkar S, Mckenney S, et al. Microfluidic assembly of hydrogel-based immunogenic tumor spheroids for evaluation of anticancer therapies and biomarker release. *Journal of Controlled Release*. 2019;295:21–30.
- 46. Desoize B. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2000;36(2–3):193–207.

- 47. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat.Rev.Cancer*. 2006;6:583–592.
- 48. Zinzani PL, Flinn IW, Yuen SLS, et al. Venetoclax-rituximab with or without bendamustine vs bendamustine-rituximab in relapsed/refractory follicular lymphoma. *Blood*. 2020;136(23):2628–2637.
- Morschhauser F, Feugier P, Flinn IW, et al. A phase 2 study of venetoclax plus R-CHOP as first-line treatment for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2021;137(5):600–609.
- 50. Ujjani CS, Lai C, Leslie LA, et al. Ibrutinib and venetoclax in relapsed and refractory follicular lymphoma. *Blood*. 2020;136 (supplement 1): 46-47.
- 51. Lwin T, Hazlehurst LA, Dessureault S, et al. Cell adhesion induces p27Kip1associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Blood*. 2007;110(5):1631–1638.
- 52. Lwin T, Hazlehurst LA, Li Z, et al. Bone marrow stromal cells prevent apoptosis of lymphoma cells by upregulation of anti-apoptotic proteins associated with activation of NF-kappaB (RelB/p52) in non-Hodgkin's lymphoma cells. *Leukemia*. 2007;21(7):1521–1531.
- 53. Medina DJ, Goodell L, Glod J, et al. Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor κB pathways. *Haematologica*. 2012;97(8):1255–1263.
- 54. Pangault C, Amé-Thomas P, Rossille D, et al. Integrative Analysis of Cell Crosstalk within Follicular Lymphoma Cell Niche: Towards a Definition of the FL Supportive Synapse. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):2865.

- 55. Dumontet E, Pangault C, Roulois D, et al. Extracellular vesicles shed by follicular lymphoma B cells promote the polarization of bone marrow stromal cell niche. *Blood.* 2021;138(1): 57–70.
- 56. Munoz O, Fend F, de Beaumont R, et al. TGFbeta-mediated activation of Smad1 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma and effect on cell proliferation. *Leukemia*. 2004;18(12):2015–2025.

# **FIGURE LEGENDS**

### Figure 1: B NHL spheroids obtained by using the cellular capsule technology.

**A:** Representative images of cell growth in alginate capsule shells over time for the various cell lines. Scale bar: 100μm. **B:** Percentage of SUDHL4 and HLY1 cell death measured after shell dissolution and spheroid dissociation at 6, 8 and 12 days after encapsulation. To evaluate cell death, propidium iodide (PI) (10µg/mL) was added to the cell suspension and PI fluorescence was analyzed by flow cytometry (n=3). **C**: Immunostaining showing the repartition of proliferating and apoptotic cells in SUDHL4 and HLY1-derived spheroids at 8 or 12 days post-encapsulation. Five micrometers thick sections were stained with anti-Ki67 (Ki67, in green), and anti-cleaved caspase 3 (CC3, in red), to identify proliferating and dead cells, respectively. Nuclei are depicted in blue. Scale bar: 100μm.

#### Figure 2: B NHL spheroids are cohesive and express extracellular matrix.

**A:** Pictures showing the maintenance of SUDHL4 and HLY1 spheroids after capsule dissolution by incubation in PBS containing 1 mM EGTA. Scale bar: 100µm. **B:** Immunostaining showing the expression of extracellular matrix in cells cultured in suspension (2D) or in spheroids (3D). Extracellular matrix components were visualized by staining with anti-pan laminin, and anti- collagen I antibodies on 5µm thick sections of spheroids embedded in paraffin. Nuclei are depicted in blue. Scale bar: 50µm. **C:** RT-qPCR revealing the up-regulation of Laminin and Collagen I expression in SUDHL4 and HLY1 cultured in 3D compared to 2D (n=3).

Figure 3: The establishment of a stromal network is necessary to reproduce stromal-dependent B NHL cell growth.

A: Effect of Matrigel (Mg) and TSC on spheroid growth. Left panel, representative images of spheroids obtained from B cells encapsulated alone (noted 3D) or with Mg (noted 3D+Mg) or with Mg+TSC (noted 3D+Mg+TSC) at D7 (HLY1), D6 (SUDHL4) or D10 (DOHH2) of culture. Scale bar: 200µm. Right panel, the B cell number was evaluated over time in the different conditions (n=3). B: TSC network needs Mg to be established. Left, example of GFP-TSC encapsulated without Mg and B-cells. Right, example of TSC encapsulated with Mg but without B-cells. TSC were visualized in green by stable expression of GFP and nuclei were stained in blue with Hoechst 33252. Capsules were imaged 3 days after encapsulation. Images were maximum intensity projection from z-stacks. Scale bar: 100µm. C: TSC network is necessary to induce DOHH2 spheroid growth. DOHH2 were co-encapsulated with TSC-GFP with or without Mg for 10 days. TSC were visualized in green by stable expression of GFP. D: TSC/Mg interaction. GFP-TSC were encapsulated alone in the presence of Mg. After 3 days in culture, capsules were fixed and immunofluorescence was performed. Mg and TSC were visualized by staining with anti-human pan laminin (in red) and anti-GFP (in green), respectively. Nuclei were counterstained in blue with Hoechst 33258. Images were maximum intensity projection from z-stacks. Scale bar: 50µm. Yellow square is a crop showing the anchoring of TSC on Mg coating. Scale bar: 10µm.

### Figure 4: Self-organization of the stromal network.

**A:** Representatives images of capsules containing DOHH2 with Mg and TSC at different culture time point. After fixation, 10 to 18 spheroids for each time point were placed in an Universide. Images shown are Z-projection. TSC are shown in green and all the analyses were performed on green signal exclusively. Nuclei of DOHH2

and TSC cells were counterstained in blue with Hoechst 33258. The edge of the capsule aredepicted by white dashed lines. Scale bar: 50µm. **B** and **C**: Sphericity and branchness indexes of green particles contained in spheroids at different times after encapsulation, respectively. To determine significant differences, Anova was performed (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001). **D**: Correlation of sphericity and branchness. For each time point, small dots represent individual spheroids whereas big dots represent the average values of all spheroids for a given time point. Pearson correlation coefficient (R) was calculated using R software. The black line represents the regression line and the grey area represents the 95% confidence interval of the linear regression.

#### Figure 5: Impact of 3D culture on drug response in B-NHL.

**A-C:** Comparison of B cell death induced by doxorubicin in SUDHL4 (**A**), HLY1 (**B**) and DOHH2 (**C**) cultured in 2D or in 3D alone (*upper panel*) or with TSC and Matrigel (2D+TSC or 3D+Mg+TSC) (*lower panel*). For 2D culture, B cells were seeded alone or in presence of TSC. For 3D culture, 100 confluent capsules, containing B cells alone or B cells with TSC in presence of Matrigel, were seeded. 2D and 3D cultures were exposed to doxorubicin at a concentration corresponding to its IC50 and GFP<sup>neg</sup> B cell death was evaluated after 24h by flow cytometry. **D:** Comparison of cell death induced by ABT-199 (1μM) in DOHH2 cells cultured in 2D alone (*upper panel*) or in 2D+TSC or 3D+TSC+Matrigel (*lower panel*) at confluency, for 24h. The data represent mean ± SE of, at least, three independent experiments (Wilcoxon test. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001). **E:** Doxorubicin diffusion in spheroids. Flow cytometry analyses of doxorubicin fluorescence in cells cultured in suspension (2D) or in 3D alone (3D) or in 3D with matrigel and TSC (3D + Mg+TSC) before

confluence (D4) or at confluence (D9-D10) and treated with  $1\mu$ g/ml doxorubicin for 4h. Numbers represent the median fluorescence intensity of cells.

# Figure 6: Phenotypic characterization of DOHH2 and HLY1 in the 3D co-culture model.

**A:** The H3D (HLY1 in 3D) vs H2D (HLY1 in 2D), HT3D (HLY1 in 3D with TSC) vs H2D (HLY1 in 2D), and HT3D vs HT2D (HLY1 in 2D with TSC) gene signatures were analyzed by GSEA using HallMark MSigDB database. **B:** Enrichment of transcription factor (TF) targets in HLY1 signatures as determined using TRRUST database with EnrichR website. Represented are the 10 more significant predicted TF. **C:** The DT2D (DOHH2 in 2D with TSC) vs D2D (DOHH2 in 2D with TSC), DT3D (DOHH2 in 3D with TSC) vs D2D (DOHH2 in 2D), and DT3D vs DT2D gene signatures were analyzed by GSEA using HallMark MSigDB database. **D:** Enrichment of TF targets in DOHH2 signatures as determined using TRRUST database with EnrichR website. Represented are the 10 more significant predicted TF. **E:** Upregulated gene pathways identified by GSEA using in HallMark MSigDB database in FL B cells vs centrocytes based on Affymetrix microarray data. Represented are the 10 more significant predicted pathways.

# Figure 7: Primary FL cell survival in cellular capsules.

**A:** Imaging of purified FL B cells co-encapsulated with TSC after 3 days (a and c) and 14 days (b and d) of encapsulation (b and d). Multicolor live/dead (CaleinRed/NucRed Dead) imaging of patient B cells with GFP-TSC and nuclei counterstaining with Hoechst were depicted in *a-b*. Spheroids were imaged on spinning disk microscope (Aa) and on a confocal microscope (Ab) with equivalent

settings (spectral windows and physical dimensions). Individual channels are depicted on the top, overlays of NucRed Dead and Calcein Red and of Hoechst and GFP on the lower panels. *c and d*. Individual cell analysis for each case. Renderings of nuclei centers projected in 2D as colored spheres (FL B: blue, TSC: green, Dead cells: red). Three capsules of each FL type were counted and averaged counting after 3 days in culture (c) and after 14 days (d) were plotted. **B:** Evolution of the number of primary FL B cells cultured in suspension or in capsules. Cells were cultured in suspension alone or with GFP-TSC or in capsules with matrigel and GFP-TSC for various duration. The GFP<sup>neg</sup> FL B cell number was determined by flow cytometry with count beads, after trypsinization of cells or caspule dissolution and Hoechst 33258 staining for gating on live cells.



# Figure 2



# Figure 3



Figure 4 Α 2h 24h 48h 72h 96h TSC Dapi TSC/Dapi С В D 0.45 R= -0.92, p<2.2 e<sup>-16</sup> 0.5 4.0 0.40 Branchness <sup>5.2</sup> <sup>5.2</sup> Sphericity 0.3 Sphericity 0.30-0.4 Time 202 2h24h • 48h 0.25 2.0 72h 🥚 96h 0.2 0.20-2h 24h 48h 72h 96h 2h 24h 48h 72h 96h 2.0 2.5 3.0 3.5 Time Branchness Time


# Figure 6



-log10(AdjPval)

Figure 7



Supplemental materials

# A novel 3D culture model recapitulates primary FL B cell features and promotes their survival

By Lamaison C et al.

# SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

## **Reagents and antibodies**

Alginic acid sodium salt from brown algae, D-Sorbitol, CaCl<sub>2</sub> hexahydrate, EGTA, and paraformaldehyde were supplied by Merck (Fontenay-sous-Bois, France). Matrigel was provided by Corning (UGAP, France). Propidium iodide, Phalloidin-Alexa 594, Fixable Viability Dye eFluor 506, calcein red-AM and NucRed Dead were from Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France). Hoechst 33258 and ABT-199 were purchased from Tocris Bioscience (Lille, France). The comprehensive cancer center pharmacy department of the Institut Bergonié kindly provided doxorubicin. Hypoxyprobe-1 Times Kit was supplied by Euromedex (Souffelweyersheim, France). Celltiter-Glo 2.0 luminescent cell viability assay was from Promega (Charbonnières-les-bains, France). APC Annexin V. mouse anti-human CD20-PE and mouse anti-human CD19-BV421 were supplied by BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Rabbit polyclonal antilaminin, rabbit monoclonal anti-human collagen I and chicken polyclonal anti-GFP antibodies were supplied by Abcam (Paris, France). Mouse anti-human CD20 APC-H7 and mouse anti-human CD73 PE were from eBiosciences (Thermo Fisher Scientific). Monoclonal mouse anti-human Ki67 was from Dako Agilent Technologies (Les Ulis, France) and rabbit polyclonal anti-cleaved caspase 3 antibody was provided by Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Cyr l'école, France). All Alexa-conjugated secondary antibodies were purchased from Thermo Fisher Scientific.

# Cells

Stromal cells (TSC) were isolated as previously described<sup>1,2</sup> from human tonsils collected from children undergoing routine tonsillectomy, considered as chirurgical wastes. GFP-expressing TSC cells were established after transduction with lentivirus carrying the pUltra (gift from Malcolm Moore (Addgene plasmid # 24129; http://n2t.net/addgene:24129; RRID: Addgene\_24129), which contained the enhanced

GFP gene under the control of Ubc promoter and produced as previously described<sup>3</sup>. TSC were transduced in RPMI (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 2% FBS (Dutscher, Brumath, France) containing pUltra concentrated lentiviral supernatant at a MOI of 4. After 24 hours, the medium was replaced with standard culture medium. After one week, eGFPhi TSC were isolated using a cell sorter (FACS Aria, BD Biosciences). For all experiments, TSC and GFP-TSC were used from passage 9 (P9) to P13. SUDHL4 and DOHH2 cell lines were obtained from the DSMZ cell collection (Braunschweig, Germany). HLY1 cell line was kindly provided by Dr F. Meggetto (CRCT, Toulouse, France). Cells were routinely cultured in RPMI supplemented with 10% FBS under humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, with medium changed 3 times a week. One day prior to encapsulation, cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS. Once cellular capsules were formed following the protocol described below, they were cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks in DMEM supplemented with 10% FBS, with medium changed 2 times a week. Depending on the type of experiments, capsules were sampled and transferred to dedicated culture supports for imaging, or treated in bulk conditions and subsequently analyzed.

# **Limiting Dilution Assay**

B cell lines (HLY1, DOHH2, SUDHL4) were seeded as 10, 3, and 1 cell per well in 96 wells (n=3), and at 0.1 cell per well in 192 wells (n=3) and were cultured for 21 days before counting of positive wells. Results were statistically evaluated using the Extreme Limiting Dilution Analysis (ELDA) method<sup>4</sup>.

## Encapsulation procedure

Cell encapsulation was performed by adapting already published protocols<sup>5–7</sup>. Briefly, the microfluidic device was printed with EnvisionTEC Micro Hi-Res Plus 3D printer (Arketyp3D, Le Raincy, France) using the resin HTM140V2 (EnvisionTEC), with the following printing parameters: burn-in range thickness 400µm, base plate of 300µm, and exposure time 3000ms. The printed device was washed using propanol and air-dried. In parallel, a glass capillary was pulled using a micropipette puller (P30, Sutter Instrument, Micro Mecanique SAS, Saint Germain en Laye, France), then cut and polished with micro-abrasive films (1µm grain, 3M) to reach the desired tip diameter (typically between 130 and 180 µm). This glass tip, which serves as a nozzle for the encapsulation device, was hydrophobized (1H,1H,2H,2H-

Perfluorooctyltrimethoxysillane, ABCR) following standard protocols<sup>8</sup> and glued to the exit of the microfluidic plastic device with epoxyglue EA M-31CL (Loctite).

To run an encapsulation, the microfluidic device was connected to three syringes (10MDR-LL-GT SGE, Analytical Science, Milton Keynes, UK) mounted on pumps (Nemesys, Cetoni GmbH, Korbussen, Germany) for flow rate control. Three different solutions were injected into the three coaxial cones of the device. The outermost cone contained the alginate solution, which was prepared by dissolving 2% wt/vol sodium alginate (Protanal LF200S) in water and by adding 0.5mM SDS surfactant (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). The solution was filtered at 1µm (glass filters, Pall Life Science) and stored at 4 °C. The intermediate cone contained a 300 mM sorbitol (Merck) solution. The innermost cone contained cells suspended in a sorbitol solution or cells/Matrigel/sorbitol solution (when ECM is needed) in a ratio of 2:1:2 (v/v). For encapsulation of lymphoma cell lines or stromal cells only (monoculture), a suspension of 2x10<sup>6</sup> cells were resuspended in culture DMEM (Thermo Fisher Scientific). 200µL of the cell suspension was injected into a cooling part to maintain Matrigel liquid. The flow rates were set to 45mL/h, 45mL/h and 30mL/h for the alginate, sorbitol, and cell suspension, respectively. The device was positioned 40-50 cm above a petri dish containing 100mM CaCl<sub>2</sub> solution for capsule gelling and collection. To improve capsule shape and monodispersity, an alginate charging part and copper ring (21mm OD, RadioSpares), both connected to a high voltage (2 kV) generator (Stanford Research PS350, Acal BFI, France) were introduced7. The charged formed droplets passing through the copper ring under electrical tension get deflected as they crossed the ring, creating a splay-like jet that prevented capsule coalescence. Once formed inside the calcium bath, capsules were washed with DMEM and transferred to cell culture medium.

## Determination of cell confluence in capsule

Capsules containing cells were imaged on brightfield at different timepoints after encapsulation. The diameter of the capsule and the thickness of the alginate walls were then measured manually by image analysis using ImageJ software on more than 100 capsules per time point. The diameter and wall thickness were plotted over time and allowed the determination of the confluence and post confluence periods. Confluence was reached when the alginate wall thickness decreased and the capsule diameter increased, but that roundness of cells was still visible. Post-confluence was

reached when the alginate wall thickness was to its minimum and the capsule diameter to its maximum with cell roundness no more visible.

#### Spheroid growth measurement

At various post-encapsulation culture times, we selected 200 capsules in each 3D culture conditions. Capsules were dissolved by incubation in PBS containing 1 mM EGTA and the spheroids were mechanically dissociated by pipetting. When spheroids were too cohesive, trypsin-EDTA was added to improve cell dissociation. The cell suspension was centrifuged and re-suspended in 200  $\mu$ L of PBS and 50  $\mu$ L of Precision Count Beads (BioLegend, Ozyme). The number of cells was then determined in a given cell suspension volume of 100  $\mu$ L using flow cytometry (FACS Calibur, BD biosciences) according to the manufacturer instructions after GFP-stromal cell backgating when necessary. To evaluate the cell death in spheroids, propidium iodide (PI) (10  $\mu$ g/mL) was added to the cell suspension and PI fluorescence was analyzed by flow cytometry using Cell Quest or FlowJo (BD biosciences).

#### Immunostaining of spheroids

#### In capsulo staining

Capsules were fixed in DMEM w/o phenol red (Pan Biotech, Dutscher), containing 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature (RT). After rinsing, capsules were incubated for 30 min in DMEM w/o phenol red/ 0.1% triton X-100. Following a step of saturation with a solution containing DMEM w/o phenol red/ BSA 1% /FBS 2% for 1h at RT, capsules were incubated with primary antibody overnight at 4°C under shaking. Primary antibody was revealed by incubation of capsules with secondary Alexa-coupled antibody for 2h at RT. Nuclei were stained by incubation of capsules with Hoechst 33258 for 30 min at RT. To determine the role of Matrigel in the stromal network establishment, immunofluorescence using a rabbit anti-human pan laminin antibody revealed by goat anti rabbit Alexa 633 secondary antibody, was performed to visualize Matrigel, stromal cells were GFP positive and nuclei was stained with Hoechst 3258. Z-stacks were acquired using a Zeiss LSM 510 meta confocal microscope with a 25x objective (N.A 0.7). 3D rendering was obtained using UCSF Chimera software (RBVI, San Francisco, USA).

# FFPE staining

To analyze protein expression inside spheroids, immunofluorescence on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) spheroids sections (3-5 µm thick) were performed. Alginate shells were dissolved and spheroids were fixed as described above. Spheroids were then pre-embedded in 2% agarose and further embedded in a paraffin block. Immunofluorescence staining was then performed as previously described<sup>9</sup>. Images were acquired using a Zeiss LSM 510 meta confocal microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) with a 25x objective (N.A 0.7). Then images obtained were processed using Fiji.

## Hypoxia detection in spheroids

To determine hypoxia in spheroids, hypoxyprobe-1 100 times kit (HPI, Euromedex) was used. Briefly, spheroids at confluence or post-confluence were incubated for 2h with 200µM pimonidazole. Spheroids were then fixed and embedded in paraffin. Pimonidazole immunostaining was performed on spheroid sections according to the supplier recommendations. Images were acquired using a Nikon ECLIPSE Ci-L equipped with a Nikon DS-Ri2 camera controlled by NIS-Element software (Nikon-Ci, version BR 4.50.00) (Nikon, Champigny sur Marne, France).

## 3D cell morphology quantification

Capsules were fixed at various post-encapsulation culture times and each capsule was placed in an agarose well of the Universide microscopy chamber<sup>9</sup>, which allowed immobilization of the capsules as required for stable z-stack acquisition and medium throughput 3D imaging. Cell nuclei were stained with Hoechst 33258 and stromal cells were visualized by GFP expression. Images were acquired using a Leica SP8 confocal microscope with a 20X dry objective (NA 0.7). To measure the evolution of TSC complexity over time two parameters were measured: the sphericity defined as

obtain these values, we applied a locally adjusted threshold to the green signal, performed 3D segmentation (3D suite plugin, Fiji<sup>10</sup>). For the two parameters, the values of all "particles" contained in one capsule were averaged. Thus, each capsule was characterized by one mean value for sphericity and branchness and 10-18 capsules were analyzed per time point.

 $<sup>\</sup>sqrt[3]{\frac{36 \times \pi \times Volume of particle^2}{Surface of particle^3}} and the branchness defined as \frac{Volume of particule convex hull}{Volume of particule}. To$ 

#### Cell co-culture and cell sorting:

2D co-cultures were performed over 3 days.  $3 \times 10^5$  DOHH2 ( $1.5 \times 10^5$ /mL) were plated on  $5 \times 10^4$  TSC /cm<sup>2</sup> in 6 well plates. For cell sorting, cells were trypsinized (Thermo Fisher Scientific) for 12 min at 37°C and washed with DMEM 10% FBS. 3D co-cultures were performed over 10 days. For cell sorting, after dissolution of the alginate shells, cells were rinsed with DMEM 10% FBS and centrifuged for 7 min at 1700 rpm, incubated with trypsin at 37°C for 15 min, and rinsed with medium DMEM 10% FBS. Cells were stained for 20 min on ice with mouse anti-human CD20 APC-H7 and mouse anti-human CD73 PE. After DAPI staining, cell sorting was processed by a FACS Aria II (BD Biosciences).

#### RNA-seq analysis

RNA was extracted from CD20<sup>pos</sup>CD73<sup>neg</sup> sorted B cells after 3 days (2D) or 10 days (3D) of in vitro culture with or without TSC. HLY1 in 2D (H2D, n=3), HLY1 in 3D (H3D, n=3), HLY1 with TSC in 2D (HT2D, n=3), HLY1 with TSC in 3D (HT3D, n=3), DOHH2 in 2D (D2D, n=4), DOHH2 with TSCs in 2D (DT2D, n=3), and DOHH2 with TSC in 3D (DT3D, n=5) were used for RNA-seq analysis. RNA was extracted using the Nucleospin RNA XS Micro kit from Macherey Nagel (Hoerdt, France). Libraries were prepared using the SMARTer\* Low Input RNA kit (Takara). After quality control, all libraries were sequenced on an Illumina Hiseq2500 platform at 100-bp paired-end generating more than 66 million reads per sample with 100% of sequences achieving > Q20 Phred quality scores. The sequence quality was checked by FastQC v0.11.5. The RNA-seq reads were aligned to the reference genome GRCh38 release 90 using STAR v2.5.2a<sup>11</sup>. Read summarization and gene counts were performed using the featureCounts function from the Subread v1.4.6 R package<sup>12</sup>. Data normalization and differential gene expression were performed with the DESeg2 v1.26.0 R package. The DESeq2 HTSFilter v1.26.0 was applied on the normalized counts. Significant genes were defined as p < 0.05 after adjustment for multiple testing by False Discovery Rate (FDR) correction and used in downstream analysis. Data analysis was performed using R version 3.6.1 (www.R-project.org; R Foundation for Statistical Computing). Principal Component Analysis (PCA) was visualized using the Factoextra v1.0.7 R package on HTS filtered data normalized by variance stabilizing transformation from the DESeq2 package.

Enrichment for transcription factor targets in differentially expressed genes between FL В cells and tonsil centrocytes was performed with Enrichr (https://maayanlab.cloud/Enrichr/) by interrogating the TRRUST Transfection Factor 2019 database and results were represented as barplots. Gene Set Enrichment Analysis<sup>13,14</sup> (GSEA version 4.1.0) was used for the analysis of DOHH2 and HLY1 GEP, to identify the gene sets that were enriched between two conditions. GSEA preRanked analysis was conducted on the ranked gene lists generated for each pairwise comparison between two conditions, the ranking being applied on the statistics of the Wald test (DESeq2 R package). The gene sets corresponded to the hallmark gene sets from MSigDB version 7.4 and the gene sets from TRRUST v2 human database (version 16/04/2018). In addition, the results were compared to those obtained by comparing using Affymetrix microarrays the gene expression profile of purified FL B cells and purified centrocyte (purified centrocytes, GSE136248, n=5; purified FL B cells, GSE85233, n=10) after Limma analysis with a FDR of 5% and an absolute fold change>1.515,16.

# RT-qPCR arrays

For RT-qPCR, first-strand cDNA was synthesized using 1 µg of total RNA (DNasetreated) in a 20 µl reverse transcriptase reaction with PrimeScript RT reagent kit gDNA eraser (Takara, Ozyme) according to the instructions of the manufacturer. All real-time PCR reactions were performed in a 20 µl mixture containing 1/10 volume of cDNA preparation using Taq'Ozyme HS (Ozyme) according to manufacturer protocol with 5X FG Power Sybr Green PCRF (ABI Applied Biosystems, Fisher Scientific). The genespecific primers were as follows: hGAPDH-for-5'CCTGGTATGACAACGAATTT-3' and hGAPDH-rev-5'-GTGAGGGTCTCTCTCTCTCT-3'; Collagen 1-for-5'-TCT-GCG-ACA-ACG-GCA-AGG-3' and Collagen 1-rev-5'-GAC-GCC-GGT-GGT-TTC-TTG-3'; Laminin-for-5'-TCG-TCA-ACG-CCG-CCT-TCA-A-3' and Laminin-rev-5'-GTG-TCG-GCC-TGG-TTG-TTG-TA-3'. All qPCR experiments were performed using the Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time system (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). All the amplifications were done using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions included an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30s, 60°C for 30s, and 72°C for 30s. Melting curve analysis of every qPCR was conducted after each cycle. Samples were amplified at least in triplicate and non-template samples were used as controls. The

relative expression of mRNA was calculated using  $2^{-\Delta CT}$  method ( $\Delta Ct = Ct_{target gene} - Ct_{GAPDH}$ ) and the fold change of mRNA expression level was calculated using  $2^{-\Delta CT}$  method ( $\Delta AC_t = ACt_{3D} - ACt_{2D}$ ) in 3D compared with 2D condition. All data were normalized to internal control GAPDH.

#### Encapsulation and culture of primary FL cells

After thawing of FL LN, FL B cells were isolated using the B-cell isolation kit II (Miltenyi, Paris, France). Cell purity was checked using with mouse anti-human CD20-PE and mouse anti-human CD19-BV421 in the presence of a viability dye (VD-506) and analyzed on a Canto II flow cytometer (BD Biosciences). Cell viability was always >90% with >99% CD20<sup>pos</sup>CD19<sup>pos</sup> B cells.

For encapsulation,  $12 \times 10^6$  FL cells were resuspended in MEM- $\alpha$  culture medium (Thermo Fisher Scientific) with  $2 \times 10^6$  GFP-TSC in the presence of Matrigel. The encapsulation procedure was the same as that described above. Capsules were then cultured in  $25 \text{cm}^2$  flasks in MEM- $\alpha$  culture medium supplemented with 10% FBS under a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. For 2D cultures,  $150 \times 10^3$  primary FL cells were plated alone or on  $20 \times 10^3$  GFP-TSC in 96-well plates over 11 days in MEM- $\alpha$  culture medium supplemented with 10% FBS under a culture medium supplemented with 10% FBS under a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. At various times, FL B cells cultured in capsules or in 2D were counted by flow cytometry using precision count beads (Biolegend) as described above.

#### Live imaging of FL B cells co-encapsulated with TSC

Staining: Capsules were stained for 25 min at 37°C with calcein-red-AM (1µM), NucRed Dead (2 drops) and Hoechst 33342 (2µg/mL) as viability, dead cell and nuclei markers, respectively. Capsules were washed in DMEM without Phenol Red and deposited in glass-bottom dishes (Dutscher) precoated with Poly-D-Lysin to favor alginate adhesion to the substrate.

*Microscopy:* Acquisitions were conducted on two different setups. Capsules at Day 3 were imaged on a Leica SP8 WLL2 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), with a DMI6000 stand. Illumination provided by a tunable supercontinuum laser was focused to the sample through a Leica 40X dry 0.85 NA (HCX Plan Apo CS). Images were reconstructed from signals collected with Hybrids and PMT detectors. Capsules

at Day 14 were imaged with a Leica DMI8 stand (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) coupled to a Yokogawa spinning-disk module (CSU-W1 T2, Yokogawa Electric Corporation, Tokyo, Japan). Illumination diodes (405 nm, 488 nm, 561 nm, and 642 nm) were focused to the sample with a Leica 40X dry 0.85 NA (HCX Plan Apo CS). Images were acquired with a sCMOS Prime 95B camera (Photometrics, Tucson, USA). All the devices are piloted by MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Both experiments were conducted at 37°C under a controlled environment. Acquisition time being less than half an hour for each capsule.

*Analysis:* Image analysis and quantifications were performed with Fiji (an ImageJ with tool boxes, <u>https://fiji.sc/</u>) and Imaris 9.3 (Bitplane, Oxford Instruments). Briefly, cell centres were spotted on the Hoechst channel, and nuclei were tagged as TSC or Dead if colocalized with respectively GFP or NucRed Dead channels, remaining nuclei were therefore identified as B cells.

#### Chemotherapeutic toxicity measurement and doxorubicin diffusion in spheroids

To compare the drug toxicities on lymphoma cells cultured in suspension and in spheroids,  $0.5 \times 10^6$  cells/well co-cultured or not with  $5 \times 10^4$  GFP-TSC /cm<sup>2</sup> or 100 confluent spheroids were distributed in 6-well plates and treated or not with doxorubicin for 24h. Cell death was then assessed by flow cytometry after Annexin V-APC labelling according to the manufacturer instructions (BD Biosciences).To determine the half-maximal inhibitory concentration (IC50) of doxorubicin, 20 000 cells per well or 100 spheroids at confluence per well were plated in 96-well plates, with various concentrations of doxorubicin for 24h. Doxorubicin cytotoxicity was determined using the luminescent cell viability assay CellTiter-Glo® 3D Cell viability assay (Promega, Charbonnières-les-bains, France). Luminescence levels were quantified using the FlexStation® 3 (Molecular Devices, USA).

The uptake of doxorubicin by cells cultured in suspension or in capsules was determine using the fluorescent properties of doxorubicin ( $\lambda$ ex=470nm;  $\lambda$ em=560nm)<sup>17</sup>. Cells cultured in suspension or in capsule before or at confluence were incubated for 4h with doxorubicin (1µmol/L) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Then, capsules were dissolved as previously described and cells were harvested, washed in PBS and analysis of cell fluorescence reflecting doxorubicin uptake was done by flow cytometry (BD biosciences Canto II).

# Statistical analyses

All data were expressed as means  $\pm$  SEM. The significance of differences was calculated using the parametric ANOVA or the non-parametric U-Mann and Whitney or Wilcoxon tests, as appropriate. (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 software.

# REFERENCES

- Ame-Thomas P, Maby-El HH, Monvoisin C, et al. 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*. 2007;109:693–702.
- Guilloton F, Caron G, Menard C, et al. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood*. 2012;119:2556–2567.
- Wu C, Lu Y. Inclusion of high molecular weight dextran in calcium phosphatemediated transfection significantly improves gene transfer efficiency. *Cell Mol Biol.* 2007;53(4):67–74.
- Hu Y, Smyth GK. ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of Immunological Methods*. 2009;347(1):70–78.
- Alessandri K, Feyeux M, Gurchenkov B, et al. A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). *Lab Chip.* 2016;16:1593–1604.
- Doméjean H, Pierre M de la MS, Funfak A, et al. Controlled production of submillimeter liquid core hydrogel capsules for parallelized 3D cell culture. *Lab Chip.* 2016;17:110–119.
- 7. Trushko A, Di Meglio I, Merzouki A, et al. Buckling of an Epithelium Growing under Spherical Confinement. *Developmental Cell*. 2020;54:655-668.
- Perret E, Leung A, Morel A, Feracci H, Nassoy P. Versatile Decoration of Glass Surfaces To Probe Individual Protein-Protein Interactions and Cellular Adhesion. *Langmuir.* 2002;18(3):846–854.
- Andrique L, Recher G, Alessandri K, et al. A model of guided cell self-organization for rapid and spontaneous formation of functional vessels. *Science Advances*. 2019;5(6):eaau6562.

- Ollion J, Cochennec J, Loll F, Escudé C, Boudier T. TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics*. 2013;29(14):1840–1841.
- 11. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(8):e47.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545–15550.
- 14. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003;34(3):267–273.
- 15. Mourcin F, Verdière L, Roulois D, et al. Follicular lymphoma triggers phenotypic and functional remodeling of the human lymphoid stromal cell landscape. *Immunity*. 2021; doi: 10.1016/j.immuni.2021.05.019.
- Desmots F, Roussel M, Pangault C, et al. Pan-HDAC Inhibitors Restore PRDM1 Response to IL21 in CREBBP-Mutated Follicular Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2019;25(2):735–746.
- Kauffman MK, Kauffman ME, Zhu H, Jia Z, Li YR. Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems. *React Oxyg Species (Apex)*. 2016;2(6):432–439.

# MOVIE LEGENDS

**Movie 1: Dissolution of alginate shell of capsules containing SUDHL4 spheroid.** Alginate shell of capsule containing SUDHL4 spheroid obtained after 10 days in culture was dissolved in a bath of PBS/EGTA. The images were acquired every 15 seconds until complete dissolution of capsule using an epifluorescence microscope (Leica DMI8).

**Movie 2: Dissolution of alginate shell of capsules containing HLY1 spheroid.** Alginate shell of capsule containing HLY1 spheroid obtained after 10 days in culture was dissolved in a bath of PBS/EGTA. Movie was recorded using a CKX53 Olympus microscope.

**Movie 3: Establishment of the stromal cell network.** TSC expressing GFP and DOHH2 expressing dTomato were co-encapsulated in presence of matrigel and placed in an Universide in DMEM containing 10% FCS. The images were acquired immediately after encapsulation every 30 minutes for 12 hours using an epifluorescence microscope (Leica DMI8) equipped with a thermostatic and CO<sub>2</sub> chamber (Live on Stage, Leica). Scale bar: 100µm.

**Movie 4: Spatial organization of lymphoma spheroid.** 3D reconstruction from optical sections using confocal microscopy of capsule containing DOHH2 with Mg and GFP-TSC cultured for 6 days. Nuclei were stained in blue by Hoechst 33258.

**Movie 5: Spatial organization of follicular lymphoma (FL1) spheroid.** 3D reconstruction of multicolor live/dead (calcein red in yellow and NucRed Dead in red) staining from optical sections using confocal microscopy of capsule containing FL1 B cells with Mg and GFP-TSC cultured for 3 days. Nuclei were stained in blue by Hoechst 33258.

**Movie 6: Spatial organization of follicular lymphoma (FL2) spheroid.** 3D reconstruction of multicolor live/dead (calcein red in yellow and NucRed Dead in red) staining from optical sections using confocal microscopy of capsule containing FL1 B cells with matrigel and GFP-TSC cultured for 3 days. Nuclei were stained in blue by Hoechst 33258.

# SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1: Distribution of (A) the alginate microcapsule size and (B) the number of SUDHL4 cells in capsules immediately after encapsulation.

**Figure S2:** Limit dilution assays of DOHH2, HLY1 and SUDHL4 cells: A log-fraction plot of the limiting dilution results of DOHH2 (black), SUDHL4 (green), HLY1 cell lines (red). The slope of the line is the log-active cell fraction. The dotted lines give the 95% confidence interval.

Figure S3: Determination of the cell confluence and post-confluence in capsules. Capsules containing SUDHL4 (A) or HLY1 (B) were imaged on brightfield at different times after encapsulation. The diameter of the capsule and the thickness of the alginate walls were then measured manually by image analysis on more than 100 capsules per time point. The diameter (blue line) and wall thickness (red line) are plotted over time and allow the determination of the confluence (light grey) and post confluence (dark grey) periods (data plotted are Mean = SEM). Representative images of capsules at D8 (confluence) and D12 (post confluence) at low (scale bar=100 $\mu$ m) and high (scale bar=25 $\mu$ m) magnification are show below the graphs for both SUDHL4 (A) and HLY1 capsules (B).

**Figure S4: Evaluation of cell proliferation and cell death in confluent and postconfluent capsules.** Proliferative cells were stained using Click-it EdU cell proliferation kit (ThermoFisher Scientific) as manufacturer's recommendations. Dead cells were detected by propidium iodide labelling. Then, the percentages of proliferative (EdU+) and dead (PI+) cells were measured by flow cytometry.

**Figure S5: Detection of hypoxia in SUDHL4 and HLY1 spheroids.** Pimonidazole immunocytochemistry of spheroids. Spheroids at confluence or post-confluence were treated for 2h with pimonidazole 200µM. Hypoxia was revealed by hypoxyprobe-1 detection kit (brown color) and cells were counterstained with hematoxylin. Scale bar: 50µm.

Figure S6: Dose-effect of doxorubicin in SUDHL4 and HLY1 cultured in suspension (2D) or 3D. Cells or spheroids (w/o Mg and TSC) at confluence were seeded in 96-well plates with various concentrations of doxorubicin for 24h or 48h and the IC50 have been determined using the luminescent cell viability assay CellTiter-Glo® 3D cell viability assay (Promega, USA).

Figure S7: Comparative gene expression profile of B-NHL cell lines maintained in 2D or 3D culture with or without TSC. HLY1 and DOHH2 were maintained either in 2D with TSC (HT2D, n=3; DT2D, n=4), in 2D without TSC (H2D, n=3; D2D, n=3), in 3D with Mg+TSC (HT3D, n=3; DT3D, n=5) and in 3D without TSC (H3D, n=3) before sorting of CD20<sup>pos</sup>CD73<sup>neg</sup> cells and analysis of gene expression profile by RNAseq. Unsupervised principal component analysis of RNAseq data for HLY1 (A) and DOHH2 (B).

**Figure S8: Stromal cells trigger a decrease in DOHH2 proliferation.** DOHH2 cells maintained without (D2D) or with (DT2D) TSC in 2D culture were studied by RNAseq and genes upregulated in the absence of TSC were analyzed by GSEA using HallMark MSigDB database.

















# B. Organisation *in situ* de la niche tumorale du LF

Les deux principales niches du LF sont le ganglion lymphatique et la moelle osseuse qui sont compartimentées et organisées en de multiples sous-niches par des sous-types distincts de cellules stromales, de macrophages et de lymphocytes T constituant divers sites dans lesquels les cellules tumorales évoluent et se disséminent. Récemment, l'hétérogénéité transcriptionnelle du LF entre des ganglions lymphatiques au sein d'un même patient a été démontrée <sup>424</sup>, ce qui suggère qu'une seule biopsie sous-estime les complexités moléculaires des tumeurs des patients. D'autre part, nous savons actuellement que la réponse aux différentes lignes thérapeutiques est largement influencée par l'expression phénotypique tumorale, et que cette expression phénotypique tumorale est elle-même modulée par le microenvironnement audelà des altérations génétiques 425,426. Les altérations génétiques influencent cependant fortement la nature du microenvironnement <sup>332,403</sup>, et peuvent également être hétérogènes d'une niche tumorale à l'autre 294. Jusqu'alors, il n'a pas été identifié de niche tumorale spécifiques propre à une altération génétique ou une autre <sup>294</sup>. Comme vu précédemment dans l'introduction, le dépassement de la capsule ganglionnaire est un phénomène classiquement observé lors du diagnostic de LF 249. En effet, une des capacités remarquables des cellules tumorales de LF est de s'organiser de manière ectopique avec son microenvironnement de soutien stromal et immun en reproduisant une architecture folliculaire identique à celle observée au sein du ganglion, et ce en particulier dans la moelle et le tissu adipeux péri ganglionnaire. Une observation intéressante est que la moelle, comme le tissu adipeux périganglionnaire, constituent des niches de LF riches en adipocytes. Bien que sécrétant des quantités moindres de TNF et de plus grandes quantités d'IL6<sup>48</sup>; le tissu adipeux de moelle possède comme le tissu adipeux des autres organes, la capacité d'héberger des structures lymphoïdes tertiaires <sup>49</sup>. Les précurseurs des adipocytes de moelle et du tissu péri-ganglionnaire sont identifiés comme étant des cellules stromales mésenchymateuses <sup>427</sup>. Les cellules stromales mésenchymateuses de tissus adipeux appelées Adipose Stromal Cells (ASCs) peuvent donner naissance chez la souris aux cellules stromales lymphoïdes type FDCs et FRCs <sup>118</sup>, permettant la formation de structures lymphoïdes tertiaires. Dans la moelle, les cellules stromales mésenchymateuses pourraient également constituer les précurseurs de cellules stromales lymphoïdes s'apparentant aux cellules FDCs et aux FRCs<sup>78,129</sup> en terme de phénotype et d'organisation dans certains contextes pathologiques. On sait d'autre part que la moelle héberge des cellules de LF aux capacités prolifératives réduites, dont il est tentant de spéculer que certaines s'apparentent aux cellules CPCs <sup>273</sup>. Les niches médullaire et péri-ganglionnaire de LF sont cependant très peu explorées pour plusieurs raisons : i) l'exiguïté des prélèvements microbiopsiques à visée diagnostique ne permet pas forcément de visualiser l'état de la graisse péri-ganglionnaire, ii) la moelle fait l'objet de nombreux pré-traitements, comme la fixation, ou la décalcification, dégradant le matériel génétique et protéique. Il est tentant de spéculer que le microenvironnement adipeux péri- ganglionnaire héberge des cellules tumorales au phénotype différent de celles situées dans la structure interne du ganglion et dans la moelle, car constituant une niche tumorale microenvironnementale stromale et immune distincte. D'autre part, sachant que la rupture capsulaire est à l'origine de cette invasion péri-ganglionnaire, nous pouvons ainsi émettre deux hypothèses quant à l'ancienneté et l'agressivité des cellules tumorales invasives sont des cellules comportant peu d'altérations génétiques, constituant plutôt des précurseurs, soit ces cellules sont des cellules à un stade tumoral avancé, ayant accumulé des anomalies génétiques au sein de la structure ganglionnaire initiale et ayant migré secondairement dans la structure péri ganglionnaire.

Dans ce projet nous interrogeons les différences phénotypiques du microenvironnement tumoral (TME) dans les niches péri et intra ganglionnaires, en cherchant à savoir si ces différences de TME supportent des cellules tumorales au phénotype distinct. En particulier, nous souhaitons savoir si la niche péri-ganglionnaire héberge des cellules au potentiel agressif pouvant être responsables de la rechute ou de la transformation de la maladie. L'objectif de ce projet est de caractériser une niche tumorale et microenvironnementale jusqu'alors jamais explorée dans le LF, présente dans la graisse péri-ganglionnaire des ganglions tumoraux, afin d'identifier le phénotype des cellules tumorales hébergées, leur potentiel agressif, ainsi que des cibles thérapeutiques, aussi bien dans la tumeur que dans le microenvironnement.

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé ce projet comme présenté dans la **Figure 1** : 15 patients présentant des ganglions de LF avec une invasion péri ganglionnaire tumorale ont été analysés tout d'abord en immunofluorescence pour objectiver l'hétérogénéité de la niche tumorale stromale et définir les zones péri et intra-ganglionnaire. Puis ces deux zones ont fait l'objet d'une double extraction d'ADN et d'ARN après microdissection de chaque zone afin d'être séquencées d'une part, par capture NGS pour la recherche de mutations spécifiques associées au LF (travail en cours) et d'autre part, par la technologie NanoString et par Q-PCR. Sur un patient, une caractérisation plus fine du microenvironnement entre les deux

zones à l'échelle du follicule a été réalisée grâce à la technologie Digital Spatial Profiling (DSP).



Figure 1 : Méthodologie et déroulement du projet.

# 1. Caractérisation des niches stromales intra et péri-ganglionnaires

# a) Méthode

Un problème majeur restant la disponibilité et l'exiguité des échantillons congelés, nous avons utilisé des échantillons de tissus fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE). La relative disponibilité des exérèses complètes de ganglions de LF nous a permis de sélectionner les blocs FFPE des ganglions de 15 patients. Chaque patient présentait un LF de grade 1-2. Chaque tissu présentait des follicules tumoraux au sein de la structure ganglionnaire (Zone 1) et au sein du tissu adipeux extra ganglionnaire (Zone 2). Pour chaque ganglion, des marquages par immunofluorescence ont été réalisés avec une technologie multiplex, permettant d'observer les vaisseaux , les cellules stromales, la capsule, ainsi que les cellules tumorales et les lymphocytes T.

Des coupes histologiques de quatre micromètres d'épaisseur, obtenues à l'aide d'un microtome (Histocore multicut Leicabiosystems) à partir de tissus FFPE, ont été transférées sur des lames chargées positivement (VWR international), puis ont fait l'objet d'un immunomarquage multiplexé avec la technologie U DISCOVERY 5 (Roche Diagnostics). Trois cycles séquentiels de marquages ont été réalisés, chacun comprenant une étape de désactivation par la chaleur, suivie d'une incubation avec l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire HRP correspondant. Ainsi, les niveaux d'expression de l'ensemble des cibles ont été visualisés sur la même section à l'aide des anticorps primaires décrits dans le **Tableau 1**. L'enzyme HRP a métabolisé le dépôt de Tyramide couplé à des fluorophores correspondants à la rhodamine, cyanine-5 et FAM (kits Ventana Medical Systems) pour le lier de manière covalente à l'épitope d'intérêt. Après trois réactions séquentielles, les sections ont été contre-colorées avec du DAPI et recouvertes avec du Fluoromount (Enzo Life Sciences). La visualisation a été réalisée avec le Nanozoomer (Hamamatsu Photonics,) équipé du module de fluorescence multicolore.

Nom	Fournisseur	Source	Référence	Clone
CD20	Abcam	Rabbit	ab78237	EP459Y
CD3	Dako	Rabbit	A0452	F7.2
CD21	BioRad	Mouse	MCA1808T	2G9
CD34	Invitrogen	Rabbit	MA532059	S11601
Collagène I	Abcam	Rabbit	Ab34710	EPR22894-89
BCL2	Invitrogen	Mouse	13 8800	Bcl-2-100

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés

Pour l'évaluation du pourcentage de cellules B tumorales par rapport aux cellules non tumorales, une analyse automatisée par apprentissage avec le logiciel HALO a été réalisée. Après la segmentation des cellules, la détection et la segmentation des noyaux, des seuils d'intensité de CD20 et de BCL2 ont été définis. Les cellules doublement positives pour CD20 et BCL2 et les cellules positives pour CD20 et négatives pour BCL2 ont été quantifiées uniquement dans les follicules tumoraux (en effet, à ce jour, aucun marqueur protéique ne

permet de distinguer les cellules B tumorales des cellules B non tumorales au sein des zones inter-folliculaires). Les pourcentages des cellules B CD20+ BCL2- *versus* CD20+ BCL2+ sont présentés sous forme de graphique.

Par ailleurs, des quantifications des aires de surface marquées par des anticorps du stroma et de la vascularisation (CD34, collagène 1A et CD21) ont été réalisées avec le logiciel HALO. Les aires de surfaces marquées ont été rapportées à la surface analysée.

Dans cette présentation, la zone 1 sera attribuée à la zone tumorale intra ganglionnaire délimitée pas la capsule ganglionnaire (représentée en pointillé-trait **Figure 2**), la zone 2 concernera la zone tumorale extra ganglionnaire située dans le tissu adipeux péri-ganglionnaire. Les patients ont été anonymisés avec des lettres et chaque zone de chaque patient sera nommée par la lettre désignant le patient, suivie du numéro de la zone (1 ou 2). Ainsi, la zone A1 correspond à la zone 1 du patient A. Les zones folliculaires et interfolliculaires ont fait l'objet d'une reconnaissance structurale par machine learning avec le module Classifier du logiciel HALO.

Statistiques : L'ensemble des statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad (PRISM).

# b) Résultats

Nous nous sommes en tout premier lieu intéressé à la caractérisation des cellules stromales dans les deux zones. Comme nous pouvons l'observer sur la **Figure 2**, les deux niches intra et péri-ganglionnaires contiennent bien des cellules tumorales doublement positives CD20+ et BCL2+ dans les follicules. La quantification du signal par machine learning en aire de surface marquée en immunofluorescence sur des coupes FFPE, a permis d'observer une différence significative d'expression du collagène 1A entre les deux zones (p=0,0027 ; **Figures 3 et 4A**). A l'inverse, les FDCs identifiées dans les follicules tumoraux expriment le CD21 de manière homogène entre les zones 1 et 2, même si il a déjà été préalablement décrit une hétérogénéité intra et inter-patients <sup>117,428</sup> (**Figure 4B**). Nous avons également constaté la présence de larges bandes fibreuses provenant des cellules stromales péri-folliculaires exprimant le CD34 en rouge (**Figure 3**) dans la zone 2, alors que sous la capsule, les cellules stromales FRCs étaient négatives pour ce marqueur pour l'ensemble des patients (**Figure 3**).



**Figure 2:** Marquage BCL2 (vert) CD20 (orange) CD3 (rouge) et DAPI (bleu) permettant d'identifier et de quantifier les cellules tumorales dans un ganglion de LF.

Par ailleurs, les cellules endothéliales exprimant bien le CD34 au sein des vaisseaux sous et audelà de la capsule ont constitué un témoin interne valide (**Figure 3**). Il existe ainsi une différence significative (p=0,025) en termes d'aire de surface marquée du CD34 entre les deux zones (**Figure 4C**). Il n'existe pas de différence significative de densité de cellules tumorales dans les follicules entre les zones 1 et 2 (**Figure 5A**). Cependant, la densité tumorale n'est pas corrélée entre les deux zones (R=0.441 et p=0.873) (**Figure 5B**). Ces résultats soulignent donc tout de même une hétérogénéité de répartition intra patient. A l'inverse, la densité de cellules B non tumorales, beaucoup plus faible, est similaire (**Figure 5C**) et corrélée (**Figure 5D**) (R=0.9335 et p<0.0001) entre les deux zones. D'autre part, il n'existe pas de différence significative en terme de densité de lymphocytes T CD3 (**Figure 6**) aussi bien sur toute la surface analysée entre les deux zones (**Figure 6A**), que dans les zones folliculaires (**Figure 6B**) et inter-folliculaires (**Figure 6C**).

Il n'existe pas de corrélation entre l'expression de Collagène 1A et la densité de cellules tumorales dans la zone 1 (R= 0,1066 ; p=0,6944) (**Figure 7A**) et dans la zone 2 (R= 0,4359 ; p=0,0915) (**Figure 7B**). En revanche, nous observons que le CD34 est corrélé avec la densité de cellules tumorales au sein de la zone 2 (R=0,5025 ; p=0,0399 ; **Figure 7C**). Ces résultats identifient un lien entre les cellules stromales exprimant CD34 et les cellules tumorales dans la zone 2, suggérant un rôle possible de ces cellules dans la lymphomagénèse de la zone 2.



**Figure 3** : Analyse par immunofluorescence de ganglions de LF présentant deux zones tumorales distinctes intra et péri-ganglionnaires. Neuf marquages des 15 patients utilisés pour cette étude sont présentés ici et identifiés de A à I. Le microenvironnement stromal d'accompagnement est étudié avec l'anti CD21 (jaune) marquant les FDCs, l'anti-CD34 (rouge) marquant les FRCs extra ganglionnaires et les cellules endothéliales, et l'anti Collagène 1A (vert) marquant les FRCs et la capsule dans la niche tumorale intra-ganglionnaire (1) et la niche péri-ganglionnaire (2). Un grossissement est réalisé pour chacun des patients au niveau la capsule séparant les deux zones observées (représentée par la ligne en tiret-pointillé) avec le marquage anti CD34 en rouge.



**Figure 4: Quantification des marqueurs stromaux.** Les aires de surface ont été quantifiées suite à un marquage par immunofluorescence dans les zones 1 et 2 inter-folliculaires par des anticorps ciblant le Collagène 1A (A) et le CD34 (C), et dans les zones 1 et 2 intra-folliculaires, avec l'anticorps ciblant le CD21 (B). Analyse pairée avec un test de Wilcoxon (\*p<0,05 ; \*\* p<0,001). (n=15)



**Figure 5:** Quantification des cellules tumorales CD20pos BCL2pos (**A**) et des cellules B non tumorales CD20pos BCL2neg (**C**) dans les régions intrafolliculaires des zones 1 et 2 après un marquage par immunofluorescence. Corrélation de Pearson et régression linéaire entre les pourcentages de cellules tumorales (**B**) et non tumorales (**D**) dans les zones 1 et 2. (n=15)



**Figure 6:** Quantification des lymphocytes T CD3+ sur l'ensemble des zones 1 et 2 analysées (A), dans les zones intrafolliculaires (B) et interfolliculaires (C). (n=15).


**Figure 7:** Corrélation de Pearson entre la densité en cellules tumorales et le pourcentage d'aire de surface marquée par l'anti Collagène 1A dans la zone 1 (**A**) puis dans la zone 2 (**B**) et par l'anti CD34 dans la zone 2 (**C**). (n=15)

Afin de mieux caractériser les zones 1 et 2, des analyses d'expression génique dans chaque zone ont été réalisées après microdissections laser.

### 2. Caractérisation transcriptionnelle du microenvironnement des zones 1 et 2

### a) Méthode

Les blocs FFPE concernant les patients sélectionnés ont fait l'objet de coupes sériées (3  $\mu$ m d'épaisseur) puis d'un déparaffinage avec incubation 1 min dans 4 bains successifs de xylène et une réhydratation avec de l'éthanol pur. Des capsules coatées avec un film thermosensible ont ensuite été positionnées au-dessus des zones d'intérêts, l'appareil dirigeait ensuite le laser IR à travers la capsule pour coller le film sur les zones d'intérêts précédemment sélectionnées à l'aide d'une coloration puis d'un scannage rapide de la lame. Le laser UV a ensuite effectué la dissection des zones de tissus. Enfin, lors du soulèvement de la capsule, les cellules fixées au film thermosensible sont récupérées. La capsule adhérant au matériel d'intérêt

pouvait ensuite être incubée directement dans la solution de lyse destinée à extraire l'ADN et l'ARN. L'ARN et l'ADN ont ensuite été extraits avec les kits d'extraction prévus à cet effet (54300 Norgen FFPE DNA/RNA-Purification). L'ARN de chaque zone a été séquencé avec la technologie NanoString en utilisant le panel de sondes PAN CANCER 360 pour une étude exploratoire sur trois patients pour les deux zones. Les résultats de séquençage des 3 patients ont ensuite fait l'objet d'une normalisation par rapport à des gènes de ménage inclus dans le panel PAN CANCER 360 puis l'analyse a été effectuée de la manière suivante : un ganglion réactionnel a tout d'abord été utilisé afin de fixer un seuil témoin de l'hétérogénéité transcriptionnelle: deux zones aléatoires de ce ganglion ont été séquencées et le seuil résiduel pour lequel il n'existait pas de variation d'expression de gènes entre les deux zones a été mesuré à 1,5 (**Figure 8**). De ce fait, pour l'ensemble des zones 1 et 2 des tissus de LF analysés, tout gène dépassant le seuil résiduel de |1,5| dans la zone 1 ou dans la zone 2 était considéré comme d'expression hétérogène entre les deux zones tumorales (**Figure 9**).



**Figure 8 :** Régression linéaire de l'expression des gènes ciblés par le panel CANCER 360 entre deux zones aléatoires d'un ganglion réactionnel. La ligne rouge correspond au seuil résiduel fixé pour lequel il n'est pas considéré de variation d'expression génique entre les deux zones.



**Figure 9 :** Régression linéaire de l'expression des gènes ciblés par le panel CANCER 360 entre les zones 1 et 2 des 3 ganglions de LF analysés. La ligne rouge correspond au seuil résiduel fixé pour lequel il n'est pas considéré de variation d'expression entre les deux zones : 1,5.

#### b) Résultats

Le rapport d'expression de ces gènes a ensuite été reporté sur une heatmap (Figure 10), montrant les gènes surexprimés ou sous-exprimés communs au sein des trois patients.



**Figure 10:** Heatmap présentant les rapports des résidus d'expression de chaque gène résultant de l'analyse par régression linéaire entre la zone 1 et la zone 2 de chaque patient (A, E et M)

Les gènes d'intérêt sur- ou sous-exprimés dans la zone 2 par rapport à la zone 1 chez les trois patients ont ensuite été validés en Biomark Q-PCR sur 9 patients (parmi les 15 inclus dans notre analyse et comprenant les 3 patients précédemment analysés avec la technologie NanoString), confirmant un enrichissement des gènes identifiés en NanoString dans les zones



**Figure 11** : Heatmap présentant les log2 fold change des valeurs d'expression (delta CT) des gènes sur ou sous exprimés en Q-PCR (Biomark) dans la zone 2 par rapport à la zone 1 pour 9 patients.

1 et 2.

Ainsi dans la zone 2, pour les 9 patients analysés on observe une up régulation des gènes associés aux CAFs: *PLA2G2A, POSTN, FAP, COLL1A, PDGFRA, CD34, SFRP4, CCL2, IL6 ;* aux TBRCs et FDCs : *NGFR, BAFF ;* aux plasmocytes : *PRDM1 ;* aux lymphocytes T : *CD8A ;* aux macrophages : *SIRPA, ATF3, DAB2, APOE, CCR2, CD163, SPARC.* 

### 3. Etude de la relation tumeur/TME dans les follicules péri-ganglionnaires tumoraux

Une limite de notre étude précédente étant que les zones sélectionnées comprenaient aussi bien les zones inter-folliculaires qu'intra-folliculaires, nous avons entrepris d'étudier exclusivement les zones intra-folliculaires, enrichies en cellules tumorales, au sein des zones 1 et 2. Afin d'appréhender le phénotype tumoral et la composition du microenvironnement de ces follicules, nous avons réalisé en étude pilote, une étude transcriptomique des follicules des zones 1 et 2 grâce à la technologie Digitale Spatial Profiling (DSP) sur un patient indépendant de la cohorte précédemment étudiée.

### a) Méthode

Un tissu ganglionnaire de LF provenant d'un patient sélectionné indépendamment de la cohorte examinée précédemment et comportant une zone tumorale intra-ganglionnaire et une zone tumorale péri-ganglionnaire a ainsi fait l'objet de coupes sériées afin de délimiter les zones intra et extrafolliculaires à l'aide des anticorps d'immunofluorescence CD3, CD20, SMA (Smooth Muscle Actine). Dans cette expérience, sur la coupe sériée consécutive, les ARNs tissulaires ont été hybridés à des oligonucléotides couplés à des sondes photo clivables (codesbarres), qui ont ensuite été libérées par exposition séquentielles aux UVs. Ces codes-barres ont été ensuite analysés quantitativement et qualitativement afin d'obtenir l'expression transcriptomique *in situ* des zones d'intérêt. Dans cette technique, plusieurs sondes sont conçues pour chaque gène à différents endroits des zones transcrites en ARN permettant ainsi la quantification de chaque ARNm, même si le transcrit complet n'est plus intact (du fait de la dégradation du matériel génétique par le prétraitement FFPE). Le ciblage de régions dans l'ensemble du transcrit offre ainsi la possibilité de cibler des ARN partiellement dégradés, des

ARN non codants et les isoformes d'épissage. Les codes-barres attachés aux sondes du panel CTA (Cancer Transcriptome Atlas) sont conçus pour être compatibles avec une plateforme standard de séquençage. Une fois le séquençage réalisé, les comptes font l'objet d'une normalisation, après une correction du bruit de fond à l'aide de sondes dites «négatives», la méthode de normalisation utilisée est la méthode du troisième quartile.

### b) Résultats

En analysant les 10% de gènes les plus variants sur trois follicules de chaque zone, nous avons tout d'abord confirmé une surexpression dans la zone 2 des gènes observés en Q-PCR et avec la technologie NanoString. Ces gènes sont associés aux macrophages: *SRFP4*, *SPARC*, *ATF3*, CD68, *CD163*, *CCL2*, *APOE*; aux CAFs: *COLL1A2*, *POSTN*, *FAP*; aux lymphocytes T: *CD8A*; et aux plasmocytes: *PRDM1* (log2 FOLD change > 0.5, Adj pvalue>0.5) (**Figure 12**). Au-delà, on identifie en plus une surexpression de certains gènes de FDCs: *CLU*, *VCAM1*, *NGFR-1*; de lymphocytes T: *IFNG*, *IDO1*, *PD1*, *GRMK*; de plasmocytes: *IRF4*, de macrophages: *IL6*, *CCL13*, *CCL5*, *SIRPA*, *MFGE8*, et de CAFs: *PLA2G2A*, *CD34* (déjà identifié en protéine) (log2 FOLD change > 0,5, Adj pvalue>0.5) (**Figure 12**). En parallèle, nous identifions une sous-expression de gènes associés à la mobilité et l'activation des lymphocytes : *CCL21*, *CXCL13*, *CCR7*, *IL7R*, *TNFSF9*, *GZMB*, *CXCL5*, *CCL21*, *CCR7*, *HLA-DRA*, *FCER2*; à la prolifération et au cycle cellulaire : *TP53*, *MYC*, *MK16*, *MAPK1*; aux macrophages: *MARCO*, au métabolisme : *FUT8*, *PKM*, *ALDOA*, *ALDOC*, *LDHB*, *PKL1*, *CYBB* dans cette même zone 2(log2 FOLD change < -0,5, Adj pvalue>0.5) (**Figure 13**).





**Figure 12 :** Heatmap correspondant aux expressions en log2 fold change des 5% de gènes les plus surexprimés dans zone 2 par rapport à la zone 1.



Figure 13 : Heatmap correspondant aux expressions en log2 fold change des 5% de gènes les moins exprimés dans la zone 2 par rapport à la zone 1

### 4. Discussion

Dans cette étude, nous avons ainsi analysé les différences transcriptomiques entre deux zones tumorales anatomiquement distinctes en caractérisant une niche tumorale jusqu'alors jamais étudiée : la niche péri-ganglionnaire du LF.

Nous avons observé dans la zone 2 une expression plus intense de gènes associés aux CAFs par rapport à la zone 1 : PLA2G2A, FAP, SRFP4, COLL1A, CD34, POSTN. Nous avons également observé une augmentation significative de l'expression protéique de Collagène 1A et de CD34 dans la zone 2. Il a été montré que PLA2G2A est surexprimé dans la transition des ASCs en phénotype CAFs<sup>429</sup>. La périostine est d'autre part impliquée dans les phénomènes de progression tumorale dans les CAFs <sup>430</sup>. La protéine d'activation des fibroblastes (FAP) déclenche l'induction d'un sous-type de CAFs caractérisé par un phénotype inflammatoire dirigé par l'activation de STAT3 et par une signature d'expression génique associée à l'inflammation régulée entre autre par CCL2<sup>431</sup>. Les analyses d'expression génique dans le cancer du sein ont révélé que les CAFs sont caractérisés par plusieurs profils transcriptomiques distincts définis sous le terme de clusters. Une forte expression de SFRP4 est associée au cluster 4, ainsi qu'au sous-groupe de myofibroblastes ("myCAF"), précédemment identifiés dans les fibroblastes FAP+ du cancer du pancréas. Les myCAF expriment également Collagène 1A2<sup>432</sup>. Il a été montré que la densité de collagène participe aux qualités immunosuppressives des macrophages de type M2 d'une part, et d'autre part, que les macrophages et les lymphocytes ont une meilleure mobilité sur les fibres formées par le collagène 1 A<sup>433</sup>. Le collagène 1 favorise également le processus d'invasion, car les cellules tumorales et les macrophages se déplacent environ dix fois plus vite sur ces structures que sur le stroma lui-même <sup>433</sup>. Ici, la densification du réseau de collagène 1A pourrait bloquer l'infiltration lymphocytaire TCD8 en périphérie des follicules <sup>325</sup>. Nous avons également constaté une augmentation de l'expression de CD34 exprimé par les cellules stromales entourant les follicules, dans la zone 2. Cette expression était fortement corrélée à la présence de cellules tumorales au sein des follicules. Le précurseur de ces cellules stromales adoptant une organistion de FRCs reste inconnue dans cette étude. Cependant, il est tentant de spéculer que ces cellules sont originaires des ASCs CD34+, physiologiquement présentes dans le tissu adipeux et connues pour se différencier en cellules stromales lymphoïdes de type FRCs <sup>118</sup>.

La zone 2 est également caractérisée par une expression accrue de *GRMK*, *IL6*, *CCL2*, *CCL5*, ATF3, APOE, MFGE8, CCL13, CCR2, DAB2, CD163, SIRPA par rapport à la zone 1. Granzyme K produit par les lymphocytes T CD8 incite les cellules stromales à produire des molécules effectrices pro-inflammatoires, notamment IL-6, CCL2 et ROS. Le recrutement des MATs est médié par des chimiokines, telles que CCL2 et CCL5 <sup>348,350</sup>. CCL2 est d'ailleurs une des principales chemokine dérégulées dans les CAFs de LF 79,377. Des travaux ont révélé que l'expression de ATF3 dans les macrophages favorisait leur migration et l'expression du phénotype M2 *via* la voie de signalisation Wnt/β-caténine <sup>434</sup>. De la même manière, parmi les gènes surexprimés dans la zone 2, APOE codant pour l'Apolipoprotéine E, et MFGE8 permettent la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 435,436. CCL13 serait associé aux macrophages de type M2 également <sup>437</sup>. La phosphoprotéine Disabled Homolog 2 (codée par DAB2) est fortement exprimée dans les MATs infiltrant les tumeurs. Les MATs exprimant DAB2, principalement localisés le long du front d'invasion de la tumeur, participent au recyclage des intégrines, au remodelage de la MEC dans les tumeurs solides <sup>438</sup>. Nous pouvons observer (Figure 14 A et B) que la zone 2 semble présenter un infiltrat plus abondant que la zone 1 en macrophages exprimant SPARC et DAB2 (Figure 14 C et D). De manière intéressante, les CAFs de cancer du poumon dépendent de FAP pour sécréter des ligands de CCR2, comme CCL2, CCL7 et CCL13, afin d'induire le recrutement de TAMs CCR2 +, puis de faciliter la polarisation des TAMs CCR2 + infiltrés vers le phénotype M2<sup>439</sup>. FAP clive sélectivement le collagène de type I, ce qui entraîne une augmentation de l'adhésion des macrophages <sup>440</sup>. Nous observons une forte expression de Collagène 1A dans les zones positives pour FAP et DAB2, appuyant l'hypothèse que FAP pourrait faciliter l'établissement de ces macrophages dans les zones inter folliculaires (Figure 15 A et B). Des études plus précises de quantification une chorte de patients seront nécessaires pour affirmer cette hypothèse. Le récepteur scavenger de l'hémoglobine (CD163) est exprimé principalement par les macrophages de type M2 <sup>347</sup> et a été décrit comme étant associé au pronostic dans le LF <sup>359</sup>. La molécule CD47 est une protéine membranaire largement distribuée sur les surfaces membranaires de diverses cellules, y compris les cellules tumorales. Son ligand, la protéine régulatrice du signal alpha (SIRPa), est une protéine membranaire principalement exprimée par les macrophages, les interactions directes de SIRP $\alpha$  et CD47 inhibent la phagocytose par ces derniers. D'autre part, les cellules CD14+SIRPahi seraient immunosuppressives en inhibant l'activité cytotoxique T dans le LF 441. CXCL5 majoritairement produit par les macrophages de type M1<sup>442</sup>, est sous exprimé dans la zone 2.



**Figure 14** : Immunofluorescence montrant dans la zone 2 (**A** avec DAPI et **B** sans DAPI) et 1(**C** avec DAPI et **D** sans DAPI) les follicules tumoraux bordés par les macrophages exprimant DAB2 (jaune) et SPARC (rouge), et le stroma exprimant FAP en vert.

SPARC, un régulateur du dépôt et de l'organisation du collagène a été trouvé exprimé non seulement dans les follicules de la zone 1 mais aussi dans les zones médullaires paratrabéculaires envahies de LF et de DLBCL et peut donc représenter un élément régulateur commun dans la moelle et le ganglion <sup>318</sup>. La délétion de *Sparc* chez la souris est associée à un assemblage défectueux du collagène et à une perte du signal inhibiteur des neutrophiles <sup>443</sup>. SPARC a été trouvé chez les patients atteints de LF précoce <sup>443</sup>. Cette protéine semble plus exprimée dans la zone 2 (**Figure 14**). L'ensemble de ces données suggère que la zone périganglionnaire est enrichie en TAMs de type M2 au contact de CAFs particuliers.

Une surexpression du gène *PLA2G2A* de la phospholipse A2 catalysant l'hydrolyse des phospholipides en acides gras suggère que la reprogrammation du métabolisme lipidique joue un rôle important dans le processus de lymphomagénèse de la zone 2<sup>444</sup>. D'autre part, nous observons une sous expression de gènes liés au métabolisme du glucose tels que *FUT8, PKM, ALDOA, ALDOC, LDHB, PKL1, CYBB*<sup>445</sup> ainsi qu'une diminution des gènes associés à la prolifération et au cycle cellulaire : *C-MYC, TP53, MAP3K1, KI67.* Il existe également une diminution d'expression du gène de l'apoptose *CASP3*. Les cellules adipeuses peuvent fonctionner comme des intermédiaires de la signalisation endocrine et paracrine, influençant le métabolisme des acides gras des cellules cancéreuses<sup>446</sup>.



**Figure 15** : Immunofluorescence montrant dans la zone 2 les cellules stromales dans les zones inter-folliculaires exprimant Collagène 1A en vert ( $\mathbf{A}$ ) exprimant FAP en vert ( $\mathbf{B}$  et  $\mathbf{C}$ ) et co-localisant avec les macrophages exprimant DAB2 (jaune) et SPARC (rouge) vert ( $\mathbf{B}$  et  $\mathbf{C}$ ).

En effet, il existe un réseau d'interactions dans lequel les adipokines sécrétées stimulent les cellules cancéreuses pour qu'elles libèrent des exosomes contenant des facteurs prolipolytiques tels que le miRNA-144 et le miRNA-126, qui favorisent la lipolyse dans les adipocytes adjacents par l'activation de la signalisation AMPK et l'induction de l'autophagie <sup>447,448</sup>. En fin de compte, l'augmentation de la lipolyse et la libération d'acides gras libres modifient fondamentalement les dépendances métaboliques des cellules cancéreuses en induisant l'absorption de lipides exogènes et la β-oxydation pour l'approvisionnement en énergie <sup>448,449</sup>. L'absorption et le piégeage des acides gras extracellulaires constituent également un important mécanisme compensatoire permettant aux cellules cancéreuses de maintenir leur demande en lipides dans des conditions de stress métabolique. Alors que la phosphorylation oxydative est considérée comme la principale source de métabolisme énergétique dans des conditions normales d'oxygène, les cellules cancéreuses s'appuient de préférence sur la glycolyse pour générer de l'ATP. Ce phénomène est appelé glycolyse aérobie ou « effet Warburg » <sup>450,451</sup>. Il correspond à un shunt du glycogène au cours duquel le glucose métabolisé à partir du glycogène (plutôt qu'à partir du glucose absorbé) contribue à la production d'ATP par la glycolyse ou, dans un scénario inverse, l'ATP généré par la glycolyse est utilisée pour la synthèse du glycogène. L'ATP sera ainsi majoritairement produite lors de la transformation du pyruvate en lactate plutôt qu'au cours de la phosphorylation oxydative. C-MYC induit presque toutes les enzymes impliquées dans la glycolyse comme GLUT, la HK-II, la pyruvate kinase et la LDH; favorisant ainsi l'effet "Warburg" dans le cancer<sup>452</sup>. De manière intéressante, une étude récente utilisant un modèle de lymphome à cellules B induit par C-Myc a établi un lien entre C-Myc et GSK3b. D'autre part, la délétion conditionnelle du BCR a entraîné l'activation de GSK3b et l'expression de gènes régulés par Myc <sup>453</sup>, soulignant la relation étroite entre le

métabolisme et la signalisation de survie dans les cellules de lymphome. Dans la zone 2, les gènes associés à la glycolyse et impliqués dans l'effet Warburg sont diminués, en association avec des gènes de la prolifération et du cycle cellulaire, suggérant des modifications métaboliques au sein du tissu adipeux.

On rapporte que TP53 est muté dans environ 20% des LF transformés et/ou en rechute, mais dans moins de 5% des LF avant traitement. La disparité de la prévalence rapportée des mutations TP53 au moment du diagnostic par rapport à la transformation/récidive suggère que des sous-populations mutées TP53, trop minoritaires pour être détectées, pourraient être présentes au moment du diagnostic dans les tumeurs destinées à la rechute <sup>454</sup>. La diminution de l'expression de TP53 dans la niche tumorale péri ganglionnaire suggère que cette population minoritaire pourrait être hébergée dans ce type de microenvironnement. Afin de confirmer cette hypothèse, nous souhaiterions effectuer une analyse par NGS capture sur l'ensemble des zones 1 et 2 des 15 patients analysés afin d'identifier une différence de fréquence allélique concernant les mutations les plus fréquemment observées dans le LF. En effet, les différences phénotypiques observées dans le microenvironnement des deux zones pourraient répondre à des sous clones de nature différente. Il est cependant difficile d'anticiper la nature des mutations propres aux 2 zones tumorales, à la vue des résultats actuels. En effet, la plupart des mutations connues pour moduler le microenvironnement influencent fortement les interactions entre les cellules tumorales de LF et les TFHs et nous avons peu de gènes modulés dans la zone 2 supposant des fortes modifications dans ces interactions. Cependant, ici, les interactions entre les cellules tumorales et les cellules FDCs semblent renforcées avec une hausse de l'expression de CLU et de VCAM-1 dans la zone 2. Les mutations de EZH2, ont été décrites comme améliorant ces interactions au profit de celles avec le compartiment TFH. Il faut cependant souligner que cette mutation survient précocement dans la lymphomagénèse. Nous ne nous attendons de ce ne fait pas à autre chose qu'une différence de fréquence allélique minime.

De manière intéressante, nous observons également une surexpression de gènes associés aux plasmocytes : *IRF4* et *PRDM1* <sup>455</sup>. La surexpression de gènes plasmocytaires dans un contexte où la proportion de B tumoraux intrafolliculaires est identique suggère une plasticité du phénotype tumoral avec une localisation préférentielle putative des B de LF engagés vers la voie pré-plasmocytaire dans cette zone. Le microenvironnement stromal et macrophagique dans la zone 2 semble imposer une mobilité lymphocytaire réduite (de par la diminution de production des chimiokines CXCL13 et CCL21 en comparaison à la zone 1).

Globalement, la zone 2 pourrait héberger des cellules tumorales dont les stades de maturation s'apparentent aux plasmocytes, présentant une mobilité réduite, une diminution du métabolisme du glucose et des capacités prolifératives moindres. Des travaux complémentaires de validation protéique et de séquençage génétique sur de nouveaux échantillons, permettront de confirmer cette hypothèse.

Nous avons également observé une surexpression des gènes *CLU*, *NGFR1*, *VCAM-1*, *BAFF* montrant un renforcement des interactions entre les cellules tumorales et les cellules stromales de type FDCs ou TBRCs <sup>228</sup>. *BAFF* et *VCAM-1* sont décrits comme induisant une meilleure survie des cellules tumorales dans le LF <sup>222,373</sup>. Notre équipe a récemment démontré que l'expression de VCAM-1 et clusterine étaient augmentées dans les cellules B et stromales dérivées de LF <sup>117,326,456,457</sup>. La surexpression de la clusterine par les cellules stromales suggère une adhésion forte entre les cellules B de LF et les cellules stromales. En outre, la clusterine, qui est induite par l'IFN- $\gamma$  (augmenté ici dans la zone 2) dans le lymphome de Hodgkin <sup>458</sup>, est considérée comme une molécule régulatrice du stress oxydatif empêchant l'apoptose cellulaire (CAPS3 est ici diminué dans la zone 2) <sup>456</sup>.

Le microenvironnement immun dans la zone 2 est également modulé avec une sur expression des gènes IFNG, IDO1, PD1, ainsi qu'une sous expression des gènes TRDC, TNFSF9, CCL21, CCR7, IL7R, GRZB, HLA-DR, CD8A. Il a récemment été décrit dans le LF, que les TFH augmentaient l'expression d'IFN-y et que les cellules B de LF augmentaient l'expression du récepteur IFN-yR. Il est intéressant de noter que l'IFN-y induit une réduction de l'expression de CD44 par les cellules de LF. Cette protéine est connue pour réguler leur adhésion sur les cellules stromales et pour favoriser leur accumulation dans les follicules, limitant ainsi leur recirculation et leur migration<sup>459</sup>. De plus, dans un contexte inflammatoire non tumoral l'IL-6 favorise l'expansion des cellules T CD4+ sécrétant de l'IFN-y. Lors de la stimulation par l'IFN-y, les cellules stromales mésenchymateuses expriment l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (codée par IDO)<sup>460</sup>, activant une voie effectrice immunosuppressive clé dans la tolérance des cellules T périphériques et qui est également associée à une inhibition de la prolifération des B normaux et tumoraux <sup>214</sup>. Ce phénomène pourrait être associé au caractère quiescent des cellules tumorales de la zone 2. En outre, les cellules B de LF perdent spécifiquement leur capacité à induire l'expression de HLA-DR en réponse à l'IFN- $\gamma$ , et ce quel que soit le statut mutationnel de *CREBBP* <sup>457</sup>, ce qui pourrait expliquer la concordance d'un taux élevé d'IFN-y avec une expression restreinte d'HLA-DR

dans la zone 2. Cette altération de l'expression de HLA-DR sur les cellules B de LF affecte leur capacité de présentation de l'antigène et pourrait participer à l'échappement tumoral.

Les diminutions des expressions de *CCL21*, *CCR7* et de *TDRC*, *IL7R*, *CD8 et GRZB* sont en faveur d'un moindre recrutement/amplification des lymphocytes T cytotoxiques.

Ainsi, au cours de notre étude, nous avons exploré et caractérisé pour la première fois une toute nouvelle niche tumorale dans le tissu adipeux péri ganglionnaire au sein de laquelle les cellules tumorales semblent adopter un stade de maturation plus avancé dans la différentiation plasmocytaire. Elles semblent plus quiescentes, par une diminution de leur métabolisme et de leur prolifération et interagir avec un microenvironnement immun immunosuppressif, un microenvironnement macrophagique associé aux MATs de type M2. Leur lien avec les FDCs semble renforcé et les cellules stromales péri folliculaires semblent adopter un profil de type CAFs. Il reste maintenant à savoir en quoi ce microenvironnement est influencé par le profil génétique des cellules tumorales de la zone 2.



**Figure 16:** Représentation de la modulation des interactions entre les lymphocytes B tumoraux de LF et sa niche tumorale au sain de la zone 2. Les lymphocytes B de LF (FL-B CELLS) voient une diminution de leur prolifération et de leur métabolisme due en partie à la polarisation des cellules stromales par IDO et IFNg produits par les lymphocytes T CD8 qui expriment des niveaux moindres de facteurs impliqués dans une activité cytotoxique. Les cellules stromales ASCs sont polarisées en phénotype de type CAF, en périphérie du follicule, certainement de par la production de TGFb par les cellules tumorales. De même, Le collagène 1A est clivé par FAP pour permettre le recrutement de macrophages de type M2 qui sont polarisés et recrutés grâce à la production d'IL6, de CCL2, et de CCL5 par les cellules stromales stimulées par Granzyme K produit par les lymphocytes T8. La mobilité des cellules tumorales est diminuée dans cette niche avec une diminution de production de CCR7, CCL21, CXCL13. Les macrophages de type M2 expriment SIRPalpha qui bloque l'activité de phagocytose des cellules B tumorales de LF ainsi que l'activité T cytotoxique.

# CHAPITRE III Discussion des résultats et perspectives

Au cours de mon travail de thèse, j'ai tenté de mieux comprendre les interactions entre les cellules stromales et les lymphocytes B tumoraux de LF, tout d'abord grâce à la caractérisation et l'utilisation d'un modèle d'étude *in vitro* en 3D. Ce modèle d'étude permet une organisation cellulaire autonome car sans « échafaudage » en présence de cellules du microenvironnement. Nous avons montré qu'il était possible d'étudier les voies de signalisation impliquées dans ces interactions et d'identifier des cibles thérapeutiques en extrayant et en triant ces cellules à l'issue de la culture pour réaliser des études transcriptomiques. Nous avons réalisé la preuve de concept que ce modèle permettait de cultiver des cellules primaires de LF, avec des cellules stromales primaires. Par ailleurs, ce modèle semble être un modèle idéal pour le test de diffusion et d'efficacité des molécules thérapeutiques.

Nous avons d'autre part également initié la caractérisation d'une niche tumorale dans le LF jusqu'alors jamais explorée, hébergeant des cellules tumorales au caractère quiescent, avancées dans une différentiation plasmocytaire, et interagissant avec un microenvironnement stromal et macrophagique rappelant des CAFs et les MATs associés au tumeurs solides.

### A. Vers une meilleure caractérisation des niches stromales de LF :

### 1. La dépendance d'une lignée lymphomateuse B pour le stroma en 3D:

Dans le modèle d'étude 3D, le phénomène de dépendance de la lignée cellulaire DOHH2 pour les cellules stromales Restos (TSCs) reproduit une des caractéristiques des lymphocytes B tumoraux de LF. Cette observation introduit une question essentielle concernant le mécanisme de survie de cette lignée en 3D. En effet, ces cellules se cultivent sans stroma *in vitro* dans des conditions très reproductibles en 2D à une concentration de 100 000 cellules par ml. Dans l'article présenté plus haut, nous avons en partie répondu à cette question en réalisant des essais de culture en condition limitantes, de manière à ne cultiver qu'une seule cellule par puit (à la concentration de 5 cellules par ml) à l'initiation de la culture. Nous avons parallèlement augmenté progressivement le nombre de cellules en culture par puit sans pour autant obtenir de véritable amplification après la mise en culture de 10 cellules par puits, soit, 50 cellules par ml (**Figure supplémental 2**) <sup>461</sup>. Ces résultats montrent que cette lignée encapsulée dans de telles conditions, ne peut survivre de manière autonome. Nous n'avons

cependant pas testé l'encapsulation des DOHH2 à des concentrations élevées dès l'initiation de la culture pour confirmer cette donnée. Ainsi, cette lignée nécessite d'être cultivée à une certaine concentration cellulaire de départ, pour proliférer et survivre, suggérant des signaux d'activation et de survie engagés par l'adhésion des cellules entre elles ou la production de facteurs solubles. Il serait intéressant d'observer le comportement des cellules B primaires de LF également dans les mêmes conditions. En effet, nous n'avons pas testé l'encapsulation des cellules primaires de LF sans stroma, étant limités en nombre de cellules primaires pour les expériences et ayant supposé que ces cellules ne survivraient pas sans la présence de stroma en 3D, comme c'est le cas en 2D. Cependant, nous avons vu plus haut dans l'introduction que les cellules tumorales de LF peuvent être retrouvées dans la circulation sanguine, sans pour autant voir leur survie altérée sans stroma, au contraire, les forces de compression relatives au flux de la circulation sanguine augmenteraient des voix de signalisation du BCR impactant sur les signaux de survie cellulaire, de prolifération et d'activation <sup>391</sup>. Les cellules B de LF requièrent donc probablement lorsqu'elles sont isolées des forces de compression mécaniques pour les maintenir en vie, ou, comme observé dans notre modèle de co-culture en 3D, des signaux de survie induits par les interactions avec le stroma. Ces résultats sont à mettre en perspective avec les observations réalisées dans les deux niches tumorales intra et extra ganglionnaire. En effet, comme vu précédemment dans l'introduction, les cellules de LF peuvent être retrouvées dans la circulation sanguine, dans la moelle, dans le ganglion. Cependant dans chaque compartiment, des forces de compression variables s'appliquent sur ces cellules: dans le ganglion, la rupture capsulaire suggère un manque d'adaptation du ganglion aux forces de compression exercées par la croissance du compartiment tumoral. L'impact de ce phénomène sur les cellules B de LF pourrait tout à fait être étudié dans notre modèle 3D en « post confluence des cellules », lorsque la capsule d'alginate est dilatée au point de se rompre, suite à la prolifération des cellules tumorales au contact des cellules stromales. Dans la moelle, les cellules de LF évoluent dans un espace contraint par les travées osseuses, mais ne comblent que très rarement l'ensemble de la logette <sup>77</sup> et survivent finalement dans un espace adipeux, dont on peut spéculer que les forces de compression soient plus faibles que dans le ganglion. De la même manière, dans la niche extra ganglionnaire ; les cellules évoluent dans un espace tissulaire sans capsule, limitant les contraintes mécaniques. De mon point de vue, ce phénomène de contraintes mécaniques est déterminant dans le comportement des cellules tumorales de LF et leur survie, et ce, indépendament la concentration/densité des cellules. D'ailleurs, nous n'avons pas observé de différence de densité cellulaire tumorale ou lymphocytaire T sur 15 patients entre les zones intra et extra ganglionnaires, et ces densités cellulaires n'étaient d'ailleurs pas corrélées entre les deux zones pour les 15 patients, suggérant que la concentration/densité cellulaire n'est pas le facteur déterminant du switch métabolique et de la prolifération moindre observés dans la zone extra ganglionnaire. Finalement, dans la moelle, comme dans la niche péri-ganglionnaire, les cellules prolifèrent moins, et semblent adopter un mécanisme de quiescence. Ainsi, dans les niches comportant des forces de compression moindres, on peut imaginer que les interactions B stroma soient renforcées pour maintenir un effet supportif plus important, ce qui pourrait expliquer l'augmentation d'expression de l'intégrine VCAM-1 et de CLU dans les follicules péri-ganglionnaires signalant une adhésion plus importante au stroma. De ce fait, sans pour autant affirmer formellement que les contraintes mécaniques soit le seul facteur impactant la survie, la prolifération, le métabolisme et les interactions avec le stroma des cellules tumorales, il n'est pas aberrant de supposer qu'elles influent largement sur leur comportement.

## 2. Un modèle d'étude qui permet d'étudier et de caractériser les FRCs dans l'ensemble des niches stromales du LF

Nous avons également observé dans le modèle de co-culture en 3D que les interactions B/stroma étaient menées par des modifications des voies de signalisations impactant le cycle cellulaire, avec notamment la voie de signalisation impliquant P53, MYC, et la voie TGF/SMAD3<sup>461</sup>. Il est important de souligner que nous avons co-cultivé avec les DOHH2 dans ce modèle des cellules stromales primaires d'amygdales de patients, dont la différentiation est assimilée à celle des FRCs d'amygdale<sup>78</sup> et de ganglion. Dans la niche tumorale ganglionnaire de LF, notre équipe a démontré que les cellules tumorales présentent des capacités d'interactions plus importantes, ainsi qu'une meilleure survie avec les FRCs physiologiques qu'avec les FDCs physiologiques, amenées à disparaitre ou se dédifférencier au cours de la lymphomagénèse<sup>117</sup> (**Figure 1**). Cette co-culture semble ainsi majoritairement mimer les interactions B/FRCs au sein de la niche intra ganglionnaire de LF. D'ailleurs, il existe une implication active de la voie de signalisation de MYC ainsi qu'une régulation du cycle cellulaire, dans les interactions B/stroma dans le modèle 3D qui sont clairement retrouvées modulées entre les deux niches tumorales intra et extra ganglionnaires.



 $\label{eq:Figure 1: A) Heatmap montrant le nombre d'interactions bidirectionnelles entre les cellules B de LF et les sous-populations stromales telles qu'évaluées à l'aide du référentiel CellPhoneDB . B) Les cellules B de LF ou les cellules B CG ont été co-cultivées pendant 7 jours ou 2 jours, respectivement, en présence ou en l'absence (milieu) de CD49a + PDPN (=podoplanine) + LSCs (FRCs) ou CD49a - PDPN+ LSCs avant de compter les lymphocytes viables (DAPI) par cytométrie de flux. Les couleurs représentent des expériences indépendantes (n = 8). *p < 0,05, **p < 0,01 (Mourcin et al).$ 

Nous savons d'autre part que les cellules stromales de type CAF sont majoritairement induites dans les tumeurs solides par la production de TGFb<sup>462</sup>. Notre hypothèse première quant à l'origine des FRCs présentes dans la niche tumorale du tissu adipeux serait qu'elles proviendraient de la polarisation des ASCs CD34+. Ces cellules sont des précurseurs des cellules stromales du tissu adipeux <sup>118</sup>. Notre équipe a récemment démontré que les cellules tumorales de LF étaient à l'origine d'une production importante de TGFb et de TNF<sup>171</sup>, suggérant que les ASCs du tissu adipeux encore non différenciées pourraient être polarisées en cellules stromales de phénotype CAF (phénotype suggéré par les résultats présentés plus haut dans les résultats) par ces facteurs grâce à la présence de cellules tumorales de LF. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions co-cultiver dans notre modèle 3D les ASCs, avec les cellules tumorales primaires de LF et étudier après extraction des cellules stromales, leur phénotype. En revanche, les cellules stromales de type FRCs dans la structure ganglionnaire initiale étant déjà polarisées, le phénotype pourrait rester relativement conservé, et résister plus facilement à une induction de type CAF par la production de TGFb et de TNF par les cellules tumorales. Il est vrai que nous n'avons pas réussi à montrer de véritable modulation phénotypique des Restos (TSCs) dans le modèle 3D au contact des DOHH2 aussi bien au niveau transcriptomique (par Q-PCR) que protéique (datas non publiées). Notre équipe a récemment montré une surexpression de CCL21 et de CCL19 par les FRCs et les FDCs dans les ganglions de LF<sup>117</sup>. Il serait intéressant de tester leur expression dans le système de co-culture 3D par un test ELISA, ce que nous n'avions pas réalisé. Dans ce même modèle, nous pourrions étudier le comportement des BMSCs (cellules stromales mésenchymateuses de la moelle) en étudiant d'une part leur induction phénotypique au contact des cellules primaires de LF et d'autre part, leurs interactions avec ces dernières. Nous pourrions par ce biais caractériser spécifiquement l'impact des différentes niches stromales sur les cellules B de LF et tenter de comprendre leurs interactions. D'autre part, le compartiment macrophagique pourrait constituer un acteur pertinent du microenvironnement dans ce modèle, la faisabilité d'une tri-culture en 3D ayant déjà été démontrée <sup>397</sup>.

Finalement dans ce modèle il est possible de caractériser les interactions B/FRCs dans le LF, dans les trois niches tumorales : la moelle osseuse, le ganglion, le tissu adipeux périadipeux.

Il convient cependant de mentionner une limite dans la caractérisation stromale de la niche du tissu adipeux péri-ganglionnaire: dans notre cette étude de la caractérisation des FRCs CD34+ qui a été réalisée en immunofluorescence, nous avons quantifié l'expression du CD34 dans les zones 1 et 2 : le CD34 est également exprimé par les cellules endothéliales. Il conviendrait donc de réaliser une étude supplémentaire de la quantification du CD34 sur les cellules stromales entre les deux zones en excluant les cellules endothéliales CD34+ à l'aide d'un autre anticorps spécifiquement exprimé par les cellules endothéliales, comme le CD31, par exemple. Cependant, pour un patient, j'ai tenté de caractériser la vascularisation entre les deux zones. (**Figure 2**). L'observation réalisée a été que les vaisseaux dans la zone 2 seraient plus nombreux mais plus petits que dans la zone 2 (**Figure 2b et 2c**), en revanche, l'aire totale de la surface



**Figure 2 :** Quantification des aires de surfaces marquées par le CD31 en immunofluorescence et représentation grâce à une échelle de couleur, pour la zone 1 (A) et pour la zone 2 (B).Représentation graphique pour la zone 1 (bleu) et pour la zone 2 (orange) du nombre de vaisseaux en fonction de leur surface analysée sur une coupe histologique en 2D. (n=1)

occupée par les vaisseaux entre les zones 1 et 2 est équivalente. Ces résultats seraient en accord avec une néoangiogénèse tumorale induite par l'installation de la tumeur dans la zone 2. Il conviendrait cependant de réaliser cette étude sur un nombre plus élevé de patients. D'autre part, même si les résultats attendus semblent relativement évidents pour un pathologiste, il conviendrait de réaliser tous les marquages réalisés sur les cellules stromales dans du tissu adipeux péri-ganglionnaire non envahi par les cellules tumorales, afin de confirmer la spécificité du microenvironnement de cette niche formée par la tumeur.

Enfin, concernant les différences stromales phénotypiques des FRCs entre les deux niches tumorales étudiées, il faut également mentionner une modulation de l'organisation architecturale du stroma: en effet à l'aide d'un pan-marqueur de stroma : la podoplanine, nous avons observé qu'il existait non seulement plus d'expression de cette protéine dans la zone 2, mais surtout que le réseau stromal était extrêmement densifié dans dans la zone 2, de part l'existence d'un maillage plus dense formé par les pseudopodes des cellules stromales (**Figure 3**). Cette organisation a sans nul doute un impact majeur sur l'organisation de ces deux niches stromales qu'il serait intéressant d'étudier aussi bien en 3D *in vitro* en co-cultivant soit les ASCs, soit les Restos (TSCs) avec les cellules primaires de LF, qu'*in vivo* par des marquages *in situ* sur ganglion tumoral transparisé par la méthode CLARITY (**Figure 4**).

Enfin, concernant les différences entre les deux niches tumorales étudiées, il faut également mentionner que l'organisation architecturale du stroma semble modulée: en effet à l'aide d'un pan-marqueur de stromal : podoplanine, nous avons observé qu'il existait non seulement plus d'expression de cette protéine dans la zone 2, mais surtout que le réseau stromal était extrêmement densifié, de part l'existence d'un maillage plus étroit formé par les pseudopodes des cellules stromales. Cette organisation a sans nul doute un impact majeur sur l'organisation de ces deux niches stromales qu'il serait intéressant d'étudier aussi bien en3D *in vitro* dans le modèle 3D de billes d'alginate en co-cultivant soit les ASCs, soit les Restos (TSCs) avec les cellules primaires de LF, qu'in *vivo* par des marquages *in situ* sur ganglion tumoral transparisé par la méthode CLARITY (**Figure 4**). Comme indiqué figure 4, on peut aborder l'hétéogénéité intra folliculaire des FDCs de LF juste de par leur organisation architecturale au sein du follicule.



**Figure 3 :** Organisation du réseau stromal au sein de la zone 1 et de la zone 2 : Marquage par immunofluorescence du CCL21 en rouge et de la podoplanine en bleu dans les zones 1 (A) et 2 (B). Représentation du maillage formé par le réseau de podoplanine et de l'orientation dans l'espace en 2 dimensions des pseudopodes induits (représentés par une échelle de couleur dans les zones 1 (C) et 2 (D). Représentation du nombre de pseudopodes induits par cellules stromales et du nombre de connections pour chacune d'entre elles, dans chaque zone, en fonction de leur surface totale. (n=1)



**Figure 4 :** (A) Immunofluorescence représentant le stroma et les vaisseaux au sein des follicules tumoraux de LF par un marquage Collagène IV (rouge). Ces images ont été obtenues après transparisation d'une coupe épaisse de 5 mm grâce à la méthode CLARITY (B) Représentation avec une échelle de couleurs du nombre de connections dans les 3 dimensions entre les pseudopodes formés par les cellules stromales au sein du follicule tumoral de droite représenté en A. (n=1).

## 3. Les FDCs dans le LF : pourquoi leur hétérogénéité nous échappe t-elle encore:

Notre équipe et d'autres ont identifié une hétérogénéité inter patients des FDCs (Figure 5A) ; mais également une hétérogénéité intra-patient (**Figure 5B et 5C**) entre les follicules du ganglion, ainsi qu'une hétérogénéité intra folliculaire (**Figure 5B**)<sup>117,380</sup>. La perte de polarisation relative du CG dans le LF <sup>305</sup> n'empêche donc pas une hétérogénéité de répartition des FDCs, ainsi que de la formation de leur réseau et de leur organisation, comme nous pouvons le constater **Figure 5** <sup>117</sup>. Nous n'avons pas identifié de différence en termes de quantification de l'anticorps de FDCs l'anti-CD21 entre les deux zones, suggérant que le degré d'hétérogénéité des FDCs ne doit pas être étudié à l'échelle des deux niches tumorales intra et extra ganglionnaires, mais aux échelles folliculaire et intra folliculaire.



**Figure 5:** (A) Les patterns de FDCs ont été classés en fonction de l'expression de CD21 par immunohistofluorescence. Les coupes de tissu de LF ont été marquées par l'anti CCL21 (rouge) et l'anti-CD21 (blanc). Les noyaux ont été contre-colorés avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle, 250  $\mu$ m. Le réseau de CCL21 a été classé sur Tissu Micro Array (TMA) contenant 115 échantillons de LF en fonction de l'intégrité du réseau : dense, perturbé et absent. (B) Quantification de l'expression de CCL21 sur des sections de ganglions de LF et d'amygdales. À gauche : les sections de tissu ont été marquées par un anti- CCL21 (rouge) et CD21 (vert). Les noyaux ont été contre-colorés avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle, 250  $\mu$ m. À droite : analyse quantitative de l'expression de CCL21 sur TMA n= 115 LF et sur 18 amygdales. Les barres représentent la moyenne ± SD. \*\*\*=p < 0.001.(C et D) Analyse de la colocalisation de CCL21 (rouge) et CD21 (vert) sur une section de LF (F) et sur une section d'amygdale (G). Barre d'échelle, 250  $\mu$ m. Les encadrés représentent un plus fort grossissement (barre d'échelle, 50  $\mu$ m). La couleur blanche indique la colocalisation entre CCL21 et CD21<sup>117</sup>

Nous avons tenté de caractériser l'hétérogénéité intra folliculaire définie par les FDCs dans le LF avec la technologie DSP. Cependant, si nous identifions des différences en terme d'expression de gènes propres aux FDCs (*NGFR-1, CXCL13, FCER2*), aux TFHs (*PD1, IL4, ICOS*,), et au recrutement et à la différentiation des macrophages (*CCL22, IL6, CCR2, MARCO, CD68*) (**Figure 7**), dans les 5% de gènes les plus surexprimés dans la zone contenant les FDCs, nous observons très peu de gènes d'intérêt caractérisant véritablement un profil phénotypique

particulier des cellules B de LF répondant à ce microenvironnement. Ceci pourrait certainement être dû au fait d'un manque de sensibilité de la technologie DSP à mon sens pour quatre raisons : la première est que les sondes hybridées à chaque gène et couplées à un fluorophore ou un barre code seront reconnues et quantifiées sans amplification de signal. Ainsi, les différences minimes d'expression entre les deux zones très enrichies en cellules tumorales proches phénotypiquement risquent de ne pas être détectées. La deuxième, est que le panel de sondes est dédié uniquement à la détection de 1800 gènes, et certaines semblent plus destinées à l'étude des tumeurs solides que des lymphomes. La dernière raison est que j'avais entrepris la sélection de mes zones avec un anticorps anti-CD23. Or pour un autre projet, j'ai observé que dans le LF, ce marqueur était perdu bien après le CD21 sur les FDCs, ainsi, j'ai peut-être sélectionné des zones de FDCs déjà avancées dans une dédifférentiation, rendant les zones contenant les FDCs CD23+ plus proches des zones CD23-, en terme de phénotype stromal et d'identité tumorale (**Figure 6**).



**Figure 6** : Représentation de la perte progressive des expressions de CD21, CD23 et NGFR-1 dans les follicules tumoraux du ganglion de LF (A) L'expression de CD21 en immunofluorescence est hétérogène dans les différents follicules du patient (vert). (B) Ce même patient présente encore des expressions de NGFR -1 (jaune) et CD23 (bleu cyan) lorsque le CD21 est perdu (Immunohistochimie). (C) Analyse sur 105 patients de l'expression de CD21, CD23 et NGFR-1 dans les FDCs de LF.

Ces résultats concordent avec le fait que la protéine CD23 (codée par FCER2) soit exprimée suite à une induction par IL4 <sup>463</sup> qui est surexprimé dans la zone de FDCs (**Figure 7**). D'ailleurs; dans la zone extra ganglionnaire, il existe une diminution concomittente de l'expression de *FCER2* et de *IL4R* dans les follicules par rapport à la zone intra-ganglionnaire (cf résultats).

Les rôles de NGFR-1 et de CD23 dans le LF restent cependant à déterminer. Il est important de noter que tous ces patients ne présentaient pas d'expression protéique en immunofluorescence de CD23 sur les cellules tumorales de LF.

Une question qui se profile également concerne l'origine des FDCs dans la niche extra ganglionnaire. En effet la nature de leurs précurseurs et leur origine chez l'humain reste encore débattue dans le ganglion. Il a été démontré chez la souris qu'au cours de l'inflammation, ce sont les MRCs sous la capsule qui seraient capables de se différencier en FDCs<sup>119</sup>. Ces dernières seraient ensuite capables de migrer au centre des follicules pour former les follicules secondaires. Dans le lymphome angio-immunoblastique (LAI), on observe une prolifération caractéristique des HEVs entourés par une expansion des FDCs. Il a été suggéré que les cellules stromales entourant ces vaisseaux se différenciaient en FDCs après le recrutement local de TFHs néoplasiques <sup>464–466</sup>. Cette origine péri-vasculaire a déjà été identifiée dans la rate. De plus, il est bien établi que la LT (augmentée dans les TFH et les immunoblastes du LAI<sup>467</sup>) et/ou le TNFa jouent un rôle crucial dans le maintien de la plupart des caractéristiques des FDCs <sup>428</sup>. Dans le lymphome folliculaire, les FDCs perdent souvent leurs marqueurs de spécificité malgré un maintien intra folliculaire du compartiment TFH <sup>468</sup>, et une production de TNF<sup>457</sup>. Mais l'inhibition de la production de LT par les cellules B tumorales de LF pourrait conduire à la disparition des marqueurs de différentiation des FDCs <sup>428</sup>, malgré la présence de TFHs. D'autre part, ces dernières n'ont jamais été cultivées in vitro, la perte de leur phénotype étant presque immédiate après leur mise en culture malgré la présence de TNF/LT (data non montrées), et aucune équipe n'a réussi à induire un phénotype stromal de type FDC en cocultivant des cellules tumorales de LF avec des précurseurs mésenchymateux. L'ensemble de ces données suggère que des facteurs clés de leur polarisation nous sont encore inconnus, et que ces cellules auraient tendance à être déjà présentes à l'initiation de la niche tumorale, pour ensuite proggressivement disparaitre. Nous avons montré qu'il n'existait pas de différence d'expression du CD21 entre les deux zones 1 et 2. Nous savons cependant que la présence de FDCs dans la zone 1 est dûe au fait que ces dernières soient initialement physiologiquement présentes dans la structure ganglionnaire. Elles perdent ensuite progressivement leur différentiation. Une première hypothèse quant à la raison de la localisation des FDCs dans les follicules tumoraux du tissu adipeux serait que les follicules tumoraux dans la niche tumorale péri ganglionnaire seraient la conséquence de la colonisation de TLS (tertiary lymphoïdes structures) par les lymphocytes B de LF surexprimant de base le récepteur CCR7<sup>117</sup>.





**Figure 7 :** Représentation par une Heatmap des 5% des gènes les plus variants et surexprimés dans la zone intrafolliculaire comportant des FDCs, sélectionnée par l'anti CD23 par rapport à la zone sans FDCs du même follicule. Analyse réalisée sur 3 follicules de LF du même patient.

En effet, il serait tentant de spéculer que la présence de FDCs dans les follicules résulterait de la formation de follicules réactionnels formés initialement en périphérie de la tumeur, comme ils le seraient en périphérie d'une tumeur solide. Ces structures dans les tumeurs solides permettent de recruter de manière massive des lymphocytes T CD8 par la production de CCL21 aux pourtours de la tumeur et seraient donc de bon pronostic lorsqu'elles sont dites « matures », c'est à dire qu'elle comprenent aussi bien des HEVs, des FDCs des DCs et des lymphocytes B et T avec une capacité de maturation antigénique par la présence de l'AID <sup>469,470</sup>. Nous n'avons cependant pas vérifié la présence de HEVs et de CDs dans cette niche.

Les TLS peuvent être présents dans la plupart des organes suite à une inflammation chronique ou au cours d'un processus de cancérogénèse. Dans ces strustures, il est identifié que les précurseurs seraient des LTo (lymphoide tissue organizers) et des cellules inductrices du tissu lymphoïde LTi (lymphoid tissue inducers).

Les LTi ont été décrites pour la première fois chez la souris comme une population fœtale de cellules hématopoïétiques, essentielle à l'organogenèse lymphoïde secondaire <sup>471–474</sup>. Les cellules LTi sont des cellules CD45+ CD4+ CD3- c-Kit+ interleukin 7 receptor- $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ )+ ID2+ RORyt+ qui dérivent d'un progéniteur commun trouvé dans le foie <sup>475,476</sup>. La présence indispensable des cellules LTi dans le développement des ganglions a été démontrée par l'absence totale de ganglions chez les animaux génétiquement déficients en gène requis pour le développement et la maturation des LTi : Rorc, qui code le facteur de transcription RORyt (retinoic acid receptor-related orphan receptor-yt), et Id2, qui code la protéine hélicoïdale inhibitrice de la liaison à l'ADN 2 (ID2)<sup>477-479</sup>. La fonction des cellules LTi dans l'initiation du développement du ganglion dépend de leur expression de LTa1B2<sup>123,476-479</sup>. Cependant, plusieurs études ont maintenant fourni des preuves soutenant l'idée que les TLS peuvent se développer en l'absence de cellules LTi. Marinkovic et ses collègues ont utilisé un modèle de souris dans lequel la surexpression de CCL21 dans la thyroïde entraîne la formation de TLS<sup>480</sup>. La délétion de *Id2* a entraîné l'absence de ganglion et de plaques de Peyer, mais n'a eu aucun effet sur le développement de TLSs dans la thyroïde des animaux surexprimant CCL21. Les auteurs ont montré que les cellules T CD3+ CD4+ matures étaient absolument nécessaires pour instruire le développement des TLS et ont suggéré que ces cellules interagissaient avec les CDs pour initier leur formation  $^{480}$ . De façon intéressante, les souris TNF/Rorc( $\gamma$ t)-/- démontrent le développement non seulement de certains SLO mais aussi de TLS en l'absence de cellules LTi, à condition que la signalisation TNF $\alpha$  soit augmentée. Nous savons que les cellules tumorales de LF produisent des niveaux élevés de TNF et que la production de CCL21 <sup>117</sup>est augmentée dans les ganglions de LF, pouvant à l'initiation de la rupture capsulaire induire la formation de TLS.

Cependant, la diminution des expressions de CCL21, de CXCL13 et l'augmentation du contexte immunosuppressif dans la zone extra ganglionnaire, montre soit que ces structures ont été remodelées suite au recrutement des cellules tumorales à partir de la structure ganglionnaire, soit que cette hypothèse est complètement erronée.

Une autre hypothèse serait qu'un phénomène un peu similaire à celui de la niche tumorale de la moelle se produise: en effet dans la moelle, toute structure lymphoïde tertiaire ectopique comme décrit dans l'introduction se localiserait au centre des travées <sup>481</sup>, ce qui n'est pas le cas des follicules tumoraux de LF qui sont de localisation paratrabéculaire et contiennent pourtant des FDCs. Il apparait donc peu probable que les cellules tumorales aient colonisé des TLS initialement formées dans la moelle. Dumontet et al suggère que des vésicules extracellulaires dérivées des cellules de LF (EV) polarisent à distance, à partir des ganglions tumoraux, les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse non envahie chez les patients atteints de LF, leur conférant une signature transcriptomique associée à la voie signalisation canonique TGFβ-SMAD et non canonique TGFβ-p38<sup>482</sup>. Il est suggéré que cette polarisation initiale des cellules stromales de la moelle par les vésicules extracellulaires permet une infiltration ultérieure des cellules de LF. D'autre part ; le TGFß a été signalé comme étant un facteur clé de la quiescence des CSHs et notre équipe a montré que les cellules de LF dans la moelle présentaient une prolifération moindre, ainsi qu'une diminution de l'activité métabolique ; comme nous l'avons montré dans le tissu adipeux péri ganglionnaire. Ce serait secondairement les cellules tumorales qui polariseraient localement les précurseurs mésenchymateux par un mécanisme encore non identifié, et d'ailleurs, les co-cultures BMSCs/ B de LF n'ont en rien reproduit un phénotype spécifiquement FDC jusqu'à maintenant. Nous savons finalement peu de choses sur la différentiation des cellules stromales de type FDCs dans les niches adipeuses médullaire et péri ganglionnaire mais la capacité de mobilité des cellules stromales a bien été étudiée. En effet, les cellules stromales auraient de meilleures capacités de migration dans des milieux contenant une matrice extra cellulaire plus dense, comprimant le noyau et incitant l'activation de la voie Rock et des faisceaux d'actine 483 pour activer une migration plus rapide et plus efficace. Ce phénomène se produit probablement lors du recrutement de cellules stromales FDCs à partir de la différenciation des MRCs dans les follicules réactionnels <sup>119</sup>, suite à l'expansion du compartiment lymphocytaire dans l'inflammation. De ce fait, le recrutement des FDCs dans les structures extra ganglionnaires pourrait résulter de la migration des FDCs. Enfin, une dernière possibilité qui à mon sens s'avère être la plus probable serait une co-migration des cellules tumorales avec les FDCs. En effet ce phénomène a déjà été décrit dans les tumeurs solides grâce à la production de TGFb1<sup>484</sup>.



**Figure 8 :** Immunofluorescence montrant des emboles tumoraux de cellules tumorales de LF au contact de cellules stromales FDCs exprimant CD21.Les cellules endothéliales expriment CD34 en rouge, et l'ensemble des vaisseaux sont marqués par le marqueur collagène IV Les FDCs expriment CD21. Les cellules tumurales exprimant BCL2 et CD20 sont retrouvés dans les vaisseaux. Les flèches blanches indiquent le reseau de FDC au contact des cellules tumorales dans les vaisseaux (n=2) Echelle=100µm

Sur 15 patients analysés j'ai pu constater que les cellules tumorales de LF étaient colocalisées dans les vaisseaux avec les cellules stromales FDCs (**Figure 8**). Ces images peuvent suggérer une co-migration des cellules tumorales et stromales vers la moelle et le tissu adipeux. Ce phénomène était reproduit chez 4 patients. D'autre part, j'ai observé de nombreuses images de follicules tumoraux infiltrant la capsule ganglionnaire comme observé **Figure 9**.



**Figure 9 :** Immunofluorescence montrant les follicules tumoraux contenant des FDCs marqués par l'anti-CD21. La capsule est marquée par l'anti- CD34 et les FRCs par l'anti- collagène 1A et l'anti- CD34. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI)

## B. Deux niches microenvironnementales déterminant un profil d'expression tumoral particulier.

Nous savons que la rupture capsulaire est à l'origine de cette invasion péri folliculaire, nous pouvons ainsi émettre deux hypothèses quant à l'ancienneté et l'agressivité des cellules tumorales évoluant au sein de ce microenvironnement adipeux: soit les cellules tumorales invasives sont des cellules comportant peu d'altérations génétiques, constituant plutôt des précurseurs, soit ces cellules sont des cellules à un stade tumoral avancé, ayant accumulé des anomalies génétiques au sein de la structure ganglionnaire initiale. Dans le ganglion, le plus ancien précurseur tissulaire identifiable des LFs est la néoplasie folliculaire *in situ* (FLIS),

définie comme la colonisation du CG par une population monoclonale de cellules B t(14;18)+ dans des tissus lymphoïdes par ailleurs réactifs <sup>485,486</sup>. Le FLIS peut survenir de manière synchrone ou métachrone avec le LF, mais peut également être trouvé chez des individus sans antécédent de lymphome <sup>487,488</sup>. Le risque de progression semble être faible <sup>488</sup>. Bien que le FLIS soit considéré comme une lésion précurseur, elle présente déjà des altérations génétiques drivers typiquement associées au LF, affectant en particulier les gènes modificateurs de la chromatine tels que CREBBP, et moins fréquemment KMT2D et EZH2 489-491. Des FLIS clonalement apparentées peuvent également être présentes même des années après la transformation maligne, représentant très probablement un sous-clone qui a divergé à un stade plus précoce de la maladie <sup>492</sup>. Les précurseurs persistants, vraisemblablement plus résistants à la chimiothérapie, peuvent donc également jouer un rôle dans la rechute du lymphome. En effet, des études sur les rechutes de LF et de DLBCL ont montré que le lymphome primaire et le lymphome récidivant représentent souvent des sous-clones divergents qui sont apparus indépendamment à partir d'un progéniteur commun, ce qui soutient à nouveau l'hypothèse selon laquelle le contingent cellulaire agressif peut se développer directement à partir d'un précurseur CPC <sup>493</sup>. L'existence de telles populations de progéniteurs a été illustrée dans deux tumeurs de LF clonalement apparentées apparaissant à la fois chez le donneur et le receveur après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques et de DLI (donor lymphocytes infusion).<sup>282,294</sup>. Les lymphomes apparentés présentaient de multiples altérations communes, qui ont donc été acquises avant la transplantation. Du fait que les DLI présentaient des altérations génétiques retrouvées dans le LF des deux individus, on peut supposer que les CPCs présentent de grandes capacités de dissémination. En outre, les altéartions génétiques communes retrouvées également dans les CSHs des deux individus suggèrent que la moelle pourraient héberger ces précurseurs. Cette hypothèse rejoind le fait que les CPCs soient apparentés au stade de maturation des lymphocytes B mémoire<sup>494</sup> et il est tentant de spéculer que cette niche adipeuse puisse héberger, à l'image de la moelle, ou des follicules de FLIS des précurseurs avec un potentiel d'agressivité. Pour répondre à cette question, nous avons caractérisé les transcriptomes de 2 follicules réactionnels (1 patient) et de 3 follicules de FLIS (1 patient), par DSP pour les comparer à 3 follicules tumoraux du tissu adipeux (1 patient) et 3 follicules tumoraux (1 patient) dans la structure intra ganglionnaire. Nous avons ensuite analysé les 5% de gènes les plus variants. Les points communs observés entre les follicules de FLIS et les follicules de la zone 2, par rapport à la zone 1 sont une diminution de l'activité et de la présence de l'environnement T cytotoxique (CD8A, TDRC, TNFSF9, CCR7, BTLA, IL7R, GRZB, HLA-DR, CCL21, MARCO), une diminution de MYC, un fort environnement FDC like
avec la surexpression des gènes CLU, V-CAM1, mais une diminution de CXCL13 (**Figure 10 et 11**). Enfin, de manière intéressante, il existe une surexpression de CD27, un marqueur de différentiation des lymphocytes B mémoires dont il serait intéressant de confirmer qu'il s'agit bien d'une augmentation du compartiment des lymphocytes tumoraux au stade B mémoire. L'ensemble de ces données suggère que ce microenvironnement est propice pour permettre l'établissement de la tumeur aussi bien dans les follicules de FLIS que dans les follicules tumoraux du tissu adipeux péri ganglionnaire, formés très probablement après la tumeur développée dans la structure ganglionnaire. D'autre part, l'existence de cellules tumorales au stade de lymphocyte B mémoire peut faire suggérer la présence de CPCs dans cette niche adipeuse.



**Figure 10 :** Heatmap correspondant aux expressions en log2 fold change des 5% de gènes les plus variant et les plus exprimés dans zone 2 par rapport à la zone 1 et analyse de l'expression de ces gènes dans 3 follicules tumoraux

de FLIS et 2 centres germinatifs physiologiques.



**Figure 11:** Heatmap correspondant aux expressions en log2 fold change des 5% de gènes les plus variants et les moins exprimés dans zone 2 par rapport à la zone 1 et analyse de l'expression de ces gènes dans 3 follicules tumoraux de FLIS et 2 centres germinatifs physiologiques.



**Figure 12:** Représentation de la modulation des interactions entre les lymphocytes B tumoraux de LF et sa niche tumorale au sain de la zone 2. Représentation de la modulation de certains de ces gènes dans le FLIS par rapport à la zone 1. Les lymphocytes B de LF (FL-B CELLS) voient une diminution de leur prolifération et de leur métabolisme due en partie à la polarisation des cellules stromales par IDO et IFNg produits par les lymphocytes T CD8 qui expriment des niveaux moindres de facteurs impliqués dans une activité cytotoxique. Les cellules stromales ASCs sont polarisées en phénotype de type CAF, en périphérie du follicule, certainement de par la production de TGFb par les cellules tumorales. De même, Le collagène 1A est clivé par FAP pour permettre le recrutement de macrophages de type M2 qui sont polarisés et recrutés grâce à la production d'IL6, de CCL2, et de CCL5 par les cellules stromales stimulées par Granzyme K produit par les lymphocytes T8. La mobilité des cellules tumorales est diminuée dans cette niche avec une diminution de production de CCR7, CCL21, CXCL13. Les macrophages de type M2 expriment SIRP alpha qui bloque l'activité de phagocytose des cellules B tumorales de LF.

## C. Perspectives

Suite à ces résultats, nous devons considérer que les CPCs peuvent être finalement protégés par un microenvironnement spécifique modulé par les différentes lignes thérapeutiques pour faciliter la rechute ou la transformation (Figure 12). La rechute est un phénomène fréquemment observé dans le LF après 6 à 7 ans de survie sans progression. D'autre part nous savons actuellement que la réponse aux thérapeutiques est largement influencée par l'expression phénotypique, modulée par le microenvironnement au-delà des altérations génétiques <sup>425,426</sup>. Il a été identifié en effet, une diminution de l'activité immunosuppressive, ainsi qu'une diminution de la densité en lymphocytes pouvant persister jusqu'à deux ans après chaque ligne de chimiothérapie <sup>495–497</sup>. La survie sans progression diminue après chaque ligne thérapeutique additionnelle <sup>498,499</sup>.Les thérapies ciblées comme l'anti CD20 rituximab augmentent les phénomènes de cytotoxicité à médiation cellulaire (ADCC) par les cellules NK sur les cellules tumorales. En revanche, son efficacité est largement dépendante de l'abondance ainsi que de la nature de l'environnement immun <sup>500,501</sup>. Ce traitement détourne en revanche le rôle des macrophages CD163+ du microenvironnement vers une cytotoxicité dépendante de la médiation cellulaire 361,502, inversant le pronostic initialement défavorable d'un microenvironnement riche en macrophages. Les inhibiteurs de la PI3K (qui rééduquent les macrophages vers un phénotype anti-tumoral <sup>503</sup>) présentent une efficacité significative dans le LF récidivant/réfractaire, et trois d'entre eux sont actuellement approuvés aux États-Unis : l'Idelalisib, le Copanlisib et le Duvelisib 504-506. Il a d'autre part été montré que les FDCs et les macrophages augmentent la dépendance de la tumeur à BCL-XL et MCL-1 ou à BFL-1, respectivement, ce qui limite l'activité cytotoxique de l'inhibiteur de BCL-2 Venetoclax <sup>507,508</sup>. L'Idélalisib rétabli cette dépendance à BCL-2, ainsi que l'activité du Venetoclax <sup>506</sup>. D'autre part, par des mécanismes complémentaires, le Lénalidomide et le Rituximab induisent une cytotoxicité à médiation immunitaire vis-à-vis ds cellules tumorales. Le Lénalidomide en

monothérapie chez les patients en rechute entraîne une augmentation de l'activation et de la prolifération des cellules NK et des lymphocytes T, ainsi qu'une amélioration de la formation des synapses immunitaires. L'association du Lénalidomide et du Rituximab entraîne une augmentation de l'apoptose tumorale <sup>509</sup> ainsi qu'une efficacité de la réponse effectrice T <sup>510</sup>. La thérapie anti-PD-1 avec le Pembrolizumab fonctionne chez les patients en rechute qui présentent une population lymphocytaire T « épuisée » exprimant TIGIT, en restaurant leur phénotype actif par le biais du co-récepteur CD28 dans la réponse au traitement <sup>511</sup>. Ces résultats soulignent l'importance, pour l'efficacité thérapeutique, de connaître la nature du microenvironnement macrophagique, stromal et T sans négliger l'hétérogénéité des différentes niches et ce finalement dès l'initiation de la prise en charge. Le test de ces thérapies dans le modèle de billes d'alginate mimant la niche tumorale extra-ganglionnaire semble pertinent et ouvre la perspective d'évaluer un microenvironnement tumoral probablement propice à l'hébergement de CPCs suceptibles d'entrainer la rechute ou la transformation de la maladie dès le diagnostic.

## BIBLIOGRAPHIE

- Travlos, G. S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.* 34, 548–565 (2006).
- Sipkins, D. A. *et al.* In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumor engraftment. *Nature* 435, 969–973 (2005).
- de Saint-Georges, L. & Miller, S. C. The microcirculation of bone and marrow in the diaphysis of the rat hemopoietic long bones. *Anat. Rec.* 233, 169–177 (1992).
- Gao, X. *et al.* Nociceptive nerves regulate haematopoietic stem cell mobilization. *Nature* 589, 591–596 (2021).
- Katayama, Y. *et al.* Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* **124**, 407–421 (2006).
- Maryanovich, M. *et al.* Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. *Nat. Med.* 24, 782–791 (2018).
- Lo Celso, C. *et al.* Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 457, 92–96 (2009).
- 8. Nakamura, Y. *et al.* Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood* **116**, 1422–1432 (2010).
- Morikawa, S. *et al.* Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J. Exp. Med.* 206, 2483–2496 (2009).
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T. & Quiñones-Hinojosa, A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161 (2010).
- Chabi, S. *et al.* Hypoxia Regulates Lymphoid Development of Human Hematopoietic Progenitors. *Cell Rep.* 29, 2307-2320.e6 (2019).
- Wielockx, B., Grinenko, T., Mirtschink, P. & Chavakis, T. Hypoxia Pathway Proteins in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Cells* 8, (2019).

- Acar, M. *et al.* Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* 526, 126–130 (2015).
- Spencer, J. A. *et al.* Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508, 269–273 (2014).
- Christodoulou, C. *et al.* Live-animal imaging of native haematopoietic stem and progenitor cells.
   *Nature* 578, 278–283 (2020).
- 16. Adams, G. B. *et al.* Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calciumsensing receptor. *Nature* **439**, 599–603 (2006).
- Lam, B. S., Cunningham, C. & Adams, G. B. Pharmacologic modulation of the calcium-sensing receptor enhances hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow. *Blood* 117, 1167–1175 (2011).
- Wilkins, B. S. Histology of normal haemopoiesis: bone marrow histology. I. J. Clin. Pathol. 45, 645–649 (1992).
- 19. Hillman, R. S. & Finch, C. A. Erythropoiesis. N. Engl. J. Med. 285, 99–101 (1971).
- Schürch, C. M., Caraccio, C. & Nolte, M. A. Diversity, localization and (patho)physiology of mature lymphocyte populations in the bone marrow. *Blood* (2021) doi:10.1182/blood.2020007592.
- Glatman Zaretsky, A. *et al.* T Regulatory Cells Support Plasma Cell Populations in the Bone Marrow. *Cell Rep.* 18, 1906–1916 (2017).
- 22. Zehentmeier, S. *et al.* Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2306–2317 (2014).
- 23. Cassese, G. *et al.* Plasma Cell Survival Is Mediated by Synergistic Effects of Cytokines and Adhesion-Dependent Signals. *J. Immunol.* **171**, 1684–1690 (2003).
- O'Connor, B. P. *et al.* BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells.
   *J. Exp. Med.* 199, 91–98 (2004).

- 25. Belnoue, E. *et al.* APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* **111**, 2755–2764 (2008).
- 26. Riedel, R. *et al.* Discrete populations of isotype-switched memory B lymphocytes are maintained in murine spleen and bone marrow. *Nat. Commun.* **11**, 2570 (2020).
- 27. Agbay, R. L. M. C. *et al.* Characteristics and clinical implications of reactive germinal centers in the bone marrow. *Hum. Pathol.* **68**, 7–21 (2017).
- 28. Zeng, D. *et al.* Unique patterns of surface receptors, cytokine secretion, and immune functions distinguish T cells in the bone marrow from those in the periphery: impact on allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **99**, 1449–1457 (2002).
- 29. Alp, Ö. S. *et al.* Memory CD8+ T cells colocalize with IL-7+ stromal cells in bone marrow and rest in terms of proliferation and transcription. *Eur. J. Immunol.* **45**, 975–987 (2015).
- 30. Kieper, W. C. *et al.* Overexpression of Interleukin (IL)-7 Leads to IL-15–independent Generation of Memory Phenotype CD8+ T Cells. *J. Exp. Med.* **195**, 1533–1539 (2002).
- Schürch, C. M., Riether, C. & Ochsenbein, A. F. Cytotoxic CD8+ T Cells Stimulate Hematopoietic Progenitors by Promoting Cytokine Release from Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells. *Cell Stem Cell* 14, 460–472 (2014).
- Pronk, C. J. H., Veiby, O. P., Bryder, D. & Jacobsen, S. E. W. Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. *J. Exp. Med.* 208, 1563–1570 (2011).
- Migliaccio, G., Migliaccio, A. & Visser, J. Synergism between erythropoietin and interleukin-3 in the induction of hematopoietic stem cell proliferation and erythroid burst colony formation. *Blood* 72, 944–951 (1988).
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, e925135 (2012).
- 35. Pierini, A. *et al.* Foxp3+ regulatory T cells maintain the bone marrow microenvironment for B cell lymphopoiesis. *Nat. Commun.* **8**, 15068 (2017).

- Adams, E. J., Gu, S. & Luoma, A. M. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cell. Immunol.* 296, 31–40 (2015).
- Askenase, M. H. *et al.* Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* 42, 1130–1142 (2015).
- 38. Yu, Y. *et al.* Single-cell RNA-seq identifies a PD-1hi ILC progenitor and defines its development pathway. *Nature* **539**, 102–106 (2016).
- 39. Griffith, J. F. *et al.* Bone marrow fat content in the elderly: a reversal of sex difference seen in younger subjects. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **36**, 225–230 (2012).
- Ambrosi, T. H. *et al.* Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell* 20, 771-784.e6 (2017).
- 41. Marrow Fat and Bone—New Perspectives | The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism | Oxford Academic. https://academic.oup.com/jcem/article/98/3/935/2536547?login=true.
- 42. Justesen, J. *et al.* Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* **2**, 165–171 (2001).
- 43. Bilwani, F. A. & Knight, K. L. Adipocyte-derived soluble factor(s) inhibits early stages of B lymphopoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **189**, 4379–4386 (2012).
- Yokota, T. *et al.* Adiponectin, a Fat Cell Product, Influences the Earliest Lymphocyte Precursors in Bone Marrow Cultures by Activation of the Cyclooxygenase-Prostaglandin Pathway in Stromal Cells. *J. Immunol.* **171**, 5091–5099 (2003).
- 45. Naveiras, O. *et al.* Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259–263 (2009).
- 46. Moitra, J. et al. Life without white fat: a transgenic mouse. Genes Dev. 12, 3168–3181 (1998).
- 47. Boyd, A. L. *et al.* Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. *Nat. Cell Biol.* **19**, 1336–1347 (2017).

- 48. Miggitsch, C. *et al.* Human bone marrow adipocytes display distinct immune regulatory properties. *EBioMedicine* **46**, 387–398 (2019).
- 49. Rangel-Moreno, J. *et al.* Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity* **30**, 731–743 (2009).
- Mattiucci, D. *et al.* Bone marrow adipocytes support hematopoietic stem cell survival. *J. Cell. Physiol.* 233, 1500–1511 (2018).
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977–988 (2006).
- 52. Ding, L. & Morrison, S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231–235 (2013).
- Hsu, Y.-M. S. *et al.* CXCL12 Production by Early Mesenchymal Progenitors Is Required for Hematopoietic Stem Cell Maintenance. *Blood* 120, 510–510 (2012).
- 54. Chen, Z. *et al.* Chm-1 gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells maintain the chondrogenic phenotype of tissue-engineered cartilage. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 70 (2016).
- 55. Kiel, M. J. *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109–1121 (2005).
- 56. Al-Sabah, J., Baccin, C. & Haas, S. Single-cell and spatial transcriptomics approaches of the bone marrow microenvironment. *Curr. Opin. Oncol.* **32**, 146–153 (2020).
- 57. Wolock, S. L. *et al.* Mapping Distinct Bone Marrow Niche Populations and Their Differentiation Paths. *Cell Rep.* **28**, 302-311.e5 (2019).
- 58. Tikhonova, A. N. *et al.* The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature* **569**, 222–228 (2019).
- Omatsu, Y. *et al.* The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity* 33, 387–399 (2010).

- Méndez-Ferrer, S. *et al.* Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 20, 285–298 (2020).
- Baryawno, N. *et al.* A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell* **177**, 1915-1932.e16 (2019).
- Méndez-Ferrer, S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829–834 (2010).
- 63. Kunisaki, Y. *et al.* Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 502, 637–643 (2013).
- Armulik, A., Genové, G. & Betsholtz, C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev. Cell* 21, 193–215 (2011).
- Calvi, L. M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846 (2003).
- 66. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. Nat. Rev. Cancer 16, 582–598 (2016).
- 67. Taichman, R. S. & Emerson, S. G. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **179**, 1677–1682 (1994).
- Taichman, R., Reilly, M., Verma, R., Ehrenman, K. & Emerson, S. Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors. *Br. J. Haematol.* **112**, 438–448 (2001).
- 69. Stier, S. *et al.* Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J. Exp. Med.* **201**, 1781–1791 (2005).
- 70. Ulyanova, T. *et al.* VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin. *Blood* 106, 86–94 (2005).
- Zhang, J. *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size.
   *Nature* 425, 836–841 (2003).

- 72. Arai, F. *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149–161 (2004).
- 73. Yoshihara, H. *et al.* Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* **1**, 685–697 (2007).
- 74. Fleming, H. E. *et al.* Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* **2**, 274–283 (2008).
- 75. Cho, S. H. *et al.* Germinal centre hypoxia and regulation of antibody qualities by a hypoxia response system. *Nature* **537**, 234–238 (2016).
- Krautler, N. J. *et al.* Follicular Dendritic Cells Emerge from Ubiquitous Perivascular Precursors. *Cell* 150, 194–206 (2012).
- 77. Canioni, D. *et al.* Bone marrow histological patterns can predict survival of patients with grade 1 or 2 follicular lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *Br. J. Haematol.* **126**, 364–371 (2004).
- Amé-Thomas, P. *et al.* 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 (2007).
- Pandey, S. *et al.* IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood* **129**, 2507–2518 (2017).
- 80. Mueller, S. N. & Germain, R. N. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 618–629 (2009).
- Moore, J. E. & Bertram, C. D. Lymphatic System Flows. Annu. Rev. Fluid Mech. 50, 459–482 (2018).
- Carter, P. B. & Collins, F. M. The route of enteric infection in normal mice. J. Exp. Med. 139, 1189–1203 (1974).
- Mowat, A. M. & Agace, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 667–685 (2014).

- Esterházy, D. *et al.* Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature* 569, 126–130 (2019).
- 85. Fu, H., Ward, E. J. & Marelli-Berg, F. M. Mechanisms of T cell organotropism. *Cell. Mol. Life Sci.*73, 3009–3033 (2016).
- Tufail, S., Khan, F. B., Sherwani, A., Gupta, U. D. & Owais, M. Tissue Specific Heterogeneity in Effector Immune Cell Response. *Front. Immunol.* 4, (2013).
- 87. Qi, H., Kastenmüller, W. & Germain, R. N. Spatiotemporal Basis of Innate and Adaptive Immunity in Secondary Lymphoid Tissue. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 141–167 (2014).
- 88. Stein, J. V. *et al.* The Cc Chemokine Thymus-Derived Chemotactic Agent 4 (Tca-4, Secondary Lymphoid Tissue Chemokine, 6ckine, Exodus-2) Triggers Lymphocyte Function–Associated Antigen 1–Mediated Arrest of Rolling T Lymphocytes in Peripheral Lymph Node High Endothelial Venules. *J. Exp. Med.* **191**, 61–76 (2000).
- 89. Cyster, J. G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 127–159 (2005).
- 90. Matloubian, M. *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360 (2004).
- Liu, Z. *et al.* Immune homeostasis enforced by co-localized effector and regulatory T cells. *Nature* 528, 225–230 (2015).
- 92. Katakai, T. Marginal reticular cells: a stromal subset directly descended from the lymphoid tissue organizer. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
- 93. Kastenmüller, W., Torabi-Parizi, P., Subramanian, N., Lämmermann, T. & Germain, R. N. A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. *Cell* **150**, 1235–1248 (2012).
- 94. Crotty, S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41, 529–542 (2014).

- 95. Hong, S. *et al.* B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4+ T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen. *Immunity* **49**, 695-708.e4 (2018).
- 96. Karnowski, A. *et al.* B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1. *J. Exp. Med.* **209**, 2049–2064 (2012).
- 97. Gray, E. E. & Cyster, J. G. Lymph node macrophages. J. Innate Immun. 4, 424–436 (2012).
- 98. Girard, J.-P., Moussion, C. & Förster, R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 762–773 (2012).
- Mondor, I. *et al.* Lymphatic Endothelial Cells Are Essential Components of the Subcapsular Sinus Macrophage Niche. *Immunity* 50, 1453-1466.e4 (2019).
- 100. Carrasco, Y. R. & Batista, F. D. 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 (2007).
- 101. Junt, T. *et al.* Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* **450**, 110–114 (2007).
- 102. Phan, T. G., Grigorova, I., Okada, T. & Cyster, J. G. Subcapsular encounter and complementdependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat. Immunol.* **8**, 992–1000 (2007).
- 103. Aichele, P. *et al.* Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **171**, 1148–1155 (2003).
- 104. Veninga, H. *et al.* Antigen targeting reveals splenic CD169+ macrophages as promoters of germinal center B-cell responses. *Eur. J. Immunol.* **45**, 747–757 (2015).
- 105. Gaya, M. *et al.* Inflammation-induced disruption of SCS macrophages impairs B cell responses to secondary infection. *Science* **347**, 667–672 (2015).
- 106. Gerner, M. Y., Casey, K. A., Kastenmuller, W. & Germain, R. N. Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity. *J. Exp. Med.* **214**, 3105–3122 (2017).

- Baptista, A. P. *et al.* The Chemoattractant Receptor Ebi2 Drives Intranodal Naive CD4+ T Cell
   Peripheralization to Promote Effective Adaptive Immunity. *Immunity* 50, 1188-1201.e6 (2019).
- 108. Gerner, M. Y., Kastenmuller, W., Ifrim, I., Kabat, J. & Germain, R. N. Histo-cytometry: a method for highly multiplex quantitative tissue imaging analysis applied to dendritic cell subset microanatomy in lymph nodes. *Immunity* **37**, 364–376 (2012).
- 109. Zhang, Y. *et al.* Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J. Exp. Med.* **210**, 457–464 (2013).
- 110. Rodrigues, P. F. *et al.* Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* **19**, 711–722 (2018).
- Chang, J. E. & Turley, S. J. Stromal infrastructure of the lymph node and coordination of immunity. *Trends Immunol.* 36, 30–39 (2015).
- 112. Rodda, L. B. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. *Immunity* **48**, 1014-1028.e6 (2018).
- 113. Mionnet, C. *et al.* Identification of a new stromal cell type involved in the regulation of inflamed B cell follicles. *PLoS Biol.* **11**, e1001672 (2013).
- 114. Pikor, N. B., Cheng, H.-W., Onder, L. & Ludewig, B. Development and Immunological Function of Lymph Node Stromal Cells. *J. Immunol.* **206**, 257–263 (2021).
- 115. Huang, H.-Y. *et al.* Identification of a new subset of lymph node stromal cells involved in regulating plasma cell homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E6826–E6835 (2018).
- 116. Cosgrove, J. *et al.* B cell zone reticular cell microenvironments shape CXCL13 gradient formation. *Nat. Commun.* **11**, 3677 (2020).
- 117. Frédéric Mourcin, Léa Verdière, David Roulois, & Karin Tarte. Human lymphoid stromal cell heterogeneity and functional alteration in follicular lymphoma. Immunity 2021.
- Bénézech, C. *et al.* Lymphotoxin-β Receptor Signaling through NF-κB2-RelB Pathway
   Reprograms Adipocyte Precursors as Lymph Node Stromal Cells. *Immunity* **37**, 721–734 (2012).

- 119. Jarjour, M. *et al.* Fate mapping reveals origin and dynamics of lymph node follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* **211**, 1109–1122 (2014).
- Chai, Q. *et al.* Maturation of Lymph Node Fibroblastic Reticular Cells from Myofibroblastic Precursors Is Critical for Antiviral Immunity. *Immunity* 38, 1013–1024 (2013).
- 121. Sitnik, K. M. *et al.* Context-Dependent Development of Lymphoid Stroma from Adult CD34+ Adventitial Progenitors. *Cell Rep.* **14**, 2375–2388 (2016).
- 122. Golub, R., Tan, J., Watanabe, T. & Brendolan, A. Origin and Immunological Functions of Spleen Stromal Cells. *Trends Immunol.* **39**, 503–514 (2018).
- 123. Yoshida, H. *et al.* Different cytokines induce surface lymphotoxin-alphabeta on IL-7 receptoralpha cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches. *Immunity* **17**, 823–833 (2002).
- 124. Novkovic, M. *et al.* Topological Small-World Organization of the Fibroblastic Reticular Cell Network Determines Lymph Node Functionality. *PLoS Biol.* **14**, e1002515 (2016).
- 125. Malhotra, D. *et al.* Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat. Immunol.* **13**, 499–510 (2012).
- 126. Dubrot, J. *et al.* Lymph node stromal cells acquire peptide-MHCII complexes from dendritic cells and induce antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **211**, 1153–1166 (2014).
- 127. Zhang, Y. *et al.* Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells. *J. Exp. Med.* **215**, 1227–1243 (2018).
- 128. Pikor, N. B. *et al.* Remodeling of light and dark zone follicular dendritic cells governs germinal center responses. *Nat. Immunol.* **21**, 649–659 (2020).
- 129. Katakai, T. *et al.* 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 (2004).
- 130. Dasoveanu, D. C. *et al.* Lymph node stromal CCL2 limits antibody responses. *Sci. Immunol.* 5, (2020).

- 131. Takeuchi, A. *et al.* A Distinct Subset of Fibroblastic Stromal Cells Constitutes the Cortex-Medulla Boundary Subcompartment of the Lymph Node. *Front. Immunol.* **9**, 2196 (2018).
- 132. Ulvmar, M. H. *et al.* The atypical chemokine receptor CCRL1 shapes functional CCL21 gradients in lymph nodes. *Nat. Immunol.* **15**, 623–630 (2014).
- 133. Xiang, M. *et al.* A Single-Cell Transcriptional Roadmap of the Mouse and Human Lymph Node Lymphatic Vasculature. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**, (2020).
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D. & Hayakawa, K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.*173, 1213–1225 (1991).
- 135. Li, Y. S., Wasserman, R., Hayakawa, K. & Hardy, R. R. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* **5**, 527–535 (1996).
- 136. Allman, D., Li, J. & Hardy, R. R. Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J. Exp. Med.* **189**, 735–740 (1999).
- 137. Ogawa, M., ten Boekel, E. & Melchers, F. Identification of CD19(-)B220(+)c-Kit(+)Flt3/Flk-2(+)cells as early B lymphoid precursors before pre-B-I cells in juvenile mouse bone marrow. *Int. Immunol.* 12, 313–324 (2000).
- 138. Mårtensson, I. L., Melchers, F. & Winkler, T. H. A transgenic marker for mouse B lymphoid precursors. *J. Exp. Med.* **185**, 653–661 (1997).
- 139. Bain, G. *et al.* E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* **79**, 885–892 (1994).
- 140. Nutt, S. L., Urbánek, P., Rolink, A. & Busslinger, M. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev.* **11**, 476–491 (1997).
- 141. Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517–1523 (1990).

- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D. & Hayakawa, K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.*173, 1213–1225 (1991).
- 143. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575–581 (1983).
- 144. Bendall, S. C. *et al.* Single-Cell Trajectory Detection Uncovers Progression and Regulatory Coordination in Human B Cell Development. *Cell* **157**, 714–725 (2014).
- 145. Veiby, O., Lyman, S. & Jacobsen, S. Combined signaling through interleukin-7 receptors and flt3 but not c- kit potently and selectively promotes B-cell commitment and differentiation from uncommitted murine bone marrow progenitor cells. *Blood* **88**, 1256–1265 (1996).
- 146. Waskow, C., Paul, S., Haller, C., Gassmann, M. & Rodewald, H.-R. Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity* **17**, 277–288 (2002).
- 147. Kerr, W. G., Cooper, M. D., Feng, L., Burrows, P. D. & Hendershot, L. M. Mu heavy chains can associate with a pseudo-light chain complex (ψL) in human pre-B cell lines. *Int. Immunol.* 1, 355–361 (1989).
- 148. Tsubata, T. & Reth, M. The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J. Exp. Med.* **172**, 973–976 (1990).
- 149. Nishimoto, N. *et al.* Normal pre-B cells express a receptor complex of mu heavy chains and surrogate light-chain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 6284–6288 (1991).
- 150. Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in PreB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* **3**, 601–608 (1995).
- 151. Ehlich, A., Martin, V., Müller, W. & Rajewsky, K. Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr. Biol.* **4**, 573–583 (1994).
- 152. Liu, D., Jenab, J. & Rosenberg, N. Kappa and lambda rearrangement occur simultaneously in transformed pre-B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **159**, 6061–6069 (1997).

- 153. Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T. H., Karasuyama, H. & Melchers, F. IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int. Immunol.* **6**, 1257–1264 (1994).
- 154. Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. & Singh, H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573–1577 (1994).
- 155. Wang, J.-H. *et al.* Selective Defects in the Development of the Fetal and Adult Lymphoid System in Mice with an Ikaros Null Mutation. *Immunity* **5**, 537–549 (1996).
- 156. Welinder, E. *et al.* The transcription factors E2A and HEB act in concert to induce the expression of FOXO1 in the common lymphoid progenitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17402–17407 (2011).
- 157. Hagman, J., Travis, A. & Grosschedl, R. A novel lineage-specific nuclear factor regulates mb-1 gene transcription at the early stages of B cell differentiation. *EMBO J.* **10**, 3409–3417 (1991).
- 158. Wardemann, H. *et al.* Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science* **301**, 1374–1377 (2003).
- 159. Rolink, A. G., Andersson, J. & Melchers, F. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3738–3748 (1998).
- 160. Clark, M. R., Mandal, M., Ochiai, K. & Singh, H. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 69–80 (2014).
- Stoeckius, M. *et al.* Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells.
   *Nat. Methods* 14, 865–868 (2017).
- 162. Lee, R. D. *et al.* Single-cell analysis of developing B cells reveals dynamic gene expression networks that govern B cell development and transformation. *bioRxiv* 2020.06.30.178301 (2020) doi:10.1101/2020.06.30.178301.

- 163. Hermans, M. H., Hartsuiker, H. & Opstelten, D. An in situ study of B-lymphocytopoiesis in rat bone marrow. Topographical arrangement of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells and pre-B cells. *J. Immunol.* **142**, 67–73 (1989).
- 164. Greenbaum, A. *et al.* CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227–230 (2013).
- 165. Fistonich, C. *et al.* Cell circuits between B cell progenitors and IL-7+ mesenchymal progenitor cells control B cell development. *J. Exp. Med.* **215**, 2586–2599 (2018).
- 166. Park, S.-Y. *et al.* Focal adhesion kinase regulates the localization and retention of pro-B cells in bone marrow microenvironments. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 1094–1102 (2013).
- 167. Glodek, A. M. *et al.* Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells. *Leukemia* **21**, 1723–1732 (2007).
- 168. de Gorter, D. J. J. *et al.* Bruton's Tyrosine Kinase and Phospholipase Cγ2 Mediate Chemokine-Controlled B Cell Migration and Homing. *Immunity* **26**, 93–104 (2007).
- 169. Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E. & Schiff, C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13014–13019 (2002).
- 170. Elantak, L. *et al.* Structural basis for galectin-1-dependent pre-B cell receptor (pre-BCR) activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 44703–44713 (2012).
- 171. Mourcin, F. *et al.* Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood* **117**, 6552–6561 (2011).
- Balzano, M. *et al.* Nidogen-1 Contributes to the Interaction Network Involved in Pro-B Cell
   Retention in the Peri-sinusoidal Hematopoietic Stem Cell Niche. *Cell Rep.* 26, 3257-3271.e8
   (2019).
- 173. Sitnicka, E. *et al.* Key Role of flt3 Ligand in Regulation of the Common Lymphoid Progenitor but Not in Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Immunity* **17**, 463–472 (2002).

- 174. Cannabinoid receptor 2 mediates retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. https://www-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pmc/articles/PMC2768754/.
- 175. Sandel, P. C. & Monroe, J. G. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* **10**, 289–299 (1999).
- 176. Sandel, P. C., Gendelman, M., Kelsoe, G. & Monroe, J. G. Definition of a Novel Cellular Constituent of the Bone Marrow That Regulates the Response of Immature B Cells to B Cell Antigen Receptor Engagement. *J. Immunol.* **166**, 5935–5944 (2001).
- 177. MacLennan, I. C. M. Germinal Centers. Annu. Rev. Immunol. 12, 117–139 (1994).
- 178. Allen, C. D. C., Okada, T., Tang, H. L. & Cyster, J. G. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* **315**, 528–531 (2007).
- 179. Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* **354**, 389–392 (1991).
- 180. Berek, C., Berger, A. & Apel, M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*67, 1121–1129 (1991).
- 181. Okada, T. *et al.* Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol.* **3**, e150 (2005).
- 182. Kerfoot, S. M. *et al.* Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Development Initiates in the Interfollicular Zone. *Immunity* **34**, 947–960 (2011).
- Kitano, M. *et al.* Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. *Immunity* 34, 961–972 (2011).
- 184. Blink, E. J. *et al.* Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J. Exp. Med.* **201**, 545–554 (2005).
- 185. Paus, D. *et al.* Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* **203**, 1081–1091 (2006).
- 186. DiToro, D. *et al.* Differential IL-2 expression defines developmental fates of follicular versus nonfollicular helper T cells. *Science* **361**, (2018).

- 187. Watanabe, R. *et al.* Pro-inflammatory and Anti-inflammatory T cells in Giant Cell Arteritis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 84, 421–426 (2017).
- 188. De Silva, N. S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148 (2015).
- 189. Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 429–457 (2012).
- 190. Luo, W., Weisel, F. & Shlomchik, M. J. B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the c-Myc Transcription Factor in Germinal Center B Cells. *Immunity* **48**, 313-326.e5 (2018).
- 191. Ersching, J. *et al.* Germinal center selection and affinity maturation require dynamic regulation of mTORC1 kinase. *Immunity* **46**, 1045-1058.e6 (2017).
- 192. Ci, W. *et al.* The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* **113**, 5536–5548 (2009).
- Roco, J. A. *et al.* Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers.
   *Immunity* **51**, 337-350.e7 (2019).
- 194. Gitlin, A. D., Shulman, Z. & Nussenzweig, M. C. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* **509**, 637–640 (2014).
- 195. Bannard, O. *et al.* 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 (2013).
- 196. Liu, B. *et al.* Affinity-coupled CCL22 promotes positive selection in germinal centres. *Nature*592, 133–137 (2021).
- 197. Kooten, C. van & Banchereau, J. CD40-CD40 ligand. J. Leukoc. Biol. 67, 2–17 (2000).
- 198. Crotty, S. Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). Annu. Rev. Immunol. 29, 621–663 (2011).
- 199. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Yu, D. & MacLennan, I. C. M. Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 335–368 (2016).

- 200. Wan, Z., Lin, Y., Zhao, Y. & Qi, H. TFH cells in bystander and cognate interactions with B cells. *Immunol. Rev.* **288**, 28–36 (2019).
- 201. Brink, R. & Phan, T. G. Self-Reactive B Cells in the Germinal Center Reaction. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 339–357 (2018).
- 202. Schwickert, T. A. *et al.* In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* **446**, 83–87 (2007).
- 203. Dominguez-Sola, D. *et al.* The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat. Immunol.* **13**, 1083–1091 (2012).
- 204. Calado, D. P. *et al.* The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat. Immunol.* **13**, 1092–1100 (2012).
- 205. Bajénoff, M. *et al.* Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* **25**, 989–1001 (2006).
- 206. Alexandre, Y. O. & Mueller, S. N. Stromal cell networks coordinate immune response generation and maintenance. *Immunol. Rev.* **283**, 77–85 (2018).
- 207. Astarita, J. L. *et al.* The CLEC-2–podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat. Immunol.* **16**, 75–84 (2015).
- Martinez, V. G. *et al.* Fibroblastic Reticular Cells Control Conduit Matrix Deposition during
   Lymph Node Expansion. *Cell Rep.* 29, 2810-2822.e5 (2019).
- Dubey, L. K. *et al.* Lymphotoxin-Dependent B Cell-FRC Crosstalk Promotes De Novo Follicle
   Formation and Antibody Production following Intestinal Helminth Infection. *Cell Rep.* 15, 1527– 1541 (2016).
- 210. Gregory, J. L. *et al.* Infection Programs Sustained Lymphoid Stromal Cell Responses and Shapes Lymph Node Remodeling upon Secondary Challenge. *Cell Rep.* **18**, 406–418 (2017).
- Brown, F. D. & Turley, S. J. Fibroblastic Reticular Cells: Organization and Regulation of the T
   Lymphocyte Life Cycle. J. Immunol. 194, 1389–1394 (2015).

- Lukacs-Kornek, V. *et al.* Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat. Immunol.* **12**, 1096–1104 (2011).
- 213. Knoblich, K. *et al.* The human lymph node microenvironment unilaterally regulates T-cell activation and differentiation. *PLOS Biol.* **16**, e2005046 (2018).
- 214. Maby-El Hajjami, H. *et al.* Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res.* **69**, 3228–3237 (2009).
- 215. Wang, X. *et al.* Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J. Exp. Med.* **208**, 2497–2510 (2011).
- 216. Hannum, L. G., Haberman, A. M., Anderson, S. M. & Shlomchik, M. J. 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 (2000).
- 217. Kosco-Vilbois, M. H. Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat. Rev. Immunol.*3, 764–769 (2003).
- 218. Garin, A. *et al.* Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity* **33**, 84–95 (2010).
- 219. Koopman, G. *et al.* 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. Baltim. Md* 1950 152, 3760–3767 (1994).
- 220. Sacedón, R. *et al.* Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 1456–1461 (2005).
- 221. Suzuki, K. *et al.* The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **33**, 71–83 (2010).
- Hase, H. *et al.* BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex.
   *Blood* 103, 2257–2265 (2004).

- 223. Gorelik, L. *et al.* Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J. Exp. Med.* **198**, 937–945 (2003).
- 224. Park, C.-S., Yoon, S.-O., Armitage, R. J. & Choi, Y. S. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 6676–6683 (2004).
- 225. Kranich, J. *et al.* Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. *J. Exp. Med.* **205**, 1293–1302 (2008).
- 226. Tjin, E. P. M. *et al.* Functional analysis of HGF/MET signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **107**, 760–768 (2006).
- 227. Kim, J. E. *et al.* Sonic hedgehog signaling proteins and ATP-binding cassette G2 are aberrantly expressed in diffuse large B-Cell lymphoma. *Mod. Pathol.* **22**, 1312–1320 (2009).
- 228. Heesters, B. A. *et al.* Characterization of human FDCs reveals regulation of T cells and antigen presentation to B cells. *J. Exp. Med.* **218**, (2021).
- 229. Smyk, M., Akdemir, K. C. & Stankiewicz, P. *SOX9* chromatin folding domains correlate with its real and putative distant *cis* -regulatory elements. *Nucleus* **8**, 182–187 (2017).
- 230. Green, J. A. *et al.* The sphingosine 1-phosphate receptor S1P<sub>2</sub> maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Immunol.* **12**, 672–680 (2011).
- 231. Green, J. A. & Cyster, J. G. S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation.
   *Immunol. Rev.* 247, 36–51 (2012).
- 232. Muppidi, J. R., Lu, E. & Cyster, J. G. The G protein-coupled receptor P2RY8 and follicular dendritic cells promote germinal center confinement of B cells, whereas S1PR3 can contribute to their dissemination. *J. Exp. Med.* **212**, 2213–2222 (2015).
- 233. Muppidi, J. R. *et al.* Loss of signalling via Gα13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma.
   *Nature* 516, 254–258 (2014).
- 234. Lu, E., Wolfreys, F. D., Muppidi, J. R., Xu, Y. & Cyster, J. G. S -Geranylgeranyl- I -glutathione is a ligand for human B cell-confinement receptor P2RY8. *Nature* **567**, 244–248 (2019).

- 235. Ansel, K. M. *et al.* A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles.
   *Nature* **406**, 309–314 (2000).
- 236. Voigt, I. *et al.* CXCR5-deficient mice develop functional germinal centers in the splenic T cell zone. *Eur. J. Immunol.* **30**, 560–567 (2000).
- 237. Allen, C. D. C. *et al.* Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* **5**, 943–952 (2004).
- 238. Ito, K. *et al.* Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 212–217 (2007).
- 239. Nojima, T. *et al.* In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat. Commun.* **2**, 465 (2011).
- Purwada, A. *et al.* Ex vivo synthetic immune tissues with T cell signals for differentiating antigen-specific, high affinity germinal center B cells. *Biomaterials* (2018)
   doi:10.1016/j.biomaterials.2018.06.034.
- 241. Purwada, A. *et al.* Ex vivo engineered immune organoids for controlled germinal center reactions. *Biomaterials* **63**, 24–34 (2015).
- 242. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R. & Yamada, K. M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **294**, 1708–1712 (2001).
- Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N. & Rajewsky, K. Survival of resting mature B
  lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* **117**, 787–800 (2004).
- 244. Duan, L. *et al.* Follicular dendritic cells restrict interleukin-4 availability in germinal centers and foster memory B cell generation. *Immunity* (2021) doi:10.1016/j.immuni.2021.08.028.
- 245. Prados, A., Kollias, G. & Koliaraki, V. CollagenVI-Cre mice: A new tool to target stromal cells in secondary lymphoid organs. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
- 246. Cremasco, V. *et al.* B cell homeostasis and follicle confines are governed by fibroblastic reticular cells. *Nat. Immunol.* **15**, 973–981 (2014).

- Gentek, R. & Bajénoff, M. Lymph Node Stroma Dynamics and Approaches for Their Visualization. *Trends Immunol.* 38, 236–247 (2017).
- Wagar, L. E. *et al.* Modeling human adaptive immune responses with tonsil organoids. *Nat. Med.* 27, 125–135 (2021).
- Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390 (2016).
- 250. Alain Monnereau *et al.* Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018. (2021).
- 251. Rivas-Vera, S., Acosta-Maldonado, B. L. & Estrada-Martínez, L. E. Role of Bone Marrow Infiltration and POD 24 in Follicular Lymphoma. *Blood* **132**, 5336 (2018).
- 252. Troy, J. D. *et al.* Associations Between Anthropometry, Cigarette Smoking, Alcohol Consumption, and Non-Hodgkin Lymphoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am. J. Epidemiol.* **171**, 1270–1281 (2010).
- 253. Morton, L. M. *et al.* Cigarette Smoking and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma: A Pooled Analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* **14**, 925–933 (2005).
- 254. Talamini, R. *et al.* Smoking and non-Hodgkin lymphoma: Case-control study in Italy. *Int. J. Cancer* **115**, 606–610 (2005).
- 255. Skibola, C. F. *et al.* Body Mass Index, Leptin and Leptin Receptor Polymorphisms, and Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* **13**, 779–786 (2004).
- 256. Meloni, F. *et al.* Occupational exposure to glyphosate and risk of lymphoma:results of an Italian multicenter case-control study. *Environ. Health* **20**, 49 (2021).
- 257. Roulland, S. *et al.* Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH Translocation in Farmers Occupationally Exposed to Pesticides. *Cancer Res.* **64**, 2264–2269 (2004).
- 258. Agopian, J. *et al.* Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* **206**, 1473–1483 (2009).

259. Thirty-Month Complete Response as a Surrogate End Point in First-Line Follicular Lymphoma Therapy: An Individual Patient-Level Analysis of Multiple Randomized Trials | Journal of Clinical Oncology. https://ascopubs-

org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1200/JCO.2016.70.8651?url\_ver=Z39.88-2003&rfr\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\_dat=cr\_pub%20%200pubmed.

- 260. Casulo, C. *et al.* Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2516–2522 (2015).
- 261. Seymour, J. F. *et al.* Association of early disease progression and very poor survival in the GALLIUM study in follicular lymphoma: benefit of obinutuzumab in reducing the rate of early progression. *Haematologica* **104**, 1202–1208 (2019).
- Sarkozy, C. *et al.* 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **34**, 2575–2582 (2016).
- Bachy, E. *et al.* A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. *Blood* 132, 49–58 (2018).
- 264. Jurinovic, V. *et al.* Evaluation of the m7-FLIPI in Patients with Follicular Lymphoma Treated within the Gallium Trial: EZH2 mutation Status May be a Predictive Marker for Differential Efficacy of Chemotherapy. *Blood* **134**, 122–122 (2019).
- 265. Jurinovic, V. *et al.* Clinicogenetic risk models predict early progression of follicular lymphoma after first-line immunochemotherapy. *Blood* **128**, 1112–1120 (2016).
- 266. Bolen, C. R. *et al.* Treatment dependence of prognostic gene expression signatures in de novo follicular lymphoma. *Blood* **137**, 2704–2707 (2021).
- 267. González-Rincón, J. *et al.* Unraveling transformation of follicular lymphoma to diffuse large Bcell lymphoma. *PLOS ONE* **14**, e0212813 (2019).

- 268. Klanova, M. *et al.* Prognostic Impact of Natural Killer Cell Count in Follicular Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma Patients Treated with Immunochemotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 4634–4643 (2019).
- 269. Link, B. K. *et al.* Second-line and subsequent therapy and outcomes for follicular lymphoma in the United States: data from the observational National LymphoCare Study. *Br. J. Haematol.* **184**, 660–663 (2019).
- 270. Schuster SJ, Bartlett NL, Assouline S, et al. Mosunetuzumab induces complete remissions in poor prognosis non-Hodgkin lymphoma patients, including those who are resistant to or relapsing after chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapies, and is active in treatment through lines. (2019).
- 271. Jacobson, C. A. *et al.* 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). *J. Clin. Oncol.* **38**, 8008–8008 (2020).
- 272. Roulland, S. *et al.* Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia* **20**, 158–162 (2006).
- 273. Milpied, P., Nadel, B. & Roulland, S. Premalignant cell dynamics in indolent B-cell malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* **22**, 388–396 (2015).
- 274. Johnson, P. Memory Games in the Lymph Node: The Inflammatory Origins of Follicular Lymphoma. *The Hematologist* **12**, (2015).
- 275. Luckey, C. J. *et al.* Memory T and memory B cells share a transcriptional program of selfrenewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3304–3309 (2006).
- Mesin, L. *et al.* Restricted Clonality and Limited Germinal Center Reentry Characterize Memory B Cell Reactivation by Boosting. *Cell* 180, 92-106.e11 (2020).
- 277. Okosun, J. *et al.* Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat. Genet.* 46, 176–181 (2014).

- 278. Pasqualucci, L. *et al.* Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep.* 6, 130–140 (2014).
- 279. Pasqualucci, L. *et al.* AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat.Genet.* 40, 108–112 (2008).
- 280. Sungalee, S. *et al.* Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. *J. Clin. Invest.* **124**, 5337–5351 (2014).
- 281. Carlotti, E. *et al.* Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone. *Blood* **113**, 3553–3557 (2009).
- 282. Weigert, O. *et al.* Molecular ontogeny of donor-derived follicular lymphomas occurring after hematopoietic cell transplantation. *Cancer Discov.* **2**, 47–55 (2012).
- 283. Vaandrager, J. W. *et al.* 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 (1998).
- 284. Dörner, T., Foster, S. J., Brezinschek, H. P. & Lipsky, P. E. Analysis of the targeting of the hypermutational machinery and the impact of subsequent selection on the distribution of nucleotide changes in human VHDJH rearrangements. *Immunol. Rev.* **162**, 161–171 (1998).
- 285. Sachen, K. L. *et al.* Self-antigen recognition by follicular lymphoma B-cell receptors. *Blood* **120**, 4182–4190 (2012).
- 286. Meffre, E. & Wardemann, H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 632–638 (2008).
- 287. Cha, S.-C. *et al.* Nonstereotyped Lymphoma B Cell Receptors Recognize Vimentin as a Shared Autoantigen. *J. Immunol.* **190**, 4887–4898 (2013).
- 288. Madsen, C. *et al.* High intratumoral expression of vimentin predicts histological transformation in patients with follicular lymphoma. *Blood Cancer J.* **9**, 1–4 (2019).
- 289. Kumar, E. & Okosun, J. Follicular lymphoma genomics. *HemaSphere* **3**, 79–81 (2019).

- 290. Pasqualucci, L. *et al.* Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* **471**, 189–195 (2011).
- 291. Green, M. R. *et al.* Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood* **121**, 1604–1611 (2013).
- 292. Morin, R. D. *et al.* Frequent mutation of histone modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* **476**, 298–303 (2011).
- Ortega-Molina, A. *et al.* The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat. Med.* 21, 1199–1208 (2015).
- Araf, S. *et al.* Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. *Leukemia* **32**, 1261–1265 (2018).
- 295. Bödör, C. et al. EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* **25**, 726–729 (2011).
- 296. Nagy, Á. *et al.* Quantitative Analysis and Monitoring of EZH2 Mutations Using Liquid Biopsy in
   Follicular Lymphoma. *Genes* 11, (2020).
- Ortega-Molina, A. *et al.* Oncogenic Rag GTPase signaling enhances B cell activation and drives follicular lymphoma sensitive to pharmacological inhibition of mTOR. *Nat. Metab.* **1**, 775–789 (2019).
- 298. Bararia, D. *et al.* Cathepsin S Alterations Induce a Tumor-Promoting Immune Microenvironment in Follicular Lymphoma. *Cell Rep.* **31**, 107522 (2020).
- 299. Riese, R. J. *et al.* Essential Role for Cathepsin S in MHC Class II–Associated Invariant Chain Processing and Peptide Loading. *Immunity* **4**, 357–366 (1996).
- 300. Dheilly, E. *et al.* Cathepsin S Regulates Antigen Processing and T Cell Activity in Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Cell* **37**, 674-689.e12 (2020).
- 301. Challa-Malladi, M. *et al.* Combined genetic inactivation of β2-Microglobulin and CD58 reveals
   frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 20, 728–740 (2011).

- 302. Xia, Z. *et al.* GNA13 regulates BCL2 expression and the sensitivity of GCB-DLBCL cells to BCL2 inhibitors in a palmitoylation-dependent manner. *Cell Death Dis.* **12**, 1–11 (2021).
- 303. Yildiz, M. *et al.* Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma. *Blood* **125**, 668–679 (2015).
- 304. Carlotti, E. *et al.* High Throughput Sequencing Analysis of the Immunoglobulin Heavy Chain Gene from Flow-Sorted B Cell Sub-Populations Define the Dynamics of Follicular Lymphoma Clonal Evolution. *PLOS ONE* **10**, e0134833 (2015).
- 305. Milpied, P. *et al.* Human germinal center transcriptional programs are de-synchronized in B cell lymphoma. *Nat. Immunol.* **19**, 1013–1024 (2018).
- 306. Andor, N. *et al.* Single-cell RNA-Seq of follicular lymphoma reveals malignant B-cell types and coexpression of T-cell immune checkpoints. *Blood* **133**, 1119–1129 (2019).
- 307. Attaf, N. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing Identifies a Pseudo-Immune Differentiation Axis As the Main Source of Functional Heterogeneity in Follicular Lymphoma B-Cells. *Blood* **134**, 548–548 (2019).
- 308. Koues, O. I. *et al.* Enhancer Sequence Variants and Transcription Factor Deregulation
   Synergize to Construct Pathogenic Regulatory Circuits in B Cell Lymphoma. *Immunity* 42, 186–198 (2015).
- 309. Szydlowski, M. *et al.* FOXO1 activation is an effector of SYK and AKT inhibition in tonic BCR signal-dependent diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **127**, 739–748 (2016).
- 310. Carbone, A. et al. Follicular lymphoma. Nat. Rev. Dis. Primer 5, 1–20 (2019).
- Melo, J. V. *et al.* Morphology and immunology of circulating cells in leukaemic phase of follicular lymphoma. *J. Clin. Pathol.* **41**, 951–959 (1988).
- 312. Arber, D. A. & George, T. I. Bone Marrow Biopsy Involvement by Non-Hodgkin's Lymphoma: Frequency of Lymphoma Types, Patterns, Blood Involvement, and Discordance With Other Sites in 450 Specimens. Am. J. Surg. Pathol. 29, 1549–1557 (2005).

- Takata, K., Miyata-Takata, T., Sato, Y. & Yoshino, T. Pathology of follicular lymphoma. J. Clin.
   *Exp. Hematop. JCEH* 54, 3–9 (2014).
- 314. Jacob, P. M., Nair, R. A., V, J. A., P, S. N. & R, A. K. Downregulation of CD10 in leukaemic phase of follicular lymphoma: a silent deception. *J. Hematop.* **6**, 65–70 (2013).
- 315. Gradowski, J. F. *et al.* Follicular lymphomas with plasmacytic differentiation include two subtypes. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **23**, 71–79 (2010).
- 316. Kosmidis, P., Mankel, B., Fend, F. & Adam, P. The t(14;18) translocation is absent from endothelial and follicular dendritic cells of follicular lymphoma (FL) and shows heterogeneous presence in preserved FL mantle zones. *Diagn. Pathol.* **13**, 25 (2018).
- 317. Amé-Thomas, P. & Tarte, K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: Role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin. Cancer Biol.* **24**, 23–32 (2014).
- 318. Sangaletti, S. *et al.* Stromal niche communalities underscore the contribution of the matricellular protein SPARC to B-cell development and lymphoid malignancies. *Oncoimmunology*3, e28989 (2014).
- 319. Wahlin, B. E. *et al.* Entourage: the immune microenvironment following follicular lymphoma. *Blood Cancer J.* **2**, e52 (2012).
- 320. Lafont, V. *et al.* Plasticity of gamma delta T cells: impact on the anti-tumor response. *Front. Immunol.* **5**, 622 (2014).
- 321. Zamai, L. et al. NK Cells and Cancer. J. Immunol. 178, 4011–4016 (2007).
- 322. Yang, Z.-Z. *et al.* 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 (2012).
- 323. Kiaii, S. *et al.* Follicular lymphoma cells induce changes in T-cell gene expression and function: potential impact on survival and risk of transformation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*31, 2654–2661 (2013).
- 324. Ramsay, A. G. *et al.* 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 (2009).
- 325. Laurent, C. *et al.* Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. *Blood* **118**, 5371–5379 (2011).
- 326. Pangault, C. *et al.* Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4dependent TFH–B cell axis. *Leukemia* **24**, 2080–2089 (2010).
- 327. Rawal, S. *et al.* Cross talk between follicular Th cells and tumor cells in human follicular lymphoma promotes immune evasion in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 6681–6693 (2013).
- 328. Townsend, W. *et al.* The architecture of neoplastic follicles in follicular lymphoma; analysis of the relationship between the tumor and follicular helper T cells. *Haematologica* **105**, 1593–1603 (2020).
- 329. Epron, G. *et al.* Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma Bcell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia* **26**, 139–148 (2012).
- 330. Amin, R. *et al.* DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM Bcell receptor in follicular lymphoma. *Blood* **126**, 1911–1920 (2015).
- 331. Gertner-Dardenne, J. *et al.* The co-receptor BTLA negatively regulates human Vγ9Vδ2 T-cell proliferation: a potential way of immune escape for lymphoma cells. *Blood* **122**, 922–931 (2013).
- Boice, M. *et al.* Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell* **167**, 405-418.e13 (2016).
- 333. Germain, C. *et al.* Lectin-like transcript 1 is a marker of germinal center-derived B-cell non-Hodgkin's lymphomas dampening natural killer cell functions. *Oncolmmunology* 4, e1026503 (2015).
- 334. Amé-Thomas, P. *et al.* Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. *Leukemia* **26**, 1053–1063 (2012).

- 335. Le, K.-S. *et al.* 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 (2016).
- 336. Yang, Z.-Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., Witzig, T. E. & Ansell, S. M. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **107**, 3639–3646 (2006).
- 337. Yang, Z.-Z., Novak, A. J., Ziesmer, S. C., Witzig, T. E. & Ansell, S. M. 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 (2009).
- 338. Sage, P. T. & Sharpe, A. H. T follicular regulatory cells. *Immunol. Rev.* 271, 246–259 (2016).
- 339. Farinha, P. *et al.* 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 (2005).
- 340. Carreras, J. *et al.* High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* **108**, 2957–2964 (2006).
- 341. Serrat, N. *et al.* PI3Kδ inhibition reshapes follicular lymphoma-immune microenvironment cross talk and unleashes the activity of venetoclax. *Blood Adv.* **4**, 4217–4231 (2020).
- Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51 (2010).
- 343. Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
- Ricketts, T. D., Prieto-Dominguez, N., Gowda, P. S. & Ubil, E. Mechanisms of Macrophage
  Plasticity in the Tumor Environment: Manipulating Activation State to Improve Outcomes. *Front. Immunol.* 12, 642285 (2021).
- 345. Mills, C. D. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front. Immunol.* **6**, 212 (2015).

- 346. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumorassociated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23**, 549–555 (2002).
- 347. Xue, J. *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* **40**, 274–288 (2014).
- 348. Kitamura, T. *et al.* CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J. Exp. Med.* **212**, 1043–1059 (2015).
- 349. Yoshimura, T. *et al.* Induction of Monocyte Chemoattractant Proteins in Macrophages via the Production of Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor by Breast Cancer Cells. *Front. Immunol.* **7**, 2 (2016).
- 350. Wang, X. *et al.* IL-6 Mediates Macrophage Infiltration after Irradiation via Up-regulation of CCL2/CCL5 in Non-small Cell Lung Cancer. *Radiat. Res.* **187**, 50–59 (2017).
- 351. Xuan, W., Qu, Q., Zheng, B., Xiong, S. & Fan, G.-H. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 61–69 (2015).
- 352. Linde, N. *et al.* Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *J. Pathol.* **227**, 17–28 (2012).
- 353. Tian, Y., Matsui, S., Touma, M., Wu, Q. & Sugimoto, K. MicroRNA-342 inhibits tumor growth via targeting chemokine CXCL12 involved in macrophages recruitment/activation. *Genes Cells* **23**, 1009–1022 (2018).
- 354. Gong, D. *et al.* TGFβ signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol.* **13**, 1–10 (2012).
- 355. Laoui, D., Van Overmeire, E., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J. A. & Raes, G. Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. *Front. Immunol.* **5**, 489 (2014).
- 356. Molawi, K. & Sieweke, M. H. Transcriptional control of macrophage identity, self-renewal, and function. *Adv. Immunol.* **120**, 269–300 (2013).

- 357. Tan, I.-L. *et al.* CSF1R inhibition depletes tumor-associated macrophages and attenuates tumor progression in a mouse sonic Hedgehog-Medulloblastoma model. *Oncogene* **40**, 396–407 (2021).
- 358. Chen, Y.-P. *et al.* SIRPα expression delineates subsets of intratumoral monocyte/macrophages with different functional and prognostic impact in follicular lymphoma. *Blood Cancer J.* 9, 1–14 (2019).
- 359. Clear, A. J. *et al.* Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood* **115**, 5053–5056 (2010).
- Kridel, R. *et al.* 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 (2015).
- 361. Canioni, D. *et al.* 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 (2008).
- 362. Stevens, W. B. C. *et al.* 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 (2017).
- 363. Taskinen, M., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Nyman, H., Eerola, L.-M. & Leppä, S. 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 (2007).
- 364. Valero, J. G. *et al.* The receptor of the colony-stimulating factor-1 (CSF-1R) is a novel prognostic factor and therapeutic target in follicular lymphoma. *Leukemia* (2021) doi:10.1038/s41375-021-01201-9.

- 365. Coelho, V. *et al.* Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18587–18592 (2010).
- 366. Odabashian, M. *et al.* IGHV sequencing reveals acquired N-glycosylation sites as a clonal and stable event during follicular lymphoma evolution. *Blood* **135**, 834–844 (2020).
- 367. Linley, A. *et al.* Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood* **126**, 1902–1910 (2015).
- 368. Valle-Argos, B. *et al.* DC-SIGN binding to mannosylated B-cell receptors in follicular lymphoma down-modulates receptor signaling capacity. *Sci. Rep.* **11**, 11676 (2021).
- 369. Sangaletti, S. *et al.* Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res.* **68**, 9050–9059 (2008).
- 370. Condeelis, J. & Segall, J. E. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer*3, 921–930 (2003).
- 371. Ingman, W. V., Wyckoff, J., Gouon-Evans, V., Condeelis, J. & Pollard, J. W. Macrophages promote collagen fibrillogenesis around terminal end buds of the developing mammary gland. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 3222–3229 (2006).
- 372. Weissmann, M. *et al.* Heparanase-neutralizing antibodies attenuate lymphoma tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 704–709 (2016).
- 373. Mraz, M. *et al.* Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin  $\alpha$ -4- $\beta$ -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br. J. Haematol.* **155**, 53–64 (2011).
- 374. Munoz, O. *et al.* TGF*θ*-mediated activation of Smad1 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma and effect on cell proliferation. *Leukemia* **18**, 2015–2025 (2004).
- 375. Gallouet, A.-S. *et al.* COX-2-Independent Effects of Celecoxib Sensitize Lymphoma B Cells to TRAIL-Mediated Apoptosis. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2663–2673 (2014).

- 376. Expression of multidrug resistance 1 gene in B-cell lymphomas: association with follicular dendritic cells Yagi 2013 Histopathology Wiley Online Library.
   https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/his.12035.
- Guilloton, F. *et al.* Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood* 119, 2556–2567 (2012).
- 378. Grégoire, M. *et al.* Neutrophils trigger a NF-кB dependent polarization of tumor-supportive stromal cells in germinal center B-cell lymphomas. *Oncotarget* **6**, 16471–16487 (2015).
- 379. Lee, M. J. *et al.* Mesenchymal stromal cells promote B-cell lymphoma in lacrimal glands by inducing immunosuppressive microenvironment. *Oncotarget* **8**, 66281–66292 (2017).
- Chang, K.-C., Huang, X., Medeiros, L. J. & Jones, D. Germinal centre-like versus undifferentiated stromal immunophenotypes in follicular lymphoma. *J. Pathol.* 201, 404–412 (2003).
- 381. Pepe, G. *et al.* 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 (2018).
- 382. Rodda, L. B., Bannard, O., Ludewig, B., Nagasawa, T. & Cyster, J. G. Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12-Expressing Reticular Cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 195, 4781–4791 (2015).
- Costa, A. *et al.* Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* 33, 463-479.e10 (2018).
- 384. Lamaison, C. & Tarte, K. B cell/stromal cell crosstalk in health, disease, and treatment:
   Follicular lymphoma as a paradigm. *Immunol. Rev.* 302, 273–285 (2021).
- Rosenthal, N. & Brown, S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models.
   Nat. Cell Biol. 9, 993–999 (2007).

- 386. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480–489 (2011).
- Bar-Ephraim, Y. E., Kretzschmar, K. & Clevers, H. Organoids in immunological research. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 279–293 (2020).
- 388. Clevers, H. C. Organoids: Avatars for Personalized Medicine. Keio J. Med. 68, 95–95 (2019).
- 389. Nunes, A. S., Barros, A. S., Costa, E. C., Moreira, A. F. & Correia, I. J. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol. Bioeng.* **116**, 206–226 (2019).
- 390. Tian, Y. F. *et al.* Integrin-specific hydrogels as adaptable tumor organoids for malignant B and T cells. *Biomaterials* 73, 110–119 (2015).
- 391. Apoorva, F. *et al.* How Biophysical Forces Regulate Human B Cell Lymphomas. *Cell Rep.* 23, 499–511 (2018).
- 392. Mannino, R. G., Pradhan, P., Roy, K. & Lam, W. A. 3D in vitro microvascular model-based lymphoma model. *Methods Cell Biol.* **146**, 149–158 (2018).
- 393. Mannino, R. G. *et al.* 3D microvascular model recapitulates the diffuse large B-cell lymphoma tumor microenvironment in vitro. *Lab. Chip* **17**, 407–414 (2017).
- 394. Gravelle, P. *et al.* Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in follicular lymphoma. *Am. J. Pathol.* **184**, 282–295 (2014).
- 395. Caicedo-Carvajal, C. E., Liu, Q., Remache, Y., Goy, A. & Suh, K. S. Cancer Tissue Engineering: A Novel 3D Polystyrene Scaffold for In Vitro Isolation and Amplification of Lymphoma Cancer Cells from Heterogeneous Cell Mixtures. *J. Tissue Eng.* **2011**, 362326 (2011).
- 396. Decaup, E. *et al.* Anti-tumor activity of obinutuzumab and rituximab in a follicular lymphoma
  3D model. *Blood Cancer J.* 3, e131 (2013).
- 397. Foxall, R. *et al.* Developing a 3D B Cell Lymphoma Culture System to Model Antibody Therapy. *Front. Immunol.* **11**, (2021).

- 398. Bray, L. J. *et al.* A three-dimensional ex vivo tri-culture model mimics cell-cell interactions between acute myeloid leukemia and the vascular niche. *Haematologica* **102**, 1215–1226 (2017).
- 399. Aljitawi, O. S. *et al.* A novel three-dimensional stromal-based model for in vitro chemotherapy sensitivity testing of leukemia cells. *Leuk. Lymphoma* **55**, 378–391 (2014).
- 400. Egle, A. VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* **103**, 2276–2283 (2004).
- 401. Zhang, J. *et al.* Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat. Med.* **21**, 1190–1198 (2015).
- 402. Jiang, Y. *et al.* CREBBP Inactivation Promotes the Development of HDAC3-Dependent Lymphomas. *Cancer Discov.* **7**, 38–53 (2017).
- 403. Béguelin, W. *et al.* Mutant EZH2 Induces a Pre-malignant Lymphoma Niche by Reprogramming the Immune Response. *Cancer Cell* **37**, 655-673.e11 (2020).
- 404. Cho, S.-Y. *et al.* An Integrative Approach to Precision Cancer Medicine Using Patient-Derived Xenografts. *Moleucles Cells* **39**, 77–86 (2016).
- 405. Day, C.-P., Merlino, G. & Van Dyke, T. Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges. *Cell* **163**, 39–53 (2015).
- 406. Yan, J.-S., Chen, X.-Y., Li, W.-P., Yang, Y. & Song, Z.-L. Establishing SCID mouse models of B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ai Zheng Aizheng Chin. J. Cancer* **28**, 181–183 (2009).
- 407. Chapuy, B. *et al.* Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease. *Blood* **127**, 2203–2213 (2016).
- 408. DiFranco, K. M. *et al.* LFA-1-targeting Leukotoxin (LtxA; Leukothera®) causes lymphoma tumor regression in a humanized mouse model and requires caspase-8 and Fas to kill malignant lymphocytes. *Leuk. Res.* **39**, 649–656 (2015).
- Hao, Y. *et al.* Selective JAK2 Inhibition Specifically Decreases Hodgkin Lymphoma and
   Mediastinal Large B-cell Lymphoma Growth In Vitro and In Vivo. *Clin. Cancer Res.* 20, 2674–2683 (2014).

- 410. Vidal-Crespo, A. *et al.* Daratumumab displays in vitro and in vivo anti-tumor activity in models of B-cell non-Hodgkin lymphoma and improves responses to standard chemo-immunotherapy regimens. *Haematologica* **105**, 1032–1041 (2020).
- 411. Zhang, L. *et al.* B-Cell Lymphoma Patient-Derived Xenograft Models Enable Drug Discovery and Are a Platform for Personalized Therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 4212–4223 (2017).
- 412. Burga, A., Casanueva, M. O. & Lehner, B. Predicting mutation outcome from early stochastic variation in genetic interaction partners. *Nature* **480**, 250–253 (2011).
- 413. Bognár, á *et al.* Clonal selection in the bone marrow involvement of follicular lymphoma.
   *Leukemia* 19, 1656–1662 (2005).
- 414. Wartenberg, M. *et al.* Somatic hypermutation analysis in follicular lymphoma provides evidence suggesting bidirectional cell migration between lymph node and bone marrow during disease progression and relapse. *Haematologica* **98**, 1433–1441 (2013).
- 415. Dumontet, E. *et al.* Extracellular vesicles shed by follicular lymphoma B cells promote the polarization of bone marrow stromal cell niche. *Blood* (2021) doi:10.1182/blood.2020008791.
- 416. Péricart, S. *et al.* Subsequent development of histiocytic sarcoma and follicular lymphoma: cytogenetics and next-generation sequencing analyses provide evidence for transdifferentiation of early common lymphoid precursor-a case report and review of literature. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **476**, 609–614 (2020).
- 417. Zhang, Q. *et al.* Transdifferentiation of lymphoma into sarcoma associated with profound reprogramming of the epigenome. *Blood* **136**, 1980–1983 (2020).
- 418. Zhang, L. *et al.* Metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation identifies a therapeutic target for mantle cell lymphoma. *Sci. Transl. Med.* **11**, (2019).
- 419. Lee, S.-C. *et al.* Metabolic Detection of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibition in Mantle Cell Lymphoma Cells. *Mol. Cancer Res. MCR* **17**, 1365–1377 (2019).

- 420. Jain, P. *et al.* Long-term outcomes and mutation profiling of patients with mantle cell lymphoma (MCL) who discontinued ibrutinib. *Br. J. Haematol.* **183**, 578–587 (2018).
- 421. Bende, R. J. *et al.* Primary Follicular Lymphoma of the Small Intestine: α4β7 Expression and Immunoglobulin Configuration Suggest an Origin from Local Antigen-Experienced B Cells. *Am. J. Pathol.* **162**, 105–113 (2003).
- 422. Schmatz, A.-I. *et al.* Primary Follicular Lymphoma of the Duodenum Is a Distinct
   Mucosal/Submucosal Variant of Follicular Lymphoma: A Retrospective Study of 63 Cases. *J. Clin. Oncol.* 29, 1445–1451 (2011).
- 423. Hellmuth, J. C. *et al.* Duodenal-type and nodal follicular lymphomas differ by their immune microenvironment rather than their mutation profiles. *Blood* **132**, 1695–1702 (2018).
- 424. Haebe, S. *et al.* Site to Site Comparison of Follicular Lymphoma Biopsies By Single Cell RNA Sequencing. *Blood* **134**, 297–297 (2019).
- 425. Barreca, A. *et al.* Inter- and intratumoral heterogeneity of BCL2 correlates with IgH expression and prognosis in follicular lymphoma. *Blood Cancer J.* **4**, e249–e249 (2014).
- 426. Roider, T. *et al.* Dissecting intratumour heterogeneity of nodal B-cell lymphomas at the transcriptional, genetic and drug-response levels. *Nat. Cell Biol.* **22**, 896–906 (2020).
- 427. Dubey, N. K. *et al.* Revisiting the Advances in Isolation, Characterization and Secretome of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2200 (2018).
- 428. Pepe, G. *et al.* 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 (2018).
- 429. Zhu, K., Cai, L., Cui, C., de Los Toyos, J. R. & Anastassiou, D. Single-cell analysis reveals the pan-cancer invasiveness-associated transition of adipose-derived stromal cells into COL11A1-expressing cancer-associated fibroblasts. *PLoS Comput. Biol.* **17**, e1009228 (2021).
- 430. Liu, Y., Huang, Z., Cui, D. & Ouyang, G. The Multiaspect Functions of Periostin in Tumor Progression. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1132**, 125–136 (2019).

- 431. Yang, X. *et al.* FAP Promotes Immunosuppression by Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling. *Cancer Res.* **76**, 4124–4135 (2016).
- 432. Mhaidly, R. & Mechta-Grigoriou, F. Fibroblast heterogeneity in tumor micro-environment: Role in immunosuppression and new therapies. *Semin. Immunol.* **48**, 101417 (2020).
- Larsen, A. M. H. *et al.* Collagen Density Modulates the Immunosuppressive Functions of Macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **205**, 1461–1472 (2020).
- 434. Sha, H., Zhang, D., Zhang, Y., Wen, Y. & Wang, Y. ATF3 promotes migration and M1/M2 polarization of macrophages by activating tenascin-C via Wnt/β-catenin pathway. *Mol. Med. Rep.* 16, 3641–3647 (2017).
- 435. Baitsch, D. *et al.* APOLIPOPROTEIN E (APOE) INDUCES ANTI-INFLAMMATORY PHENOTYPE IN MACROPHAGES. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1160–1168 (2011).
- 436. Laplante, P. *et al.* MFG-E8 Reprogramming of Macrophages Promotes Wound Healing by Increased bFGF Production and Fibroblast Functions. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 2005–2013 (2017).
- 437. Gjorgjevski, M. *et al.* Molecular profiling of the tumor microenvironment in glioblastoma patients: correlation of microglia/macrophage polarization state with metalloprotease expression profiles and survival. *Biosci. Rep.* **39**, (2019).
- Marigo, I. *et al.* Disabled Homolog 2 Controls Prometastatic Activity of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Discov.* **10**, 1758–1773 (2020).
- 439. Li, X. *et al.* Targeting FAPα-expressing tumor-associated mesenchymal stromal cells inhibits triple-negative breast cancer pulmonary metastasis. *Cancer Lett.* **503**, 32–42 (2021).
- Mazur, A., Holthoff, E., Vadali, S., Kelly, T. & Post, S. R. Cleavage of Type I Collagen by
   Fibroblast Activation Protein-α Enhances Class A Scavenger Receptor Mediated Macrophage
   Adhesion. *PLOS ONE* 11, e0150287 (2016).
- 441. Chen, Y.-P. *et al.* SIRPα expression delineates subsets of intratumoral monocyte/macrophages with different functional and prognostic impact in follicular lymphoma. *Blood Cancer J.* **9**, 84 (2019).

- 442. Owen, J. & Mohamadzadeh, M. Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. *Front. Physiol.* **4**, 159 (2013).
- 443. Sangaletti, S. *et al.* Defective stromal remodeling and neutrophil extracellular traps in lymphoid tissues favor the transition from autoimmunity to lymphoma. *Cancer Discov.* **4**, 110–129 (2014).
- 444. Murakami, M. & Kudo, I. Phospholipase A2. J. Biochem. (Tokyo) **131**, 285–292 (2002).
- 445. Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C. & Ameneiros-Rodríguez, E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* **5**, 85–100 (2016).
- 446. Huang, J. *et al.* Adipocyte p62/SQSTM1 Suppresses Tumorigenesis through Opposite Regulations of Metabolism in Adipose Tissue and Tumor. *Cancer Cell* **33**, 770-784.e6 (2018).
- 447. Lengyel, E., Makowski, L., DiGiovanni, J. & Kolonin, M. G. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. *Trends Cancer* **4**, 374–384 (2018).
- 448. Wu, Q. *et al.* Exosomes from the tumour-adipocyte interplay stimulate beige/brown differentiation and reprogram metabolism in stromal adipocytes to promote tumour progression. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **38**, 223 (2019).
- 449. Balaban, S. *et al.* Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. *Cancer Metab.* **5**, 1 (2017).
- 450. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
- 451. Weinhouse, S. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 267–269 (1956).
- 452. Gordan, J. D., Thompson, C. B. & Simon, M. C. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* **12**, 108–113 (2007).
- 453. Varano, G. *et al.* The B-cell receptor controls fitness of MYC-driven lymphoma cells via GSK3β inhibition. *Nature* **546**, 302–306 (2017).
- 454. Burack, R. *et al.* Subclonal Mutations of TP53 Are Common in Untreated Follicular Lymphoma and Mutation Status Is Predictive of PFS When CHOP Is Combined with 131-Iodine Tositumomab but Not with Rituximab: An Analysis of SWOG S0016. *Blood* **132**, 919 (2018).

- 455. De Silva, N. S., Simonetti, G., Heise, N. & Klein, U. The diverse roles of IRF4 in late germinal center B-cell differentiation. *Immunol. Rev.* **247**, 73–92 (2012).
- 456. Yu, B. *et al.* Clusterin/Akt Up-Regulation Is Critical for GATA-4 Mediated Cytoprotection of Mesenchymal Stem Cells against Ischemia Injury. *PloS One* **11**, e0151542 (2016).
- 457. Pangault, C. *et al.* Integrative Analysis of Cell Crosstalk within Follicular Lymphoma Cell Niche: Towards a Definition of the FL Supportive Synapse. *Cancers* **12**, (2020).
- 458. Frazzi, R. *et al.* Increase in clusterin forms part of the stress response in Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Oncol.* **38**, 677–684 (2011).
- 459. Clark, R. A., Alon, R. & Springer, T. A. CD44 and hyaluronan-dependent rolling interactions of lymphocytes on tonsillar stroma. *J. Cell Biol.* **134**, 1075–1087 (1996).
- 460. Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* **117**, 1147–1154 (2007).
- 461. Lamaison, C. *et al.* A novel 3D culture model recapitulates primary FL B cell features and promotes their survival. *Blood Adv.* (2021) doi:10.1182/bloodadvances.2020003949.
- 462. Shiga, K. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers* **7**, 2443–2458 (2015).
- 463. Sukumar, S., Conrad, D. H., Szakal, A. K. & Tew, J. G. Differential T Cell-Mediated Regulation of CD23 (FcεRII) in B Cells and Follicular Dendritic Cells. *J. Immunol.* **176**, 4811–4817 (2006).
- 464. Bal, M. *et al.* Angioimmunoblastic T-Cell lymphoma: A critical analysis of clinical, morphologic and immunophenotypic features. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **53**, 640 (2010).
- 465. Jones, D., Jorgensen, J. L., Shahsafaei, A. & Dorfman, D. M. Characteristic proliferations of reticular and dendritic cells in angioimmunoblastic lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 22, 956–964 (1998).
- 466. Thomazy, V. A., Vega, F., Medeiros, L. J., Davies, P. J. & Jones, D. Phenotypic modulation of the stromal reticular network in normal and neoplastic lymph nodes: tissue transglutaminase reveals coordinate regulation of multiple cell types. *Am. J. Pathol.* **163**, 165–174 (2003).

- 467. Foss, H. D. *et al.* Patterns of cytokine gene expression in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *Blood* **85**, 2862–2869 (1995).
- 468. Townsend, W. *et al.* The architecture of neoplastic follicles in follicular lymphoma; analysis of the relationship between the tumor and follicular helper T cells. *Haematologica* **105**, 1593–1603 (2020).
- 469. Muramatsu, M. *et al.* Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* **102**, 553–563 (2000).
- 470. Neyt, K., Perros, F., GeurtsvanKessel, C. H., Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol.* **33**, 297–305 (2012).
- 471. Adachi, S., Yoshida, H., Kataoka, H. & Nishikawa, S. Three distinctive steps in Peyer's patch formation of murine embryo. *Int. Immunol.* **9**, 507–514 (1997).
- 472. Mebius, R. E., Streeter, P. R., Michie, S., Butcher, E. C. & Weissman, I. L. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4+ CD3- cells to colonize lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 11019–11024 (1996).
- 473. Mebius, R. E., Rennert, P. & Weissman, I. L. Developing lymph nodes collect CD4+CD3LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* 7, 493–504 (1997).
- 474. Yoshida, H. *et al.* IL-7 receptor alpha+ CD3(-) cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. *Int. Immunol.* **11**, 643–655 (1999).
- 475. Mebius, R. E. *et al.* The Fetal Liver Counterpart of Adult Common Lymphoid Progenitors Gives
  Rise to All Lymphoid Lineages, CD45+CD4+CD3– Cells, As Well As Macrophages. *J. Immunol.* 166, 6593–6601 (2001).
- 476. Yoshida, H. *et al.* Expression of α4β7 Integrin Defines a Distinct Pathway of Lymphoid
  Progenitors Committed to T Cells, Fetal Intestinal Lymphotoxin Producer, NK, and Dendritic Cells. *J. Immunol.* 167, 2511–2521 (2001).

- 477. Eberl, G. *et al.* An essential function for the nuclear receptor RORγt in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat. Immunol.* **5**, 64–73 (2004).
- 478. Sun, Z. *et al.* Requirement for RORγ in Thymocyte Survival and Lymphoid Organ
   Development. *Science* 288, 2369–2373 (2000).
- 479. Yokota, Y. *et al.* Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix–loop–helix inhibitor Id2. *Nature* **397**, 702–706 (1999).
- 480. Marinkovic, T. *et al.* Interaction of mature CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells with dendritic cells triggers the development of tertiary lymphoid structures in the thyroid. *J. Clin. Invest.* **116**, 2622–2632 (2006).
- 481. Agbay, R. L. M. C. *et al.* Characteristics and clinical implications of reactive germinal centers in the bone marrow. *Hum. Pathol.* **68**, 7–21 (2017).
- 482. Dumontet, E. *et al.* Extracellular vesicles shed by follicular lymphoma B cells promote the polarization of bone marrow stromal cell niche. *Blood* (2021) doi:10.1182/blood.2020008791.
- 483. Lin, C. *et al.* Matrix promote mesenchymal stromal cell migration with improved deformation via nuclear stiffness decrease. *Biomaterials* **217**, 119300 (2019).
- 484. Gonzalez-Zubeldia, I. *et al.* Co-migration of colon cancer cells and CAFs induced by TGFβ1 enhances liver metastasis. *Cell Tissue Res.* **359**, 829–839 (2015).
- 485. Cong, P. *et al.* In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood* **99**, 3376–3382 (2002).
- Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390 (2016).
- 487. Henopp, T., Quintanilla-Martínez, L., Fend, F. & Adam, P. Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes. *Histopathology* **59**, 139–142 (2011).
- 488. Jegalian, A. G. *et al.* Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. *Blood* **118**, 2976–2984 (2011).

- 489. Mamessier, E. *et al.* Early lesions of follicular lymphoma: a genetic perspective.
   *Haematologica* 99, 481–488 (2014).
- 490. Schmidt, J. *et al.* Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma. *Leukemia* **28**, 1103–1112 (2014).
- 491. Schmidt, J. *et al.* CREBBP gene mutations are frequently detected in in situ follicular neoplasia. *Blood* **132**, 2687–2690 (2018).
- 492. Bonzheim, I. *et al.* A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma. *Blood* **118**, 3442–3444 (2011).
- 493. Juskevicius, D. *et al.* Distinct genetic evolution patterns of relapsing diffuse large B-cell
   lymphoma revealed by genome-wide copy number aberration and targeted sequencing analysis.
   *Leukemia* 30, 2385–2395 (2016).
- 494. Roulland, S. *et al.* Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* **203**, 2425–2431 (2006).
- 495. Martin, P. *et al.* Long-term outcomes, secondary malignancies and stem cell collection following bendamustine in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* **178**, 250–256 (2017).
- 496. Olszewski, A. J., Reagan, J. L. & Castillo, J. J. Late infections and secondary malignancies after bendamustine/rituximab or RCHOP/RCVP chemotherapy for B-cell lymphomas. *Am. J. Hematol.*93, E1–E3 (2018).
- 497. Saito, H. *et al.* Prolonged lymphocytopenia after bendamustine therapy in patients with relapsed or refractory indolent B-cell and mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J.* **7**, e620 (2017).
- 498. Bachy, E. *et al.* Sustained Progression-Free Survival Benefit of Rituximab Maintenance in
  Patients With Follicular Lymphoma: Long-Term Results of the PRIMA Study. *J. Clin. Oncol.* 37, 2815–2824 (2019).

- 499. Rivas-Delgado, A. *et al.* Response duration and survival shorten after each relapse in patients with follicular lymphoma treated in the rituximab era. *Br. J. Haematol.* **184**, 753–759 (2019).
- 500. Decaudin, D. *et al.* Absolute lymphocyte count as a predictive factor for response to monoclonal anti-CD20 antibody therapy. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **14**, 171–172 (2003).
- 501. Shafer, D. *et al.* Low NK cell counts in peripheral blood are associated with inferior overall survival in patients with follicular lymphoma. *Leuk. Res.* **37**, 1213–1215 (2013).
- 502. Taskinen, M., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Nyman, H., Eerola, L.-M. & Leppä, S. A high tumorassociated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 5784–5789 (2007).
- 503. Li, M. *et al.* Remodeling tumor immune microenvironment via targeted blockade of PI3K-γ and CSF-1/CSF-1R pathways in tumor associated macrophages for pancreatic cancer therapy. *J. Controlled Release* **321**, 23–35 (2020).
- 504. Dreyling, M. *et al.* Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Copanlisib in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **35**, 3898–3905 (2017).
- 505. Flinn, I. W. *et al.* Duvelisib, a novel oral dual inhibitor of PI3K-δ,γ, is clinically active in advanced hematologic malignancies. *Blood* **131**, 877–887 (2018).
- 506. Serrat, N. *et al.* PI3Kδ inhibition reshapes follicular lymphoma–immune microenvironment cross talk and unleashes the activity of venetoclax. *Blood Adv.* **4**, 4217–4231 (2020).
- 507. Leverson, J. D. & Cojocari, D. Hematologic Tumor Cell Resistance to the BCL-2 Inhibitor Venetoclax: A Product of Its Microenvironment? *Front. Oncol.* **8**, 458 (2018).
- 508. Tse, C. *et al.* ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Res.* **68**, 3421–3428 (2008).

- 509. Chiu, H. *et al.* Combination lenalidomide-rituximab immunotherapy activates anti-tumour immunity and induces tumour cell death by complementary mechanisms of action in follicular lymphoma. *Br. J. Haematol.* **185**, 240–253 (2019).
- 510. Ménard, C. *et al.* Lenalidomide triggers T-cell effector functions in vivo in patients with follicular lymphoma. *Blood Adv.* **5**, 2063–2074 (2021).
- 511. Yang, Z.-Z. *et al.* 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 26, 5217–5231 (2020).

## NOTES

## NOTES



Titre Interactions des cellules tumorales B et des cellules stromales dans le lymphome folliculaire : une question menée par des concepts d'hétérogénéité tumorale et micro environnementale.

**Mots clés :** stroma ; interactions ; lymphome folliculaire

Résumé : Le lymphome folliculaire est l'un des exemples paradigmatiques des cancers dépendant d'un microenvironnement tumoral spécifique. Il comprend notamment des fibroblastes associés au cancer (CAF) émergeant de la reprogrammation des cellules stromales lymphoïdes ou de leur(s) précurseur(s) dans le ganglion et la moelle. Les cellules stromales dans le lymphome folliculaire soutiennent directement la croissance des cellules B malignes et orchestrent la niche tumorale en contribuant, par un dialogue bidirectionnel, au recrutement et à la polarisation d'autres sous-populations immunitaires. Une meilleure compréhension des voies de signalisation et des mécanismes moléculaires responsables du remodelage des cellules stromales et de la cinétique de ce dernier seraient utiles pour définir de nouveaux marqueurs prédictifs et de nouvelles approches thérapeutiques dans ce cancer encore incurable. Les modèles in vitro récapitulant les forces biomécaniques, le microenvironnement cellulaire et l'organisation spatiale des lymphomes B restent rares, alors que tous ces paramètres constituent des éléments clés déterminants dans la lymphomagenèse et la résistance aux médicaments. En utilisant une méthode microfluidique basée sur l'encapsulation de cellules dans des microsphères d'alginate perméables, nous avons développé un nouveau modèle 3D incorporant des cellules B de lymphome, de la matrice extracellulaire et/ou des cellules stromales d'amygdale.

Nous avons montré que les cellules de lymphome B étaient capables de former des sphéroïdes cohésifs résultant de la surexpression des composants de la matrice extra-cellulaire.De plus, dans ce modèle, les cellules stromales s'auto-organisent pour initier la prolifération des cellules tumorales. La culture 3D induit une résistance à l'agent chimiothérapeutique classique doxorubicine, mais pas à l'inhibiteur de BCL2 ABT-199, identifiant cette approche comme un modèle in vitro pertinent pour comprendre l'activité des agents thérapeutiques . L'analyse RNAseq a mis en évidence des modulations des voies de signalisation similaires à celles observées dans les cellules primaires de lymphome folliculaire. Enfin, notre modèle a permis la survie à long terme in vitro de cellules B primaires de lymphome folliculaire. Nous proposons ainsi un nouveau modèle 3D imitant la niche tumorale du lymphome et permettant d'étudier la relation dynamique entre les cellules tumorales et microenvironnement pour les tests de nouveaux leur médicaments anticancéreux. En parallèle, nous avons pour la première fois, initié la caractérisation d'une niche tumorale jusqu'alors jamais explorée dans le lymphome folliculaire, située dans le tissu adipeux péri-ganglionnaire. Dans cette niche, les cellules tumorales évoluent au contact de cellules stromales adoptant un phénotype CAF associé aux tumeurs solides, et de macrophages associés aux tumeurs de phénotype M2.

Title : B-stroma interactions in follicular lymphoma, a question led by concepts of tumor and microenvironmental heterogeneity.

Keywords: stoma; interactions; follicular lymphoma

Abstract: Follicular lymphoma is the most prototypical B-cell lymphoma that depends on a specific tumor microenvironment, including cancer-associated fibroblasts (CAFs) arising from the reprogramming of lymphoid stromal cells or their precursors in the lymph node and bone marrow. Stromal cells in follicular lymphoma directly support the growth of malignant B cells and orchestrate the tumor niche by contributing, through a bidirectional dialogue, to the recruitment and polarization of other immune subpopulations. A better understanding of the signaling pathways, molecular mechanisms and kinetics of stromal cell remodeling would be instrumental in defining new predictive markers and therapeutic approaches in this still lethal malignancy. In vitro models capturing the biomechanical forces, cellular microenvironment and spatial organization of Bcell lymphomas remain scarce, while all these parameters are key determinants of lymphomagenesis and drug resistance. Using a microfluidic method based on cell encapsulation in permeable alginate beads, we developed a new 3D model incorporating lymphoma B cells, extracellular matrix and/or tonsil stromal cells. We showed that B-cells were able to form cohesive spheroids resulting from the overexpression of extracellular matrix components.

Furthermore, in this model, stromal cells self-organize to initiate tumor cell proliferation. The 3D-culture induced resistance to the classical chemotherapeutic agent doxorubicin, but not to the BCL2 inhibitor ABT-199, identifying this approach as a relevant in vitro model to evaluate the activity of some? therapeutic agents. RNAseq analysis revealed modulations of signaling pathways similar to those observed in primary follicular lymphoma cells. Finally, our model supported long-term survival of primary follicular lymphoma B cells. We thus propose a new 3D-model mimicking the lymphoma tumor niche and allowing for the study of the dynamic relationship between tumor cells and their microenvironment and the testing of new anticancer drugs. In parallel, we have for the first time initiated the characterization of a tumor niche never explored before in follicular lymphoma, located in the peri-nodular adipose tissue. In this niche, tumor cells evolve in close contact with stromal cells adopting a CAF phenotype associated with solid tumors, and macrophages presenting with M2 phenotype. Also, T cells expressed an immunosuppressive signature and tumor cells adopt there a quiescent metabolic profile and a plasma cell differentiation.